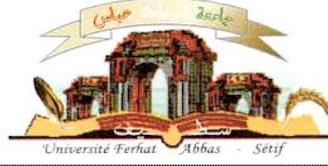


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°...../SNV/2018

**THÈSE**

Présentée par

**BELKHIRI Farida**

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT EN SCIENCES**

**Filière: BIOLOGIE**

**Spécialité: MICROBIOLOGIE**

**THÈME**

**Activité Antimicrobienne et Antioxydante de deux Plantes  
Médicinales: *Salvia verbenaca* et *Lepidium sativum***

Soutenue publiquement le 22/03/2018

DEVANT LE JURY

Président	HARZALLAH Daouad	Prof. Université de Sétif 1
Directeur	BAGHIANI Abderrahmane	Prof. Université de Sétif 1
Co-directeur	ZERROUG Mohammed Mihoub	Prof. Université de Sétif 1
Examineurs	AISSAT Kamel	Prof. Université de Batna
	NABTI Elhafid	Prof. Université de Bejaia
	DIAFAT Abdelouahab	MCA. Université de B.B.A

*Laboratoire de Biochimie Appliquée*

## *Remerciements*

Je tiens à remercier très vivement mon directeur de thèse Monsieur **Abderrahmane BAGHIANI**, Professeur à l'université de Sétif-1, Je le remercie de m'avoir toujours poussé vers l'avant, pour toute la confiance qu'il m'a portée, pour sa grande disponibilité inconditionnelle, ses conseils avisés, et ses encouragements. Ses nombreuses idées furent un soutien très précieux.

J'adresse mes remerciements pour le Co-encadreur Monsieur **Mohammed Mihoub ZERROUG**, Professeur à l'université de Sétif1, pour son soutien.

J'exprime ma gratitude à Monsieur **HARZALLAH Daouad**, Professeur à l'université de Sétif-1 pour l'honneur qu'il m'a fait en présidant le jury de cette thèse. Je le remercie vivement pour sa lecture attentive de mon manuscrit et pour son intérêt à l'égard de mon travail.

Je remercie également messieurs les examinateurs pour la caution qu'ils ont bien voulu apporter à ce travail. J'adresse mes remerciements et ma gratitude aux:

Monsieur **AISSAT Kamel**, Professeur à l'université de Batna, Monsieur **NABTI Elhafid**, Professeur à l'université de Bejaia et Monsieur **DIAFAT Abdelouahab**, Maître de conférences classe A à l'université de Bordj Bou Arreridj de m'avoir honoré en acceptant d'être examinateurs de ce travail.

Enfin, je remercie chaleureusement tous mes collègues enseignants et j'exprime ma gratitude au corps administratif du département de microbiologie et de la faculté des Sciences de la nature et de la vie de l'université Ferhat Abbas –Sétif1.

## **Dédicaces**

Je prie mon Dieu Tout-puissant d'accepter ce travail humble et de le faire dans  
l'équilibre de nos bonnes actions

Je dédis cette thèse

À mes chers parents, qu'Allah les préserve et prolonge leur vie,

À mon cher mari "AYAD Mouloud", qu''était mon bon assistant tout au long de  
mon travail, il m'a encouragé et m'a soutenue jusqu'au dernier point, que Dieu  
le préserve et paie ses pas.

À ma chère fille "Boutheyna" et mon cher fils "Abdallah", qu'Allah les  
conserve et les répare,

À mes chers frères, leurs femmes et leurs enfants,

À mes chères sœurs, leurs maris et leurs enfants,

À mes beaux-parents, mes beaux-frères et mes belles-sœurs,

À mes amies et mes collègues de travail,

À tous les enseignants qui ont contribué à ma formation

Que Dieu les sauve tous

**BELKHIRI Farida**

## الملخص

أجريت الدراسة الحالية لتقييم الخصائص المضادة للميكروبات و المضادة للأوكسدة وكذا الخصائص المضادة للالتهابات لمستخلصات الجزء الهوائي ل نبتة *Salvia verbenaca* (ESV) ومستخلصات بذور نبتة (ELS) *Lepidium sativum*. أعطى التقدير الكمي لعديدات الفينول والفلافونويدات في ESV و ELS مستويات عالية جدا، وخاصة في الـ FAC/SV. تميزت المستخلصات FAC و FCh للنبتين بنشاطية ضد مكروبية قوية تجاه 14 سلالة بكتيرية ممرضة غرام + وغرام - إما من حيث أقطار مناطق التثبيط (09.0 إلى 27.5 ملم) أو من حيث قيم CMI التي تراوحت بين 07.38 و 27.12 ملغ/مل. كما أظهرت هذه المستخلصات نشاطا مثبط ممتاز ضد خميرة *C. albicans* بأقطار تثبيط تراوحت بين 24.0 و 26.0 ملم. كان FAC/SV و FCh/LS المستخلصين النشيطين الوحيدين ضد نمو الفطريات الخيطية التي تم اختبارها. حيث أظهر FCh/LS تأثير قاتل على جميع الفطريات بتثبيط النمو والتبوغ لأكثر من 10 أيام من الحضن. بينت اختبارات النشاطية المضادة للأوكسدة مخبريا، أن مختلف المستخلصات ESV و ELS كان لها تأثير قوي في إزاحة جذر DPPH، حيث كانت قيم الـ IC<sub>50</sub> من 08.56 إلى 72.51 ميكروغرام/مل للـ ESV ومن 21.51 إلى 114.11 للـ ELS. كما تمكنت هذه المستخلصات من تثبيط أكسدة β-كاروتين، وخاصة مستخلصات ESV، التي سجلت I% من 78.81 إلى 84.93%. أيضا أظهرت ESV و ELS قدرة كبيرة في إرجاع الحديد حيث سجلت قيم منخفضة في EC<sub>50</sub> بين 04.7 و 45.5 ميكروغرام/مل للـ ESV وبين 21.5 و 135.0 ميكروغرام/مل للـ ELS. في المقابل، عند اسخلاب الحديد، كان المستخلص القطبي EHM و FAQ لكلا النبتتين أكثر نشاطا من الأجزاء غير القطبية (FCh و FAC). من جهة أخرى، أظهرت ESV و ELS نشاطا كبيرا ضد انحلال كريات الدم الحمراء الذي يسببه AAPH، خصوصا FAC/LS و FAC/SV، حيث كانت قيم (HT<sub>50</sub>): 185.5، 165.1 دقيقة، على التوالي. بالنسبة للدراسة في الحي، لم ينتج عن المعالجة بـ EM/LS (2 و 5 غ/كغ من وزن الجسم) أي آثار ضارة أو وفيات في الفئران، في حين أن EM/SV كان تقريبا سام بالجرعة 5 غ/كغ من وزن الجسم. ساهم استعمال الجرعة 100 ملغ/كغ من وزن الجسم من المستخلصين في تحسن كبير في القدرة المضادة للأوكسدة الكلية لدم ولبلازما الحيوانات. كما أدت هذه الجرعة إلى تحسين نشاطية إنزيم الكاتالاز (CAT) والتقليل من كمية MDA في أنسجة الكبد. وأخيرا فيما يتعلق بالنشاط المضاد للالتهابات، أظهر EM/LS و EM/SV بجرعة 100 ملغ/كغ نشاطا جيدا مضادا للوذمة (œdème)، حيث أدبا إلى انخفاض كبير في سمك ووزن الوذمة مقارنة مع الشاهد.

**الكلمات المفتاحية:** النشاطية المضادة للميكروبات، المضادة للأوكسدة والمضادة للالتهابات، *Salvia*، *Lepidium sativum* L، *verbenaca* L

## Résumé

La présente étude a été réalisée pour évaluer les propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et anti-inflammatoires des extraits de la partie aérienne de *Salvia verbenaca* (ESV) et des graines de *Lepidium sativum* (ELS). La quantification des polyphénols et des flavonoïdes dans les ESV et ELS a donné des teneurs très importantes notamment dans la FAc/SV. Les deux fractions FAc et FCh des deux plantes ont montré une activité antibactérienne puissante contre 14 souches bactériennes pathogènes, Gram+ et Gram-, soit en termes des DI (09.0 à 27.5 mm) soit en termes des CMI (07.60 et 25.47 mg/ml). Ces deux fractions ont également exhibé une excellente activité contre la levure *C. albicans* avec des DI compris entre 24.0 et 26.0 mm. La FCh/LS et FAc/SV ont été les seules actives contre la croissance des champignons filamenteux testés. Cependant, la FCh/LS a présenté un effet fongicide exprimé par l'inhibition de la germination des champignons pour 10 jours d'incubation. A l'issue des tests d'activité antioxydante *in vitro*, les ESV et ELS ont montré un effet scavenger très puissant du radical DPPH avec des IC<sub>50</sub> de 08.56 à 72.51 µg/ml pour les ESV et de 21.51 à 114.11 µg/ml pour les ELS. Ils ont également inhibé l'oxydation du β-carotène, notamment les ESV, qui ont marqué des I% de 78.81 à 84.93 %. Aussi, les ESV et ELS ont exhibé de puissant pouvoir réducteur du fer marquant ainsi de moindres EC<sub>50</sub>, 04.7 à 45.5 µg/ml pour les ESV et 21.5 à 135.0 µg/ml pour les ELS. Pour la chélation du fer, l'EHM et la FAq (polaires), ont été plus actifs que les fractions non polaires. D'autre part, les ESV et ELS ont manifesté d'importante activité contre la lyse induite par l'AAPH, notamment la FAc/LS et la FAc/SV (HT<sub>50</sub>= 185.5 et 165.1 min, respectivement). *In vivo*, l'administration aigüe d'EM/LS en deux doses, 2 et 5 g/kg du PC n'a produit aucun effet néfaste ou cas de mortalité chez les souris, tandis que, l'EM/SV était presque toxique avec la dose 5 g/kg. La dose 100 mg/kg d'EM/SV et d'EM/LS, a induit une amélioration significative de la CA totale du sang et du plasma des souris. Cette dose a significativement amélioré l'activité CAT et réduis le taux du MDA dans le tissu hépatique. Enfin, en ce qui concerne l'activité anti-inflammatoire, l'EM/SV et l'EM/LS ont présenté un bon effet anti-œdémateux, ils ont provoqué des réductions très significatives d'épaisseur et de poids d'œdèmes par apport au témoin.

**Mots clé:** propriétés antimicrobiennes; antioxydantes ; anti-inflammatoires, *Salvia verbenaca* L., *Lepidium sativum* L.

## Summary

The present study was conducted to evaluate the antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory properties of *Salvia verbenaca* aerial part extracts (ESV) and *Lepidium sativum* seed extracts (ELS). Quantification of polyphenols and flavonoids of ESV and ELS gave very high levels, especially in FAc/SV. FAc and FCh of both plants showed more potent antibacterial activity against 14 pathogenic bacterial strains, Gram+ and Gram-, either in terms of DI (09.0 to 27.5 mm) or in terms of MIC (07.60 and 25.47 mg/ml). These two fractions also exhibited excellent activity against yeast *C. albicans* with IDs between 24.0 and 26.0 mm. FCh/LS and FAc/SV were active against growth of filamentous fungi tested. However, FCh/LS exhibited a fungicidal effect expressed by inhibition of fungal germination for 10 days of incubation. *In vitro* antioxidant activity tests, showed that ESV and ELS had more potent scavenger effect of the DPPH radical with IC<sub>50</sub>s of 08.56 to 72.51 µg/ml for ESV and from 21.51 to 114.11 µg/ml. All extracts inhibited β-carotene oxidation, especially ESV, which I% ranging from 78.81% to 84.93%. ESV and ELS exhibited strong reducing power of iron, With EC<sub>50</sub> = 04.7 to 45.5 µg/ml and 21.5 to 135.0 µg/ml, respectively. For iron chelation, EHM and FAq (polar fractions) were more active than nonpolar fractions. Results showed that ESV and ELS had a significant activity against AAPH-induced hemolysis. *In vivo*, acute administration of 2 and 5 g/kg of PC of EM/LS produced no adverse effects or death in mice, while EM/SV was almost toxic with the dose of 5 g/kg. The 100 mg/kg dose of EM/SV and EM/LS induced a significant improvement in the total CA of the blood and plasma of mice. This dose significantly improved CAT activity and reduced the level of MDA in liver tissue. Finally, with regard to the anti-inflammatory activity, EM/SV and EM/LS showed a good anti-oedematous effect, they caused very significant reductions in thickness and weight of edema comparing to the witness.

**Key words:** antimicrobial properties; antioxidants; anti-inflammatories, *Salvia verbenaca* L., *Lepidium sativum* L.

---

**Sommaire**

Remerciements -----	
I	
Résumé -----	
II	
Liste des figures -----	
VII	
Liste des tableaux -----	
VIII	
Liste des Abréviations -----	
IX	
Introduction -----	01
<b>Partie bibliographique : 1. Aspect d'activité antimicrobienne</b>	
1. Antibiotiques -----	05
1.1. Infections bactériennes -----	05
1.2. Définition et classification des antibiotiques -----	05
1.3. Effets indésirables des antibiotiques -----	07
1.4. Résistance des bactéries aux antibiotiques -----	07
2. Antifongiques -----	08
2.1. Infections fongiques humaines -----	08
2.1.1. Facteurs de causalité des infections fongiques -----	09
2.1.2. Types des infections fongiques -----	09
2.2. Les antifongiques disponibles -----	11
2.2.1. Molécules antifongiques d'origine naturelle -----	13
2.2.2. Molécules antifongiques synthétiques et semi-synthétiques -----	15
2.3. Les plantes constituent une source précieuse d'antifongiques naturels -----	16
<b>2. Aspect d'activité antioxydante</b>	
1. Stress oxydatif -----	17
1.1. Espèces réactives (RS) -----	17
1.2. Deux types d'entités oxydantes (RS) -----	18
1.2.1. Espèces radicalaires -----	18
1.2.2. Espèces non radicalaires -----	18
1.3. Génération des RS -----	19
1.3.1. Génération des ROS -----	19
1.3.2. Génération des RNS -----	20
1.4. Sources des RS -----	21
1.4.1. Sources endogènes -----	21
1.4.2. Sources exogènes -----	22
1.5. Dommages oxydatifs des biomolécules -----	22
1.5.1. ROS et les lipides -----	23
1.5.2. ROS et les protéines -----	23
1.5.3. ROS et l'ADN -----	24

---

2. Antioxydants .....	25
2.1. Antioxydants endogènes .....	25
2.1.1. Antioxydants endogènes enzymatiques .....	25
2.1.2. Antioxydants endogènes non enzymatiques .....	28
2.2. Antioxydants exogènes .....	30
2.2.1. Vitamine C .....	30
2.2.2. Vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) .....	30
2.2.3. Caroténoïdes .....	31
2.2.4. Polyphénols .....	31

### **3. Les composés phénoliques (Polyphénols)**

1. Définition .....	32
2. Classes majeures des polyphénols .....	32
2.1. Acides phénoliques .....	33
2.2. Flavonoïdes .....	34
2.2.1. Définition .....	34
2.2.2. Classes majeures des flavonoïdes .....	34
2.3. Tannins .....	35
3. Activité antioxydante des polyphénols .....	36
3.1. Relation structure-activité antioxydante des polyphénols (SAR) .....	36
3.1.1. SAR des acides phénoliques .....	36
3.1.2. SAR des Flavonoïdes .....	38
4. Activité antimicrobienne des polyphénols .....	39

### **4. Les plantes médicinales**

1. <i>Salvia verbenaca</i> L. de la famille Lamiaceae .....	42
1.1. Classification taxonomique .....	42
1.2. Description de la plante ( <i>S. verbenaca</i> ) .....	43
1.3. Composition en polyphénols .....	44
1.4. Utilisation thérapeutique .....	45
2. <i>Lepidium sativum</i> Linn de la famille Brassicaceae .....	46
2.1. Origine et répartition géographique du <i>L. sativum</i> .....	46
2.2. Classification taxonomique du <i>L. sativum</i> .....	47
2.3. Description de la plante ( <i>L. sativum</i> ) .....	47
2.4. Composition phytochimique .....	48
2.5. Utilisation thérapeutique .....	50

### **Partie expérimentale: 1. Matériel et méthodes**

1. Matériel .....	52
1.1. Plantes médicinales .....	52
1.2. Souches microbiennes .....	52
1.3. Animaux .....	53
1.4. Réactifs chimiques et matériel instrumental .....	53
2. Extraction et dosage des polyphénols et des flavonoïdes .....	53
2.1. Préparation de l'extrait hydro-méthanolique (EHM) .....	53
2.2. Fractionnement des extraits EHM .....	54
2.3. Préparation de l'extrait méthanolique (EM) .....	55

2.4. Dosage des polyphénols totaux -----	56
2.5. Dosage des flavonoïdes -----	57
3. Activités antimicrobiennes des extraits -----	58
3.1. Activité antibactérienne -----	58
3.1.1. Méthode des disques de diffusion sur gélose -----	58
3.1.2. Méthode des puits de diffusion sur gélose -----	58
3.1.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) -----	59
3.2. Activité antifongique -----	59
4. Activités antioxydantes (in vitro) -----	60
4.1. Effet scavenger du radical DPPH -----	60
4.2. Test de $\beta$ -carotène / acide linoléique -----	61
4.3. Effet chélateur des métaux -----	62
4.4. Pouvoir réducteur des extraits -----	62
4.5. Inhibition de l'hémolyse oxydative des érythrocytes induite par l'AAPH -	63
5. Etude in vivo -----	64
5.1. Toxicité aigue des extraits méthanoliques -----	64
5.2. Activité antioxydante in vivo -----	65
5.2.1. Effet sur la capacité antioxydante totale du sang -----	66
5.2.2. Effet sur la capacité antioxydante du plasma -----	66
5.2.3. Estimation des indicateurs enzymatiques et non enzymatiques d'oxydation au niveau du tissu hépatique	67
5.3. Activité anti-inflammatoire in vivo -----	69
6. Analyse statistique -----	70

## **Résultats et discussion**

### **1. Extraction et dosage des polyphénols et des flavonoïdes**

1.1. Rendements des extraits -----	71
1.2. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes -----	72

### **2. Activités antimicrobiennes des extraits de ESV et de ELS**

2.1. Principe -----	76
2.2. Activité antibactérienne des extraits -----	76
2.2.1. Activité antibactérienne par la méthode des disques -----	76
2.2.2. Activités antibactérienne par la méthode des puits -----	79
2.3. Activité antifongique des extraits -----	88
2.3.1. Activité antifongique par la méthode des disques -----	88
2.3.2. Activité antifongique par la méthode des puits -----	91

### **3. Activité antioxydante *in vitro***

3.1. Piégeage du radical DPPH• -----	99
3.2. Inhibition d'oxydation du $\beta$ -carotène -----	103
3.3. Pouvoir réducteur du fer ferrique en fer ferreux -----	106
3.4. Test de chélation des métaux (Ferrozine) -----	109
3.5. Activité anti-hémolytique (in vitro) -----	112

### **4. Etude *in vivo***

---

4.1. Toxicité aigue des extraits EM/LS et EM/SV -----	116
4.1.1. Effets sur le poids corporel et la masse relative des organes -----	117
4.1.2. Effet sur les paramètres biochimiques -----	119
4.1.3. Classement de toxicité des deux extraits EM/LS et EM/SV -----	121
4.2. Activité antioxydante in vivo -----	122
4.2.1. Effet des extraits sur la capacité antioxydante totale du sang -----	122
4.2.2. Effet des extraits sur la capacité antioxydante du plasma (CAP) -----	124
4.2.3. Effet des extraits sur les indicateurs enzymatiques et non enzymatiques d'oxydation au niveau du tissu hépatique 127	
4.3. Activité anti-inflammatoire des extraits EM/SV et EM/LS in vivo -----	130
Discussion générale -----	134
Conclusion générale -----	138
Références bibliographiques -----	139

## Liste des figures

Figure 01 : Les antifongiques et leurs mécanismes d'action sus la cellule fongique -----	12
Figure 02 : Lamphotéricine B (Fungizone) -----	13
Figure 03 : Structure de la griséofulvine -----	14
Figure 04 : Structure de la nikkomycine Z -----	14
Figure 05 : Structure de la sordarine -----	15
Figure 06: Vue d'ensemble des voies antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques	26
Figure 07: Structure chimique générale des acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques-----	
33	
Figure 08: Structure chimique générale des flavonoïdes -----	34
Figure 09: Exemple d'unité structurelle de base des Tanins condensés -----	35
Figure 10: Aspect morphologique de <i>Salvia verbenaca</i> -----	44
Figure 11 : Aspect morphologique de <i>L. Sativum</i> -----	48
Figure 12 : Etapes de l'extraction des polyphénols des broyats des deux plantes ---	55
Figure 13 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique -----	56
Figure 14 : Courbes d'étalonnage de la quercétine et de la rutine -----	57
Figure 15 : Comparaison entre les teneurs des extraits ESV et ELS -----	75
Figure 16: Activité antimicrobienne de la FCh/SV (diamètres des zones d'inhibition) --	80
Figure 17: Activité antimicrobienne de la FAc/SV (diamètres des zones d'inhibition) --	81
Figure 18: Activité antimicrobienne de la FCh/LS (diamètres des zones d'inhibition) ---	82
Figure 19: Activité antimicrobienne de la FAc/LS en termes des DI (mm) -----	83
Figure 20: Comparaison d'activité antibactérienne en termes des DI (mm) -----	84
Figure 21: Cinétiques d'inhibition de la croissance fongique en termes de diamètres des zones d'inhibition produites par la FCh/LS -----	90
Figure 22: Effet de la dose d'extrait FCh/LS et FAc/SV sur les DI (mm) -----	92
Figure 23: Cinétiques d'activité antifongique en termes des DI (mm) -----	95
Figure 24: Réduction du radical DPPH par un proton d'hydrogène -----	99
Figure 25: Variation des pourcentages d'inhibition du radical DPPH avec la concentration des extraits ESV et ELS -----	100
Figure 26: Effet scavenger du radical DPPH des ESV et des ELS -----	101
Figure 27: Cinétiques de protection du $\beta$ -carotène contre l'oxydation en présence ESV et ELS -----	104
Figure 28: Comparaison entre les pourcentages d'inhibition d'oxydation du $\beta$ -carotène	105
Figure 29: Pouvoir réducteur des extraits ESV et ELS -----	107
Figure 30: Comparaison des EC50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) des extraits ESV et ELS avec l'EC50 -----	108
Figure 31: Chélation des ions ferreux par les extraits ESV et ELS -----	110
Figure 32: Les EC50 (chélation du $\text{Fe}^{2+}$ ) des extraits ESV et ELS -----	111
Figure 33: Cinétique d'hémolyse des globules rouges en absence (Témoin) et en présence des extraits ESV et ELS -----	113
Figure 34: Comparaison des temps de demi-hémolyse (HT50 min) pour les extraits ESV et ELS -----	115
Figure 35: Cinétique de la lyse érythrocytaire en présence de t-BHP pour les différents groupes -----	122

Figure 36: Temps de demi-lyse des globules rouges (HT50) des groupes .....	123
Figure 37: CAP vis-à vis le radical DPPH chez les souris traitées par la Vit C .....	125
Figure 38: Capacité antioxydante globale réductrice du plasma des souris traitées .....	126
Figure 39: Activité de la catalase du tissu hépatique des souris .....	128
Figure 40: Dose du MDA au niveau du tissu hépatique des souris .....	129
Figure 41: Comparaison de poids et épaisseur d'œdème d'oreille provoqué par le PMA	132

### Liste des tableaux

Tableau 01: Classes d'antibiotiques et leurs cibles .....	06
Tableau 02: Différentes molécules antifongiques synthétiques et semi-synthétiques .....	15
Tableau 03. Deux types d'entités oxydantes ou espèces réactives (RS) .....	19
Tableau 04 : Classes des composés phénoliques des plantes .....	33
Tableau 05 : Activités antimicrobiennes des principaux polyphénols et les germes .....	41
Tableau 06: Traitement des souris par administration unique des extraits .....	64
Tableau 07: Traitement des souris par injection intra-péritonéale quotidienne pendant 21 jours .....	65
Tableau 08: Doses injectées avant une heure de l'application de PMA .....	69
Tableau 09 : Rendements en pourcentage (%) des extraits ESV et ELS .....	72
Tableau 10 : Teneurs des différents extraits ESV en polyphénols totaux .....	73
Tableau 11: Teneurs des différents extraits ELS en polyphénols totaux .....	73
Tableau 12: DI produites par ESV et ELS contre les 10 souches bactériennes testées ---	77
Tableau 13: Diamètres des zones d'inhibition des bactéries selon le Gram .....	85
Tableau 14: Concentrations minimales inhibitrices enregistrées par les quatre fractions FCh/SV, FAc/SV, FCh/LS et FAc/LS en utilisant la méthode des micro-dilutions .....	87
Tableau 15: Zones d'inhibition des champignons filamenteux (FCh/LS et FAc/SV) .....	89
Tableau 16 : Les DI produits par FCh/LS et FAc/SV contre les champignons .....	91
Tableau 17: Les DI produits par FCh/LS et l'Econazole contre les champignons .....	95
Tableau 18. Taux de mortalité après traitement des souris par EM/LS et EM/SV .....	117
Tableau 19: Effet des extraits EM sur le poids corporel des souris après 14 jours d'observation .....	118
Tableau 20: Masse relative d'organe des organes des souris traitées et non traitées .....	119
Tableau 21: Paramètres biochimiques sériques des souris après 14 jours d'observation -	120
Tableau 22: Effet des extraits de plantes sur l'œdème induit par le PMA dans l'oreille de la souris .....	131

## Liste des abréviations

AAPH	2,2-Azo-bis (2-AmidinoPropane) diHydrochloride)
AC	Absorbance du contrôle
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AE	Absorbance en présence des extraits.
AGPI	Acides Gras Polyinsaturés
ALP	Alcaline Phosphatase
ALT	Alanine AminoTransferase
ANOVA	Analyse de variance
ARN	Acide Ribonucléique
AST	Aspartate AminoTransferase
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosine Triphosphate
BHT	Butylated HydroxyToluene
BN	Bouillon Nutritif
CAP	Capacité Antioxydante Plasmatique
CAT	Catalase
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
Créa	Créatinine
CYP	Cytochrome P
DCF	Diclofénac
DI	Diamètre d'Inhibition
DL50	Dose Létale de 50%
DMSO	Diméthyl silfoxyde
DMT	Dose Maximale Tolérée
DPPH	2,2'-DiPhenyl-1-PicrylHydrazyl
EDTA	Ethylene Diamin Tetra Acetic Acid
EHM	Extrait Hydro-Méthanolique
ELS	Extraits de <i>Lepidium sativum</i>
EM	Extrait Méthanolique
ESV	Extraits de <i>Salvia verbenaca</i>
FAC	Fraction d'acétate d'éthyle
FAq	Fraction aqueuse

FCh	Fraction chloroformique
Gen	Gentamicine
GPx	Glutathion Peroxydase
GSR	Glutathion Réductases
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HSV	Herpes Simplex Virus
HT <sub>50</sub>	Half-hemolysis Time (temps de demi-hémolyse)
IC <sub>50</sub>	Concentration Inhibitrice de 50 % de l'activité
LDL	Lipoprotéines de Densité Légère
LS	<i>Lepidium sativum</i>
MDA	Malondialdéhyde
MH	Muller Hinton
MHA	Muller Hinton Agar
MHB	Muller Hinton Broth
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Tampon Phosphate Salin
PC	Poids Corporel
PDA	Pomme de terre Dextrose Agar
PMA	Phorbol Myristate Acétate
RCS	Reactive Chlorine Species
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
ROW	Relative Organ Weight
RS	Reactive Species
SAR	Structure-Activity Relationships
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Meticiline
SD	Standard Deviation
SEM	Standard Error of the Mean
SOD	SuperOxydes Dismutases
SV	<i>Salvia verbenaca</i>
TBA	ThioBarbituric Acide
TCA	TriChloracétic Acide
UV	Ultra Violet
Vit C	Vitamine c
XO	Xanthine Oxydase

### Introduction

A nos jours, l'utilisation des plantes médicinales dans le traitement de diverses maladies devient florissante. Environ 80 % des personnes issues de pays développés utilisent de la médecine traditionnelle, qui comporte des composés dérivés de plantes médicinales (Kamatou, 2006). L'Organisation mondiale de la santé (OMS), a signalé que les plantes médicinales seraient la meilleure source pour obtenir une variété de médicaments efficaces et moins nocifs (Tawfeeq et Akrayi, 2012). Ce retour aux plantes médicinales a été le seul refuge et la bonne solution *vis-à-vis* la diminution de l'efficacité des médicaments et des antibiotiques synthétiques en plus, de leurs effets secondaires inquiétants.

Au cours des dernières années, de nombreuses études ont été menées dans différents pays pour prouver l'efficacité de ces ressources naturelles de médication. De nombreuses plantes ont donc été utilisées en raison de leurs traits thérapeutiques dus essentiellement à leurs métabolites secondaires à savoir des composés phénoliques, des huiles essentielles, des tanins, des terpénoïdes, des alcaloïdes et des flavonoïdes. Parmi ces métabolites, les composés phénoliques présentent un large spectre d'activités biologiques; antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, anti-allergènes, anti-artériologiques, antithrombotiques, cardioprotectrices et vasodilatatrices (Balasundram *et al.*, 2006). Les produits végétaux contenant des constituants phénoliques sont de plus en plus intéressants car ils possèdent la capacité de protéger le corps des dommages causés par le stress oxydatif et par conséquent, le protéger contre les maladies cardiovasculaires et le cancer (Khalil *et al.*, 2007).

En outre, les composés phénoliques ont *in vitro* des propriétés antimicrobiennes. De nombreuses plantes ont été évaluées non seulement pour leur activité antimicrobienne inhérente, mais aussi pour leur capacité à améliorer l'activité antibiotique ou à renverser la résistance aux antibiotiques (Tawfeeq et Akrayi, 2012). Les plantes sont donc, une source

importante de produits antimicrobiens, et la plupart sont efficaces contre divers organismes, y compris les champignons, les levures, les bactéries, les insectes et les nématodes (Monte *et al.*, 2014). L'activité antibactérienne des composés naturels est attribuée à leur capacité d'inhiber la synthèse des peptidoglycanes, d'endommager les structures membranaires microbiennes, de modifier l'hydrophobie de la surface de la membrane bactérienne et aussi de moduler la détection du quorum (QS), (Monte *et al.*, 2014).

*Salvia verbenaca* L. (clary sauvage) est une plante aromatique, herbacée durable, plus que probable indigène des pays méditerranéens et des îles Canaries et s'est propagée en Europe et en Asie (Codd, 1985 ; Ben Farhat *et al.*, 2013). Elle appartient au genre *Salvia* (sauge) qui est l'un des genres aromatiques et médicinaux les plus importants de la famille des Lamiaceae. Du nom latin "Salvia", qui signifie guérir, il est clair que ce genre a une réputation historique dans le traitement des maladies. *S. verbenaca* nommée "Moulemdhamed" dans la région de Bordj Bou Ariridj en Algérie et "Elkhayyata" en Tunisie et en Maroc, est utilisée comme un remède efficace dans le traitement des différentes plaies (Khlifi *et al.*, 2006). Egalement, elle est cultivée dans plusieurs pays principalement pour obtenir des feuilles séchées à utiliser comme matière première en phytothérapie (Baser, 2000; Ben Farhat *et al.*, 2013). Des études antérieures ont démontré que cette plante était une herbe avec des effets antimicrobiens, antioxydants, anti-inflammatoires, antipaludiques, cytotoxiques, anti-cancéreux et antimycobactériens (Kamatou *et al.*, 2008).

*Lepidium sativum* L., connu sous le nom de cresson ou Elrashad (habb Elrashad en Algérie), appartient à la famille Brassicaceae (cruciferae). Elle est considérée comme l'une des meilleures plantes médicinales dans différents pays africains, où les graines sont mâchées pour guérir les maladies de la gorge, l'asthme, les maux de tête, pour la diurèse, dans les troubles menstruels (Kloos, 1976) et comme un remède contre les tumeurs utérines, les polypes nasaux et le cancer du sein (Hartwell, 1982). En Arabie Saoudite les graines de *L.*

*sativum* sont couramment utilisées comme fébrifuge, antirhumatisme, diurétique, dans l'angoisse menstruelle et abdominale. Elles sont également utilisées pour le traitement et la guérison rapide des fractures osseuses (Ageel *et al.*, 1987; Ahsan *et al.*, 1989).

Malgré le grand nombre des études effectuées sur les activités biologiques des espèces de *Salvia* comme sources précieuses de molécules bioactives, il manque des connaissances satisfaisantes à propos de *S. verbenaca*. À notre connaissance, il y a moins de rapport sur la quantification des composés phénoliques ainsi que l'évaluation des activités biologiques soit de ses extraits bruts ou de ses sous-produits. Aussi, on ne trouve pas dans la littérature des études sur la toxicité et les effets néfastes de cette plante en plus du manque des études *in vivo* concernant ses activités; antioxydantes, anti-inflammatoires, cicatrisante, cytotoxique.... Autrement dit, la littérature révèle des travaux limités sur les composés phytochimiques dont les polyphénoliques et des activités biologiques de *S. verbenaca* et l'absence des travaux sur ses activités biologiques et sa toxicité *in vivo*. D'autre part, néanmoins les graines de *L. sativum* sont un peu plus connues que *S. verbenaca* et elles sont utilisées beaucoup dans la médecine traditionnelle à travers le monde, la littérature présente des études limitées sur les composés polyphénoliques et des activités biologiques notamment antioxydantes des graines de *L. sativum* soit *in vivo* ou *in vitro*.

Donc, notre étude a été entreprise pour les objectifs suivants:

- Evaluer les activités antimicrobiennes des extraits bruts et des fractions en utilisant différentes techniques à savoir la méthode des disques de diffusion et la méthode des puits de diffusion sur gélose en plus de la détermination des concentrations minimales inhibitrices par la méthode des micro-dilutions sur des microplaques. Les extraits ont été appliqués sur onze souches bactériennes pathogènes ATCC et trois non ATCC, sur la levure *Candida albicans* ATCC et sur quatre champignons filamenteux.

- Evaluer l'activité antioxydante des extraits *in vitro* par l'utilisation de plusieurs tests complémentaires: DPPH,  $\beta$ -carotène/acide linoléique, pouvoir réducteur, chélation des métaux et inhibition de l'hémolyse induite par l'AAPH.
- Examiner la toxicité par l'administration unique d'extrait méthanolique de chaque plante chez les souris.
- Evaluer la capacité antioxydante totale du sang et la capacité antioxydante globale du plasma en suivant les indicateurs enzymatiques et non enzymatiques d'oxydation au niveau du tissu hépatique des souris.
- Tester l'activité anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique des deux plantes en mesurant leur capacité à inhiber l'œdème de l'oreille induit par le phorbol myristate acétate (PMA) chez les souris.

## **01. Aspect d'activité antimicrobienne**

### **1. Antibiotiques**

#### **1.1. Infections bactériennes**

Les infections bactériennes ont un impact important sur la santé publique. Elles peuvent se produire à n'importe quel site du corps, car tous les organes humains sont sensibles (Doron et Gorbach, 2010). Les infections peuvent être causées par la destruction des cellules du corps par l'organisme ou par la réponse immunitaire du corps à l'infection. Les bactéries sont transmises à l'homme par l'air, l'eau, la nourriture ou des vecteurs vivants (Doron et Gorbach, 2010). Les principaux modes de transmission des infections bactériennes sont le contact, l'air, les gouttelettes, les vecteurs et les véhicules. Cependant, les mesures préventives ont un impact considérable sur la morbidité et la mortalité. Ces mesures comprennent entre autres: le traitement de l'eau, la vaccination des humains et des animaux et des mesures d'hygiène personnelle (Doron et Gorbach, 2010).

#### **1.2. Définition et classification des antibiotiques**

Les antibiotiques sont des substances destinées à agir sur les microorganismes indésirables principalement sur les cellules bactériennes chez les êtres humains. La majorité des antibiotiques actuels sont de nature synthétique ou semi-synthétique mais il y'a certains d'origine naturelle (Tableau 01). La majorité des antibiotiques naturels transmettent leur effet antibactérien par inhibition de synthèse de la paroi bactérienne et la synthèse des protéines sauf la classe des Rifamycines qui inhibent la synthèse de l'ARN (Singh, 2012). Les antibiotiques synthétiques et semi synthétiques qui sont développés en fonction des « cibles » de destruction de la cellule bactérienne, peuvent être classés en quatre selon le (Tableau 01):

Tableau 01. Classes d'antibiotiques et leurs cibles (Kohanski *et al.*, 2010)

Type de médicament	Médicament	Nature	Espèces cibles	Voies Cibles
<b>Fluoroquinolones</b>				
<b>Inhibiteurs de la synthèse d'ADN</b>	Acide Nalidixique, ciprofloxacine, levofloxacine et gemifloxacine	Synthétique	Espèces aérobies Gram+ et Gram-, certains anaérobies à Gram- ex. <i>C. perfringens</i> et <i>M. tuberculosis</i>	Topoisomérase II (ADN gyrase), la topoisomérase IV
<b>Rifamycines</b>				
<b>Inhibiteurs de la synthèse d'ARN</b>	Rifamycines, rifampicine et rifapentine	Formes naturelles et semi-synthétiques	Des espèces Gram+ et Gram-, et <i>M. tuberculosis</i>	ADN polymérase ARN-dépendante
<b><math>\beta</math>-lactamines</b>				
<b>Inhibiteurs de synthèse des parois cellulaires</b>	<u>Pénicillines</u> pénicilline, l'ampicilline, l'oxacilline, <u>Céphalosporines</u> céfazoline, céfoxitine, ceftriaxone, céfépime) et carbapénèmes (imipénème)	Naturelles et semi-synthétiques	Espèces Gram+ aérobies et anaérobies et espèces Gram-	Protéines liant la pénicilline
<b>Glycopeptides et glycolipoptides</b>				
<b>Inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire</b>	Vancomycine; teicoplanine	Naturelles et semi-synthétiques	Espèces Gram-positives	Unités de peptidoglycane (dipeptide terminal D-Ala-D-Ala)
<b>Aminoglycosides</b>				
<b>Inhibiteurs de la synthèse des protéines</b>	Gentamicine, tobramycine, streptomycine et kanamycine	Naturelles et semi-synthétiques	Espèces aérobies Gram+ et Gram-, et <i>M. tuberculosis</i>	Sous-unité 30S du ribosome
<b>Tetracyclines</b>				
<b>Inhibiteurs de la synthèse des protéines</b>	Tétracycline et doxycycline	Naturelles et semi-synthétiques	Espèces aérobies Gram+ et Gram-	Sous-unité 30S du ribosome
<b>Macrolides</b>				
<b>Inhibiteurs de la synthèse des protéines</b>	Érythromycine et azithromycine	Naturelles et semi-synthétiques	Espèces aérobies et anaérobies Gram+ et Gram-	Sous-unité 50S du ribosome
<b>Phénicols</b>				
<b>Inhibiteurs de la synthèse des protéines</b>	Chloramphénicol	Naturelles et semi-synthétiques	Certaines espèces Gram+ et Gram-, y compris <i>B. fragilis</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>H. influenzae</i> et <i>S. pneumoniae</i>	Sous-unité 50S du ribosome

1- antibiotiques inhibent la synthèse d'ADN, 2- antibiotiques inhibent la synthèse d'ARN, 3- antibiotiques inhibent la synthèse de la paroi bactérienne et 4- antibiotiques inhibent la synthèse des protéines (Kohanski *et al.*, 2010).

### **1.3. Effets indésirables des antibiotiques**

Un antibiotique, comme tout médicament, expose au risque d'interaction médicamenteuse en réduisant ou augmentant l'effet d'autres traitements ainsi qu'au risque d'effets indésirables. Ceux-ci dépendent de la famille chimique (pénicillines, céphalosporines, fluoroquinolones, macrolides) ou de la molécule elle-même (moxifloxacine, érythromycine, amoxicilline, vancomycine) et peuvent être ou non réversibles: insuffisance rénale, effets sur l'appareil digestif, tendinites, photosensibilisation (Bevilacqua, 2011). D'autres effets secondaires non désirés sont liés à l'activité antimicrobienne elle-même: par son impact sur la flore bactérienne, l'antibiotique peut favoriser la prolifération de certaines espèces qui seront à l'origine d'infections secondaires. Exemple : les colites pseudomembraneuses à *Clostridium difficile* liées à l'utilisation de lincosamides, d'amoxicilline associée à l'acide clavulanique ou, plus récemment, des fluoroquinolones, notamment la moxifloxacine, des céphalosporines de troisième génération et de l'imipénème (Bevilacqua, 2011).

### **1.4. Résistance des bactéries aux antibiotiques**

L'utilisation excessive des antibiotiques conduit à la sélection des effets délétères chez les patients et dans la grande majorité des cas à l'apparition de populations bactériennes résistantes. Les bactéries peuvent être intrinsèquement résistantes à certains antibiotiques, ou peuvent acquérir la résistance, soit par mutation, soit par transfert génétique. Le deuxième mode d'acquisition de résistance peut se faire selon trois mécanismes différents dont la transduction (avec un bactériophage comme vecteur), la transformation (capture d'ADN par

la bactérie) et la conjugaison (transfert de plasmide d'une bactérie à une autre qui peut être d'espèce différente) (Baudry et Brézellec, 2006).

Les changements qui peuvent toucher la bactérie réceptrice sont entre autres: **1)** des modifications de la paroi bactérienne qui font cette paroi difficilement attaquée par l'antibiotique,

**2)** augmentation de la vitesse des échanges avec le milieu extérieur (absorption dans la cellule et décharge hors de la cellule), ce qui limite le temps de présence de l'antibiotique et sa concentration dans la cellule, ou **3)** la production d'enzymes qui rendent l'antibiotique inefficace (Borges-Walmsley *et al.*, 2003; Alvarez-Ortega *et al.*, 2013).

Les recherches récentes sont consacrées à trouver de nouvelles substances à activité antibactérienne, plus efficaces que les antibiotiques synthétiques, bien acceptées par le corps humain et sans exercer des effets délétères sur la santé.

## **2. Antifongiques**

### **2.1. Infections fongiques humaines**

Les champignons et les autres espèces microbiennes sont très répandues dans l'environnement, y compris le sol, les plantes, les arbres, et même dans la peau et d'autres parties du corps humain. La plupart d'entre eux ne sont pas dangereux, même conférer certains avantages à l'hôte, étant considéré comme la flore commensale. Malgré que certaines espèces en face à une croissance trop anormale, pourraient devenir nuisibles à l'hôte et, en dernière instance, pourrait compromettre sa vie (Brunke et Hube, 2013).

Les infections fongiques représentent actuellement un des plus graves problèmes de santé publique dans le monde. Elles occupent le quatrième rang dans les causes principales d'infections hématogènes (Tsai *et al.*, 2013). Les mycoses peuvent apparaître sous la forme

d'une simple infection superficielle dont les symptômes et les signaux ne sont pas toujours visibles. Puis, elle s'évolue jusqu'à former des lésions systémiques graves et débilitantes prospèrent très lentement, la plupart des temps, sans aucune méfiance par l'individu infecté (Pierce, 2005; Lupi *et al.*, 2005; Hay, 2006; Tsai *et al.*, 2013).

### **2.1.1. Facteurs de causalité des infections fongiques**

Il existe plusieurs facteurs de causalité qui contribuent à des infections fongiques opportunistes, certains d'entre eux sont difficiles, voire impossible, d'éviter. Ces facteurs pourraient être exogènes ou endogènes. Pollution, tabagisme, certains médicaments, une mauvaise alimentation, mode de vie sédentaire et des agents inducteurs de stress, sont quelques exemples de facteurs exogènes (Devasagayam *et al.*, 2004). Cependant, non seulement ces facteurs externes augmentent la vulnérabilité des organismes à des troubles, mais aussi des modifications génétiques dans les cellules, une dégénérescence, une réduction de la fonctionnalité des cellules (caractéristique du processus de vieillissement); des dégâts dans les globules blancs, des attaques dans les autres cellules du système de défense organique et la faiblesse du système immunitaire, conduisant tous à une diminution de la capacité à répondre à des organismes envahisseurs (Valko *et al.*, 2007).

### **2.1.2. Types des infections fongiques**

Les maladies fongiques sont généralement des mycoses superficielles, sous-cutanées ou systémiques, causées par des champignons pathogènes humains filamenteux ou par des levures (Hart et Shears, 1999). Les principaux pathogènes pour l'homme appartiennent à l'embranchement des deutéromycètes (*Fungi imperfecti*), comprenant les genres *Epiderinophyton*, *Pityrosporum* et plus couramment les *Candida* qui sont des levures commensales présentes dans toutes les personnes en bonne santé (Hart et Shears, 1999).

### **A) Mycoses superficielles**

Les mycoses superficielles concernent la peau (dermatophyties) et les phanères (cheveux et poils: teignes; ongles: onyxis). Elles apparaissent dans toutes les régions du monde et sont connues sous le nom de dermatophytoses (Pfaller et Sutton, 2006). Les champignons impliqués sont des dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) ou des levures (*Candida*, *Malassezia furfur*, *Trichosporon*). Ces champignons sont kératinophyles et ont une affinité pour les cheveux, les poils, la peau et les ongles (Aly, 1994).

### **B) Mycoses sous-cutanées**

Les mycoses sous-cutanées – mycétomes, sporotrichoses, chromoblastomycoses, etc. sont dues à des champignons saprophytes du sol, incapables de traverser la peau. La transmission se produit par inoculation traumatique du champignon dans la peau ex. plaie souillée par de la terre, du bois.... L'agent pathogène peut rester confiné aux tissus sous-cutanés ou derme, mais certaines souches sont capables de causer des lésions graves, pouvant affecter les muscles et les os. Là encore, l'immunodéficience est un facteur aggravant (Lupi *et al.*, 2005).

### **C) Mycoses systémiques**

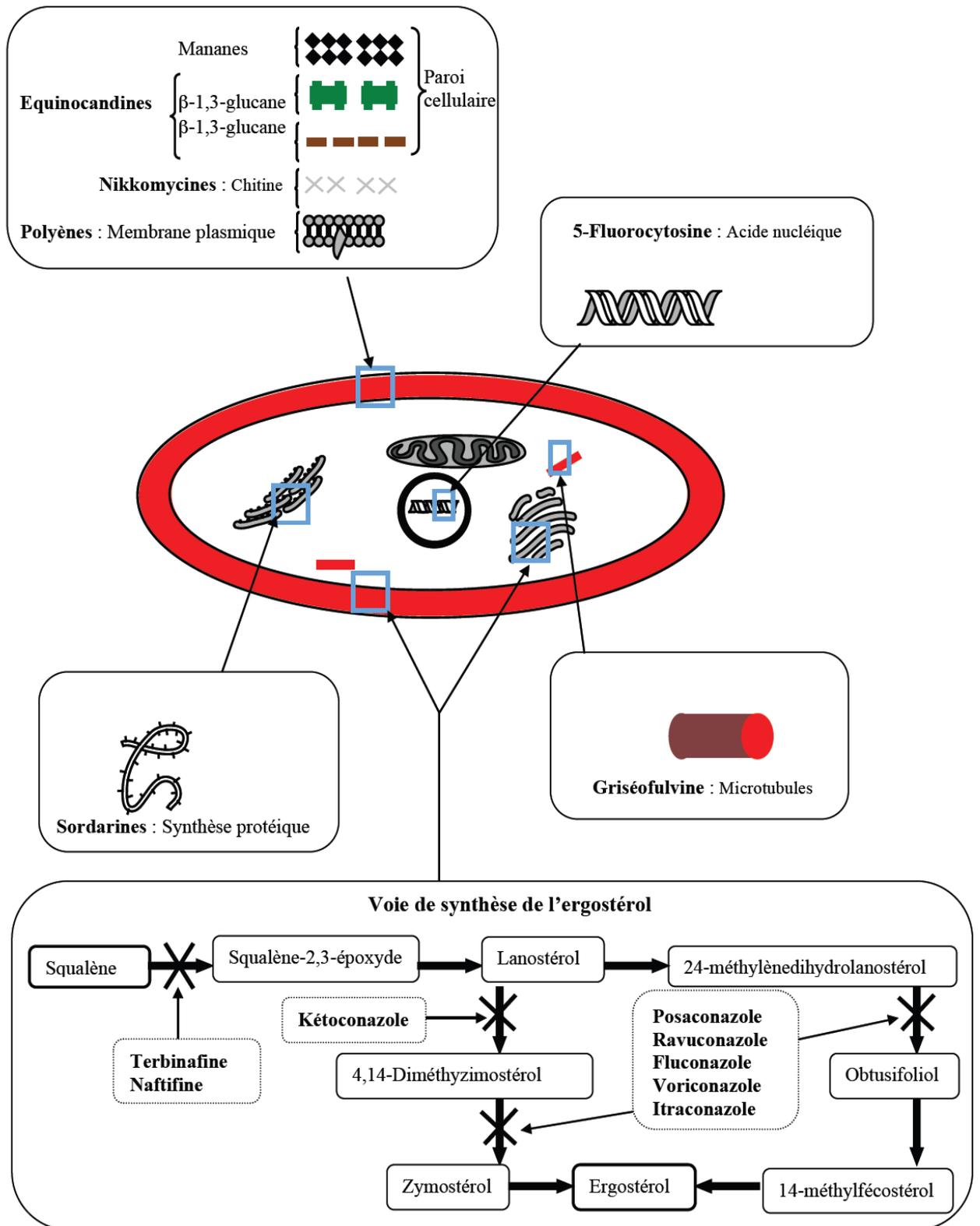
Les infections fongiques systémiques sont plus graves que les types précédents, car les champignons responsables peuvent se disséminer par les vaisseaux sanguins et lymphatiques de l'hôte, provoquant des blastomycoses, coccidioïdomycoses et histoplasmoses. L'incidence de ces infections invasives a considérablement augmenté ces dernières années, particulièrement à cause de l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés (Levinson, 2006), des patients transplantés et ceux atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Ainsi que, à cause du traitement du cancer par la chimiothérapie et

l'utilisation à long terme des antibiotiques ou des glucocorticoïdes (Pinto *et al.*, 2007; Onnis *et al.*, 2009).

Les agents pathogènes responsables des infections fongiques systémiques comprennent principalement les espèces *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus*. Cliniquement, la candidose et l'aspergillose comptent entre 80% et 90% des infections fongiques systémiques chez les patients immunodéprimés (Onnis *et al.*, 2009).

## **2.2. Antifongiques disponibles**

Les antifongiques sont des substances capables d'inhiber spécifiquement la prolifération de différents champignons isolés en mycologie médicale et responsables de lésions plus ou moins graves. Les substances antifongiques utilisées actuellement sont trois types: des molécules d'origine naturelle, des molécules semi synthétiques et des molécules synthétiques. Elles agissent sur la cellule fongique soit au niveau de l'enveloppe cellulaire, souvent en altérant son intégrité, soit au niveau du cytoplasme. Cependant, les cibles privilégiées de la majorité des molécules antifongiques disponibles (Figure 01) sont: l'acide nucléique, la synthèse protéique, les microtubules et surtout la voie de synthèse de l'ergostérol (Odds *et al.*, 2003).

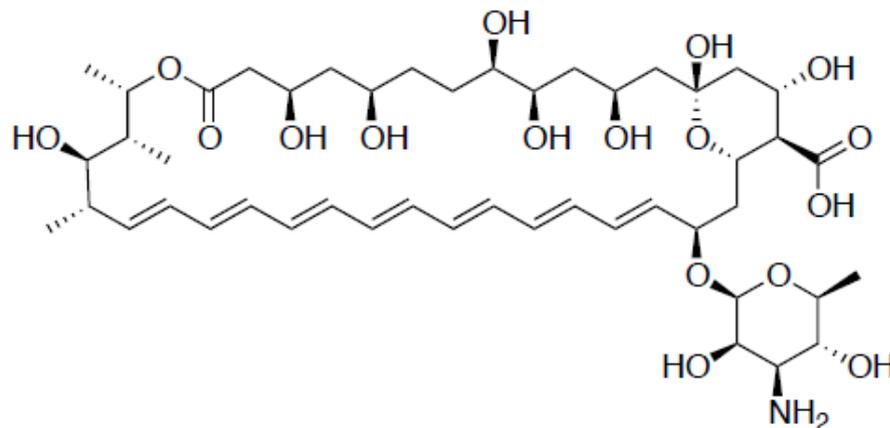


**Figure 01.** Les antifongiques et leurs mécanismes d'action sur la cellule fongique (Odds *et al.*, 2003).

### 2.2.1. Molécules antifongiques d'origine naturelle

**A) Les polyènes:** Ils sont fongicides et possèdent le plus grand spectre d'activité antifongique par rapport aux autres agents disponibles (Georgopapadakou et Walsh, 1996). Le plus connu des polyènes est l'Amphotéricine B (Fungizone), utilisé depuis 1960 comme le chef de file des antifongiques (Figure 02). Il est un produit naturel d'un actinomycète du sol, *Streptomyces nodusus* (Sylvie et Pharm 2003; Nett et Andes, 2016).

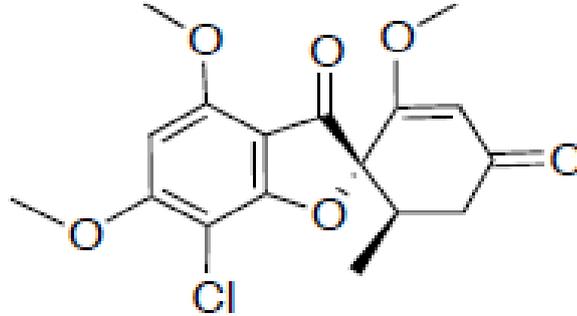
L'amphotéricine B exerce son activité par le biais des interactions hydrophobes avec l'ergostérol de la membrane cellulaire, ce qui perturbe par la suite la perméabilité de cette dernière. La formation des pores permet l'efflux de potassium, ce qui conduit à la mort cellulaire (Georgopapadakou et Walsh, 1996; Arian et Rex, 2001).



**Figure 02.** Lamphotéricine B (Fungizone)

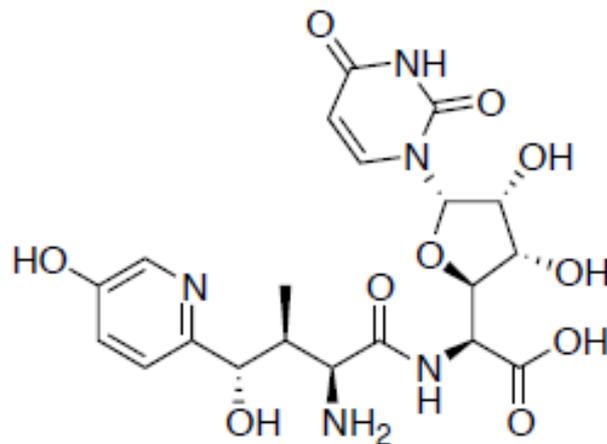
**B) Les benzofuranes:** Cette classe est composée d'une seule molécule, la griséofulvine (Figure 03), isolée en 1939 de *Penicillium griseofulvum*. Cette molécule perturbe le métabolisme intracellulaire des cellules fongiques, elle inhibe la synthèse des acides nucléiques et la fonction des microtubules. Elle affecte donc la mitose cellulaire. Son action sur la paroi fongique s'accompagne d'anomalies de développement des hyphes terminaux. De

plus elle rend les cellules kératinisées imperméables à la pénétration des dermatophytes (Develoux, 2001).



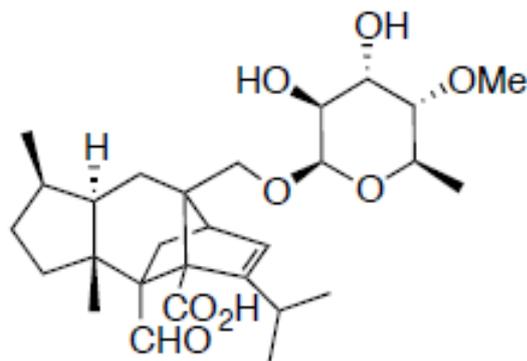
**Figure 03.** Structure de la griséofulvine.

**C) Les nikkomyces:** Ce sont des inhibiteurs compétitifs des enzymes de synthèse de la chitine fongique, isolées à partir de *Streptomyces tendra* (Vecht-Lifshitz *et al.*, 1992). La nikkomycine Z est le principal représentant de cette classe d'antifongiques (Figure 04).



**Figure 04.** Structure de la nikkomycine Z.

**D) La sordarine:** La sordarine (Figure 05) fut isolée d'une souche de *Streptomyces sp* (Hauser et Sigg, 1971). Elle inhibe une cible mise en jeu dans la production de protéines fongiques, appelée facteur 2 de translation/élongation (Dominguez et Martin, 1998).



**Figure 05.** Structure de la sordarine.

### 2.2.2. Molécules antifongiques synthétiques et semi-synthétiques

Le Tableau (02) illustre les différentes molécules antifongiques synthétiques et semi-synthétiques, leurs différents types, des exemples et leurs modes d'action.

**Tableau 02.** Différentes molécules antifongiques synthétiques et semi-synthétiques.

Type	Antifongiques	Exp	Mode d'action
Semi-synthétiques	Equinocandines	Caspofungine, Anidulafungine Micafungine	Inhibent la (1,3)-D-glucane synthétase, nécessaire à la formation des polymères de glucanes de la paroi fongique (Douglas, 2001).
Synthétiques	Allylamines	Terbinafine Naftifine	Inhibiteurs de la squalène époxydase, enzyme qui oxyde le squalène en squalène-2,3-époxyde (Odds <i>et al.</i> , 2003).
	Azoles	Fluconazole Voriconazole Posaconazole Itraconazole	Inhibent l'enzyme C14- $\alpha$ -déméthylase du cytochrome P450, responsable de la conversion du lanostérol en ergostérol (White <i>et al.</i> , 1998).
	Pyrimidines	5- Fluorocytosine	Il est converti en désoxy-nucléoside inhibant la synthèse de l'ADN (Vermees <i>et al.</i> , 2000).

### **2.3. Les plantes constituent une source précieuse d'antifongiques naturels**

La thérapie antifongique actuelle est fréquemment associée à une toxicité élevée. Cette toxicité est due principalement aux similitudes entre les champignons et les cellules de mammifères (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2010; Pierce *et al.*, 2013). Malgré la découverte de nouvelles molécules et la disponibilité de formulation pour réduire cette toxicité, la recherche de nouveaux agents antifongiques et la caractérisation de nouvelles cibles sont un besoin continu (Wiederhold et Patterson, 2015). Les agents antifongiques à rechercher maintenant sont l'idéals, ils devraient avoir un large spectre d'activité, des structures moléculaires variées et avec moins d'effets secondaires (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2006).

Les plantes peuvent répondre à cette demande du fait de leur capacité de biosynthèse engendrant une grande diversité structurale, et de la permanence de leur exposition aux attaques fongiques, particulièrement en forêt tropicale humide. Les plantes constituent une source précieuse de composés thérapeutiques potentiels: des huiles essentielles, des flavonoïdes, des alcaloïdes, des peptides, des protéines, des glycoprotéines et des tannins, qui peuvent être utilisés directement ou comme modèles pour la synthèse de nouveaux composés (Scorzoni *et al.*, 2016).

## 02. Aspect d'activité antioxydante

### 1. Stress oxydatif

Le stress oxydant a été défini par Sies en 1991 comme une perturbation dans le statut antioxydant/pro-oxydant (Halliwell, 2007). En d'autres termes, le stress oxydant se caractérise par un déséquilibre entre la production des espèces réactives (RS) et les capacités antioxydantes de l'organisme. Bien que le stress oxydant excessif peut entraîner des dommages oxydatifs, il est en soi pas nécessairement dommageable et peut être transitoire et réversible (Winterbourn, 2015).

#### 1.1. Espèces réactives (RS)

Les espèces réactives (RS) ou entités oxydantes sont souvent des radicaux libres qui sont des atomes ou groupes d'atomes ayant un ou plusieurs électrons non appariés sur leurs orbitales ultrapériphériques. Ces électrons célibataires ne sont pas compensés ce qui provoque des dérèglements dans leur champs magnétiques, rendant ainsi ces espèces très instables. Elles vont alors tenter de récupérer des électrons sur d'autres molécules comme les substrats biologiques, en les oxydant (Halliwell, 2007).

Il existe majoritairement deux grandes familles d'espèces réactives: les espèces réactives de l'oxygène ROS (Reactive Oxygen Species) et les espèces réactives d'azote RNS (Reactive Nitrogen Species) (Wu *et al.*, 2013). Il existe d'autres variétés d'entités oxydantes ou de radicaux, tel que: les espèces réactives du chlore RCS (Reactive Chlorine Species) comme l'acide hypochlorique, HOCl (Auberval, 2010), les radicaux centrés du carbone et les radicaux centrés du soufre (Wu *et al.*, 2013).

## 1.2. Deux types d'entités oxydantes (RS)

### 1.2.1. Espèces radicalaires

Elles sont soit des radicaux libres ou des métaux de transition qui acceptent des électrons uniques. Leur nature radicalaire est perdue quand ils réagissent avec une molécule non radicalaire, mais ils génèrent un substrat radicalaire et une réaction en chaîne peut ainsi être déclenchée. Les radicaux libres peuvent être désactivés par réaction avec un autre radical ou avec un centre métallique de transition (par exemple, le cuivre dans le superoxyde dismutase SOD) (Winterbourn, 2015). Physiologiquement ce groupe d'oxydants englobe le radical anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), l'oxyde nitrique ( $NO^{\cdot}$ ), le dioxyde d'azote ( $NO_2^{\cdot}$ ), et de nombreuses espèces qui peuvent être générés à partir des substrats tels que les acides gras polyinsaturés (des peroxydes lipidiques  $LOO^{\cdot}$ ), la tyrosine, le tryptophane, et les résidus de cystéine sous forme de peroxyde  $RO_2^{\cdot}$  (Tableau 04). Ces radicaux libres sont de plus en plus impliqués dans les maladies humaines (Rao *et al.*, 2011).

### 1.2.2. Espèces non radicalaires

Ce sont des espèces non radicalaires qui acceptent deux électrons pour donner des produits non radicalaires. Ils peuvent être convertis en radicaux par réaction avec un métal de transition (Winterbourn, 2015). Ils comprennent le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'acide hypochloreux ( $HOCl$ ), l'ozone ( $O_3$ ), le peroxyde nitrate ( $ONOO$ ), l'acide nitreux ( $HNO_2$ ), le trioxyde de diazote ( $N_2O_3$ ), le peroxyde lipidique ( $LOOH$ ) (Tableau 03).

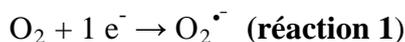
**Tableau 03.** Deux types d'entités oxydantes ou espèces réactives (RS) (Rao *et al.*, 2011).

Espèces radicalaires		Espèces non radicalaires	
Nom	Symbole	Nom	Symbole
Anion superoxyde	$O_2^{\bullet -}$	Acide hypochlorique	HOCl
Monoxyde d'azote	$NO^{\bullet}$	Oxygène singulet	$^1O_2$
Radical alkoxyde	$RO^{\bullet}$	Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$
Radical hydroxyle	$OH^{\bullet}$	Peroxyde organique	ROOH
Radical peroxyde	$ROO^{\bullet}$	Peroxynitrite	$ONOO^-$

### 1.3. Génération des RS

#### 1.3.1. Génération des ROS

La génération mitochondriale de  $l'O_2^{\bullet -}$  est la première étape dans la formation et la propagation des autres ROS dans les cellules et les tissus. Elle se déroule pendant le passage des électrons à travers la chaîne mitochondriale de transport des électrons au cours de la phosphorylation oxydative (Al-Gubory, 2014). La chaîne de transport laisse fuir une certaine proportion d'électrons qui vont réduire partiellement l'oxygène. C'est ainsi qu'environ 2 à 3 % de l'oxygène subit une réduction monovalente (addition d'un seul électron) conduisant à la formation du radical superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ) (**réaction 1**) (Tsang et Chung, 2009; Al-Gubory, 2014) :



Pour protéger les divers composants cellulaires des dommages oxydatifs par  $l'O_2^{\bullet -}$  (toxique), des enzymes telle que la SOD peuvent éliminer entièrement  $l'O_2^{\bullet -}$  ou le maintenir à un niveau de concentration basse. Cette réaction consiste à dismuter  $l'O_2^{\bullet -}$  en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (**réaction 2**) (Valko *et al.*, 2006; Al-Gubory, 2014) :



Le taux d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> issue de la réaction 2 est régulé par des enzymes telles que la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). La CAT catalyse la réaction de dismutation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en oxygène et en eau (**réaction 3**). La GPx catalyse la réaction d'oxydation du glutathion (GSH) par l'intermédiaire d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour former la glutathion oxydée (GSSG) et convertir l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O (**réaction 4**) (Tsang et Chung, 2009; Al-Gubory, 2010):



Si l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est pas converti par la CAT et la GPx, il peut générer le radical hydroxyle ou l'anion hydroxyle en présence de cations métalliques tels que le fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>). Cette réaction dite la réaction de Fenton (**réaction 5**) (Valko *et al.*, 2006; Tsang et Chung, 2009) :



### 1.3.2. Génération des RNS

Le NO<sup>•</sup> est synthétisé par voie enzymatique à partir d'un atome d'azote de l'acide aminé L-arginine et d'une molécule d'oxygène (**réaction 6**). Le NO<sup>•</sup> peut réagir avec l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et former le peroxydrite le plus réactif (ONOO<sup>-</sup>) (**réaction 7**). Ce dernier peut se transformer en dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>) et en radical OH<sup>•</sup> ou carbonate hautement réactifs (CO<sub>3</sub><sup>•-</sup>) lorsqu'il est mis à réagir avec H<sup>+</sup> ou CO<sub>2</sub> respectivement (Valko *et al.*, 2006; Tsang et Chung, 2009; Al-Gubory, 2010) :



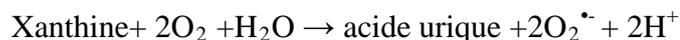
## 1.4. Sources des RS

### 1.4.1. Sources endogènes

Les sources endogènes sont intracellulaires, où les RS sont produites à partir de l'auto-oxydation ou l'inactivation de petites molécules. Les sites de génération des RS englobent tous les constituants cellulaires, y compris les mitochondries, les lysosomes, les peroxysomes, le réticulum endoplasmique, le plasma, la membrane et autres sites dans le cytosol (Machlin et Bendich, 1987).

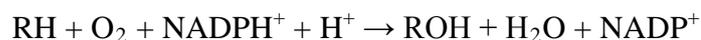
#### A) Xanthine oxydase (XO)

XO est une enzyme clé impliquée dans la formation des ROS, et elle joue un rôle majeur dans le stress oxydatif cellulaire. Cette enzyme catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et peut en outre catalyser l'oxydation de la xanthine en acide urique (O'Mahony *et al.*, 2013; Rajendran *et al.*, 2014). Elle est présente dans le sang, les cellules endothéliales et aussi dans le foie. La localisation cellulaire de la XO est essentiellement cytoplasmique. La production des ROS par la XO est faible au repos, mais elle joue un rôle important lors de l'ischémie-réperfusion (Heunks *et al.*, 1999, Bouzid *et al.*, 2014).



#### B) Cytochromes P<sub>450</sub>

Les cytochromes P<sub>450</sub> (CYP<sub>450</sub>) sont des enzymes qui catalysent l'hydroxylation de leur substrat (RH), en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons:



La majorité des CYP<sub>450</sub> sont localisés dans le réticulum endoplasmique alors que d'autres se localisent au niveau de la mitochondrie. La réaction catalysée par le CYP<sub>450</sub> peut parfois

conduire à la formation d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> lorsque l'O<sub>2</sub> subit une réduction monovalente (Zangar *et al.*, 2004).

### C) NADPH oxydase

La nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NADPH oxydase) est une enzyme membranaire qui catalyse la réduction mono-électronique de l'oxygène en utilisant le NADPH ou le NADH comme donneur d'électrons entraînant la formation des radicaux superoxydes (Bedard et Krause, 2007 ; Maghzal *et al.*, 2012):



#### 1.4.2. Sources exogènes

Les sources exogènes des radicaux libres sont la fumée de tabac, certains polluants, les solvants organiques, les produits anesthésiques et les pesticides. En dehors de ça, la transformation de certains médicaments peut générer des radicaux libres intermédiaires provoquant également des dommages oxydatifs dans les tissus cibles. Aussi, l'exposition aux rayonnements (UV) peut engendrer la formation des radicaux libres dans les tissus cibles (Rao *et al.*, 2011).

#### 1.5. Dommages oxydatifs des biomolécules

La plupart de l'oxygène absorbé par les cellules de notre corps est converti en H<sub>2</sub>O lors de la respiration mitochondriale. Cependant, moins de 5% de cet oxygène est converti en ROS. Ces substances sont hautement toxiques dans la nature et si autorisés à accumuler, ils peuvent détruire toutes les macromolécules des cellules telles que les protéines, les lipides et les molécules d'ADN nucléaire et mitochondriale, causant un stress oxydatif sévère (Rao *et al.*, 2011).

### 1.5.1. ROS et les lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés (AGPI) sont la cible privilégiée de l'attaque par les ROS en particulier le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons. Ces attaques radicalaires conduisent à la formation de produits primaires: peroxydes, radicaux libres, diènes conjugués très instables et rapidement décomposés en produits secondaires (aldéhydes, alcools, cétones) (Favier, 2003). Au niveau cellulaire, tous les composants de la cellule sont touchés et tout particulièrement les membranes plasmiques, mitochondriales et lysosomales, modifiant ainsi la fluidité des membranes et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (Miwa *et al.*, 2008; Cotticelli *et al.*, 2013). L'oxydation peut concerner aussi les lipoprotéines circulantes aboutissant à la formation de LDL (lipoprotéines de densité légère) oxydées qui, captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires (Favier, 2003; Haleng *et al.*, 2007).

### 1.5.2. ROS et les protéines

Les ROS ou les radicaux libres non éliminées ou inhibées par le système de défense antioxydante peuvent attaquer différentes biomolécules. Parmi les plus importantes étant les protéines et les peptides en raison de leur forte concentration dans le cytosol, ainsi que dans le compartiment extracellulaire. En principe, l'oxydation peut se produire partout dans la protéine, sur le squelette ainsi que sur les résidus d'acides aminés. Ces réactions impliquent l'abstraction d'hydrogène, le transfert d'électrons, l'addition, la fragmentation et le réarrangement, la dimérisation, la dismutation, et la substitution (Favier, 2003; Valko *et al.*, 2006). Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des ROS. Les plus sensibles sont les acides aminés aromatiques tels que le tryptophane (Trp), la tyrosine (Tyr) et l'histidine (His), et ceux contenant du soufre tel que la méthionine (Met) et la cystéine (Cys).

L'acide aminé le moins réactif est la glycine (Gly) (Davies *et al.*, 1999; Haleng *et al.*, 2007). Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, anti-enzyme, récepteur...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome (Durackova, 2008; Rahal *et al.*, 2014). Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des amas anormaux qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire. Ces amas, associés aux lipides, forment les dépôts de lipofuschines caractéristiques des tissus des sujets âgés (Favier, 2003; Haleng *et al.*, 2007).

### 1.5.3. ROS et l'ADN

Les ROS peuvent induire des lésions oxydatives dans le matériel génétique des cellules. Si elles n'ont pas été efficacement réparées, ces lésions se traduiront par des mutations génétiques et de leurs conséquences (Valko *et al.*, 2006). Les lésions oxydatives, peuvent impliquer l'ADN monobrin et double brin, causant des modifications de bases purines et pyrimidines, des désoxyriboses et provoquent des liens croisés dans l'ADN (Burton et Jauniaux, 2011; Charbon *et al.*, 2014). Elles peuvent conduire soit à un arrêt ou à une induction de la transcription, induction des voies de transduction de signaux, des erreurs de réplication et à l'instabilité génomique (Marnett, 2000, Cooke *et al.*, 2003). Il est rapporté que l'ADN mitochondrial est plus sensible à l'oxydation que l'ADN nucléaire à cause des points suivants: (i) dans les conditions physiologiques, les mitochondries convertent ~5% d'oxygène en anion superoxyde, puis en peroxyde d'hydrogène; (ii) la capacité de réparation de l'ADN mitochondrial est limitée, car il manque entièrement d'une fonction de réparation par excision de nucléotides; (iii) l'ADN mitochondrial n'est pas protégé par les histones (Inoue *et al.*, 2003).

## 2. Antioxydants

Le concept d'antioxydant biologique se réfère à toute substance qui, lorsqu'elle est présente à de faibles concentrations par rapport à celle d'un substrat oxydable, elle retarde ou empêche l'oxydation de ce substrat de manière significative (Halliwell et Gutteridge, 1999). Les antioxydants sont des molécules qui peuvent donner des électrons et / ou des atomes d'hydrogène aux oxydants, ainsi arrêter les réactions en chaîne et par ce fait ils vont réduire le stress oxydatif et leur paramètres de dommages cellulaires (Litescu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013; Siti *et al.*, 2015). Ils sont classés en antioxydants endogènes qui peuvent être enzymatiques et non enzymatiques et en antioxydants exogènes.

### 2.1. Antioxydants endogènes

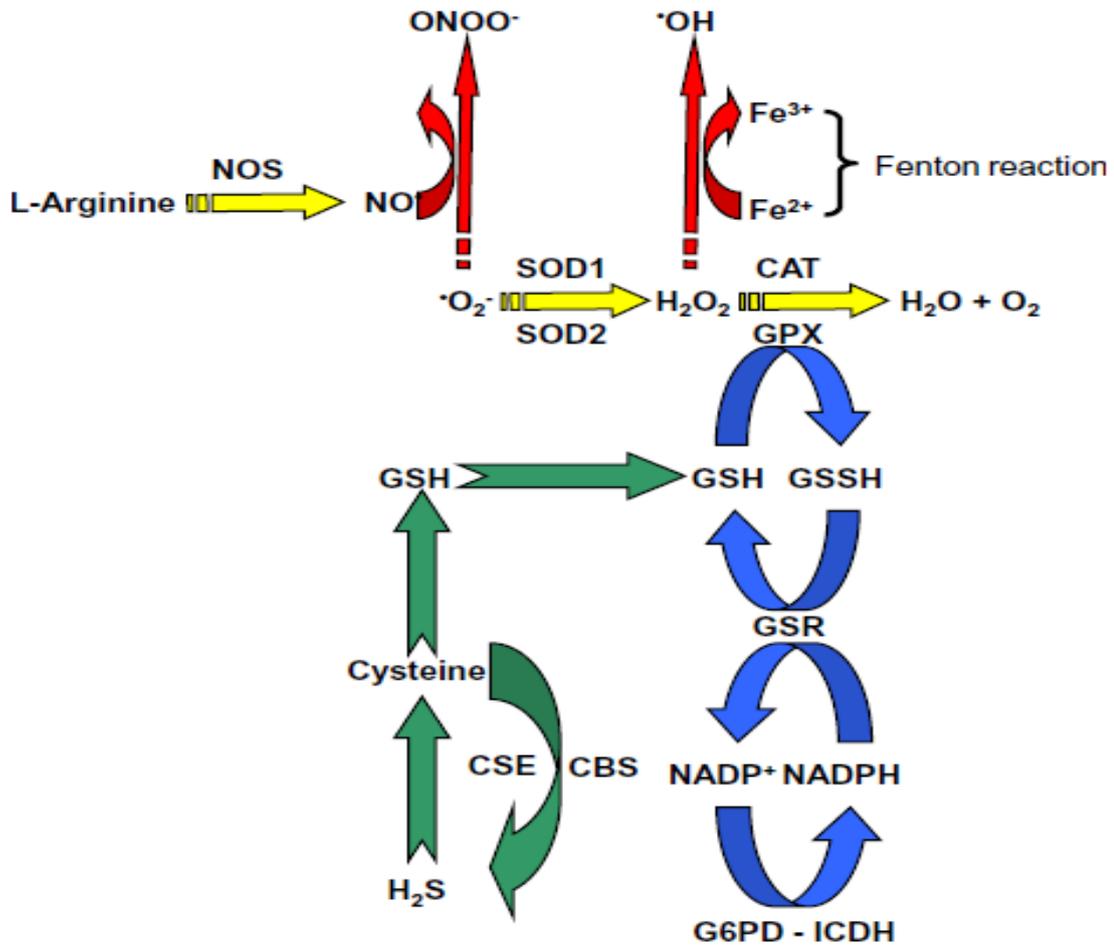
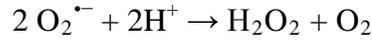
#### 2.1.1. Antioxydants endogènes enzymatiques

Les enzymes antioxydantes sont la première ligne de défense contre les entités oxydantes. Leur rôle est de diminuer la quantité des ROS présentes dans la cellule. Parfois ces enzymes nécessitent des oligo-éléments (Cu, Zn, Mn, Se, Fe) comme cofacteurs pour pouvoir exercer leur activité enzymatique (Auberval, 2010). Les enzymes principales sont les superoxydes dismutases (SOD), la catalase (CAT), les Glutathion peroxydases (GPx) et les Glutathion réductases (GSR) (Figure 06).

#### A) Superoxydes dismutases (SOD)

Les SOD constituent la première étape enzymatique dans le contrôle de la production cellulaire d' $O_2^{\bullet -}$  et donc dans la protection des cellules contre les ROS en catalysant la dismutation d' $O_2^{\bullet -}$  en  $H_2O_2$  et en  $O_2$  (Maurya *et al.*, 2016). Chez l'homme, les SOD se présentent sous trois formes à savoir SOD1 se trouve essentiellement dans le cytoplasme, SOD2 située dans les mitochondries et SOD3 qu'est extracellulaire. Cependant, la SOD2

vient dans la première ligne de protection contre le  $O_2^{\bullet-}$  produit au cours de la phosphorylation oxydative (Al-Gubory *et al.*, 2010; Maes *et al.*, 2011). La réaction de dismutation peut être représentée comme suit:

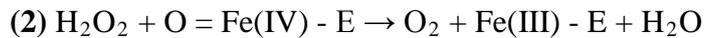
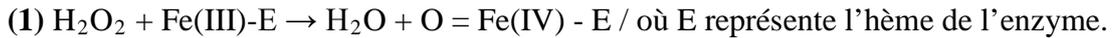


**Figure 06.** Vue d'ensemble des voies antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques impliquées dans le contrôle des RS dans les systèmes biologiques (Al-Gubory, 2014).

## B) Catalase (CAT)

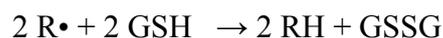
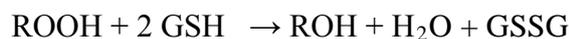
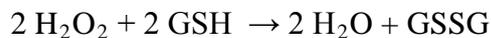
La catalase constitue la deuxième étape enzymatique qui contrôle la production du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  en catalysant la conversion de ce dernier en  $H_2O$  et  $O_2$  (Al-Gubory *et al.*, 2010). La CAT se trouve essentiellement dans les peroxysomes et dans les érythrocytes, elle est formée de quatre chaînes polypeptidiques, comportant chacune un groupe hème, ces

chaines constituent les sites actifs de la CAT. Pour catalyser la réaction, l'atome de fer du groupement hème réalise une coupure hétérolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène, ce qui crée une molécule d'eau et un groupement intermédiaire Fe(IV)=O très oxydant. Ce dernier peut ensuite oxyder une autre molécule de peroxyde d'hydrogène pour donner du dioxygène. Cette réaction est illustrée par les deux demi-équations suivantes:



### C) Glutathions peroxydases (GPx)

Les Glutathions peroxydases (GPx) constituent une famille d'enzymes divisée en deux groupes, GPx sélénium (Se)-indépendantes et GPx (Se)-dépendantes (Al-Gubory *et al.*, 2010). Elles sont présentes dans les liquides extracellulaires (sang) et dans les cellules au niveau du cytoplasme et des membranes (Auberval, 2010). Les GPx catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ), des hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools (ROH) et des espèces radicalaires en espèces non radicalaires, grâce à la présence du glutathion réduit (GSH), selon les mécanismes suivants (Auberval, 2010):



### D) Glutathion réductase (GSR)

GSR est essentiel dans le cycle redox du glutathion qui maintient la réduction de GSH à des niveaux adéquats, nécessaires pour le maintien des cellules dans un état réduit. GSR catalyse

la réduction de la forme oxydée de glutathion (GSSG) en glutathion réduit (GSH) à l'aide du cofacteur NADPH sous forme réduite (NADPH, H<sup>+</sup>) provient de l'oxydation du glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconate par la glucose-6-phosphate déshydrogénase, de la voie des pentoses phosphates (Auberval, 2010; Al-Gubory *et al.*, 2010).

### **2.1.2. Antioxydants endogènes non enzymatiques**

#### **A) Glutathion (GSH)**

Le GSH est un tripeptide formé dans le foie par la condensation de trois acides aminés, à savoir l'acide glutamique, la glycine et la cystéine; ( $\gamma$ -L-Glutamyl-cystéinyl-glycine). La synthèse de GSH est catalysée séquentiellement, par deux enzymes cytosoliques; la  $\gamma$ -glutamyl-cysteine synthétase et la GSH synthétase (Gu *et al.*, 2015; Maurya *et al.*, 2016). Le GSH est le principal antioxydant endogène produit par les cellules; participe directement à la neutralisation des ROS, et au maintien des antioxydants exogènes, tels que les vitamines C et E, sous leurs formes réduites (Rajendran *et al.*, 2014). Il est intéressant que d'autres thiols par leur pouvoir d'interagir avec l'oxyde nitrique (NO) et de le neutraliser, en même temps il fourni un mécanisme de régulation supplémentaire pour les processus liés aux ROS comme le s-nitrosylation (Uys *et al.*, 2014; Lushchak, 2014).

#### **B) Acide urique**

L'acide urique a prouvé sa capacité à éliminer les radicaux réactifs résultant des processus délétères, tels que l'auto-oxydation de l'hémoglobine et les peroxydes produits par les macrophages. C'est un piègeur efficace de l'oxygène singulet et des radicaux peroxydes et hydroxydes, ainsi il protège la membrane érythrocytaire de la peroxydation lipidique. L'acide urique peut perdre leur activité antioxydante dans les milieux lipidiques hydrophobes et

devenir un oxydant sous l'effet des lipides oxydés, des hydroperoxydes lipidiques et des ions de cuivre (Pisoschi et Pop 2015).

### **C) Bilirubine**

Au contraire du glutathion hydrosoluble qui protège essentiellement les protéines solubles dans l'eau, la bilirubine lipophile empêche la peroxydation des lipides membranaires. Malgré, les quantités de bilirubine qui sont des milliers de fois plus petites que celles du glutathion, elle peut agir efficacement, en raison du cycle de sa régénération à partir de la biliverdine, impliquant la biliverdine réductase. En présence de la biliverdine, la bilirubine s'est révélée un bon piègeur des radicaux peroxydes et a également confirmé sa capacité à diminuer l'influence mutagène des espèces oxydantes, des hydrocarbures aromatiques polycycliques et des amines hétérocycliques (Pisoschi et Pop, 2015).

### **D) Mélatonine**

La mélatonine joue un rôle important dans les processus antioxydants et neuroprotecteurs, c'est un antioxydant amphiphile capable de piéger à la fois des espèces oxygénées et azotées telles que le  $\text{OH}^{\bullet}$ , le  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ou l' $\text{ON}^{\bullet}$  (Vielma *et al.*, 2014; Arnao et Hernandez-Ruiz, 2006), et de présenter une excellente activité protectrice contre le stress oxydatif mitochondrial (Lowe *et al.*, 2013). Cette hormone et ses métabolites régularisent également les enzymes pro-oxydantes et pro-inflammatoires telles que l'oxyde nitrique synthase et la cyclooxygénase-2. Elle peut déclencher le complexe mitochondrial (I), augmentant ainsi la production d'ATP en limitant le flux d'électrons et empêchant l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (Acuna-Castroviejo *et al.*, 2003; Hardeland, 2005).

## **E) Coenzyme Q10 (CoQ10)**

Le coenzyme Q10 est un antioxydant puissant qui confère la résistance aux dommages mitochondriaux provoqués par les ROS ou RNS et qui peut supprimer la production de substances pro-inflammatoires, tel que l'expression du gène codant le facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) et la production des cytokines pro-inflammatoires (Maes *et al.*, 2011).

## **2.2. Antioxydants exogènes**

### **2.2.1. Vitamine C**

La vitamine C (acide ascorbique), est l'un des antioxydants exogènes hydrosolubles les plus répandus (Spector et Johanson, 2014). Elle est un bon scavenger des RS dans les milieux biologiques, en particulier des radicaux hydroxyles, alcoxyles et d'anions superoxydes, en formant l'acide semi-déhydroascorbique, et par conséquent, elle empêche la dégradation oxydative des biomolécules essentielles (Sung *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2012). Elle protège également les phospholipides membranaires des dommages de la peroxydation lipidique, par le piégeage des radicaux libres dans le cerveau (May, 2012; Pisoschi et Pop, 2015). L'efficacité de l'acide ascorbique comme antioxydant primaire dans le plasma, a été rapportée comme la plus grande, suivi par la bilirubine, l'acide urique, la coenzyme Q, et de la vitamine E (Pisoschi et Pop, 2015).

### **2.2.2. Vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol)**

La vitamine E est le nom commun utilisé pour toutes les molécules possédant des activités biologiques identiques à celles de la famille des tocophérols. L' $\alpha$ -tocophérol est la forme la plus active de la classe des tocophérols, sa structure moléculaire comporte une extrémité hydrophile et une extrémité hydrophobe (Singh *et al.*, 2005).

La vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) lutte contre la peroxydation lipidique des membranes cellulaires et peut arrêter la chaîne de radicaux libres en formant des dérivés de faible réactivité, incapables d'attaquer les substrats lipidiques. Ainsi, la vitamine E joue un rôle dans la préservation de la membrane contre les dommages des radicaux libres promu par les lipoprotéines de faible densité (LDL) (Pisoschi et Pop, 2015).

### **2.2.3. Caroténoïdes**

Ils sont majoritairement représentés par la  $\beta$ -carotène, appelée aussi « pro-vitamine A ». La plupart des caroténoïdes et vitamine A interagissent avec l'oxygène singlet et ainsi empêchent l'oxydation de plusieurs substrats comme les acides gras polyinsaturés (Pisoschi et Pop, 2015).

### **2.2.4. Polyphénols**

Les polyphénols sont des métabolites secondaires, d'un poids moléculaire élevé. Ils sont largement distribués dans le règne végétal (Haslam, 1993). Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation. Ils sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (tabac, pollution, infections...). Selon les chercheurs, l'effet protecteur des fruits, légumes et plantes médicinales vis-à-vis des maladies de civilisation (maladies cardiovasculaires, diabète...) serait d'ailleurs lié à la présence de polyphénols, flavonoïdes et acides phénoliques, dans ces aliments (Edeas, 2006).

### **03. Composés phénoliques (Polyphénols)**

#### **1. Définition**

Les composés phénoliques ou polyphénols constituent un large groupe de produits naturels largement distribués dans le règne végétal. Ce sont des métabolites secondaires dérivés des voies : pentoses phosphate, shikimate et phénylpropanoïdes dans les plantes (Balasundram *et al.*, 2006). Ces composés sont d'une importance physiologique et morphologique considérable chez les végétaux, ils jouent un rôle important dans leur croissance, leur reproduction, leur pigmentation et dans leur mécanisme de défense contre les rayonnements ultraviolets et les agents pathogènes (Hu et Luo, 2016).

Structurellement, les composés phénoliques comprennent un ou plusieurs cycles aromatiques, portant un ou plusieurs groupements hydroxyle (-OH), et vont de simples molécules phénoliques à des composés hautement polymérisés. La plupart des composés phénoliques d'origine naturelle sont présents sous formes conjuguées; des mono- et des polysaccharides, liés à un ou plusieurs groupes phénoliques, et peuvent également se produire sous forme de dérivés fonctionnels, tels que des esters et des esters méthyliques (Molino *et al.*, 2016).

#### **2. Classes majeures des polyphénols**

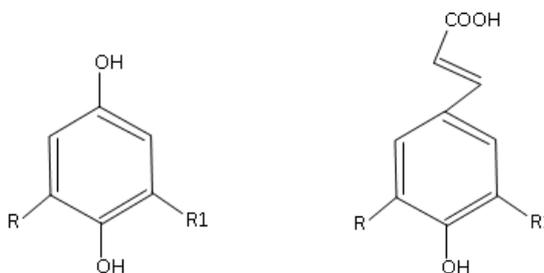
En fonction du nombre de cycles phénoliques et les propriétés structurelles de liage, les polyphénols peuvent être classés en plusieurs catégories, comme indiqué dans le tableau 04. Parmi ceux-ci, les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins sont considérés comme les principaux composés phénoliques alimentaires (Balasundram *et al.*, 2006).

**Tableau 04.** Classes des composés phénoliques des plantes (Balasundram *et al.*, 2006)

Classes phénoliques	Structure
- Composés phénoliques simples, benzoquinones	<b>C6</b>
- Acides Hydroxybenzoïques	<b>C6–C1</b>
- Acétophénonnes, acides phénylacétique	<b>C6–C2</b>
- Acides Hydroxycinnamiques, phénylpropanoïdes (coumarines, isocoumarines, chromones, chromenes)	<b>C6–C3</b>
- Naphtoquinones	<b>C6–C4</b>
- Xanthonnes	<b>C6–C1–C6</b>
- Stilbenes, anthraquinones	<b>C6–C2–C6</b>
- Flavonoïdes, isoflavonoïdes	<b>C6–C3–C6</b>
- Lignanes, néolignanes	<b>(C6–C3)2</b>
- Biflavonoïdes	<b>(C6–C3–C6)2</b>
- Lignines	<b>(C6–C3)n</b>
- Tannins Condensés (proanthocyanidines ou flavolanes)	<b>(C6–C3–C6)n</b>

## 2.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont généralement divisés en deux groupes principaux: les acides benzoïques, contenant sept atomes de carbone (C6-C1) et les acides cinnamiques, comportant neuf atomes de carbone (C6-C3) (Figure 07). Ces composés existent principalement sous forme d'acides hydroxybenzoïques et d'acides hydroxycinnamiques qui peuvent se produire soit sous leur forme libre ou conjuguée (Martins *et al.*, 2011; Garrido et Borges, 2013).

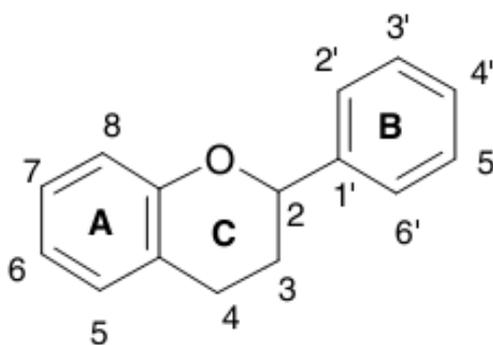


**Figure 07.** Structure chimique générale des acides hydroxybenzoïques à gauche et des acides hydroxycinnamiques à droite.

## 2.2. Flavonoïdes

### 2.2.1. Définition

Les flavonoïdes sont une classe importante de polyphénols abondamment présents dans les légumes, les fruits et différentes plantes; ils sont généralement de couleur jaune. Le chryisine a été le premier flavonoïde isolé en 1814, mais actuellement plus de 4000 flavonoïdes sont isolés et identifiés et plusieurs autres sont encore à découvrir (Du *et al.*, 2016). Les flavonoïdes sont des composés de faible poids moléculaire, constitués de quinze atomes de carbone, disposés dans une configuration en C6-C3-C6. Essentiellement, la structure se compose de deux cycles aromatiques A et B, reliés par un pont de 3-carbones, habituellement sous la forme d'un noyau hétérocyclique, C (Figure 08). Le cycle aromatique A est dérivé de la voie d'acétate / malonate, tandis que le cycle B est dérivé de phénylalanine par la voie shikimate (Balasundram *et al.*, 2006).



**Figure 08.** Structure chimique générale des flavonoïdes (Kumar et Pandey, 2013).

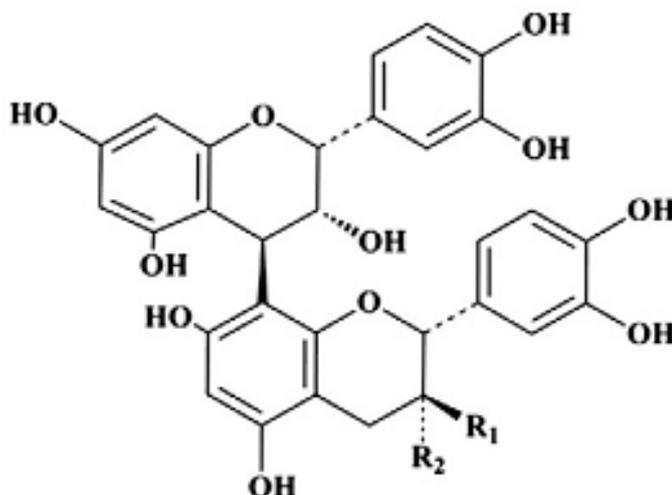
### 2.2.2. Classes majeures des flavonoïdes

Les variations des modèles de substitution dans l'anneau C donnent lieu aux classes majeures de flavonoïdes, à savoir, les flavones, flavonols, flavanols (ou catéchines), flavanones, les isoflavones et les anthocyanidines, dont les flavones et les flavonols sont les plus largement

répandues et structurellement diverses. Tandis que, les substitutions dans les cycles A et B donnent lieu à des différents composés à l'intérieur de chaque classe de flavonoïdes. Ces substitutions peuvent inclure l'oxygénation, l'alkylation, la glycosylation, l'acylation, et la sulfatation (Balasundram *et al.*, 2006; Kumar et Pandey, 2013).

### 2.3. Tannins

Les tannins sont des composés phénoliques polymérisés, de poids moléculaire élevé et présentant des propriétés astringentes, qui peuvent provoquer la précipitation des protéines. Ils peuvent être subdivisés en tanins hydrolysables et condensés. Les premiers sont des esters de l'acide gallique, tandis que les seconds (également connu sous le nom de proanthocyanidines) sont des polymères de polyhydroxyflavan-3-ol (Figure 09). Une troisième subdivision, les phlorotannins constitués entièrement de phloroglucinol, ont été isolés à partir de plusieurs genres d'algues brunes, mais ceux-ci ne sont pas significatifs dans l'alimentation humaine (Balasundram *et al.*, 2006).



**Figure 09.** Exemple d'unité structurelle de base des tanins condensés (Garrido et Borges, 2013).

### 3. Activité antioxydante des polyphénols

Les composés phénoliques ont reçus beaucoup d'attention pour leurs propriétés antioxydantes efficaces, et leurs effets bénéfiques. Ces antioxydants naturels ont la capacité d'améliorer la qualité et la stabilité des aliments et peuvent également agir comme nutraceutiques de mettre fin à des réactions en chaîne des radicaux libres dans les systèmes biologiques. Donc ils peuvent offrir des avantages supplémentaires pour la santé humaine et aider à réduire le risque de nombreuses pathologies (Zhao *et al.*, 2014).

Les mécanismes d'action antioxydante des polyphénols peuvent comprendre **(1)** la suppression de la formation des ROS, soit par inhibition des enzymes impliquées dans leur production tels que la microsomes monooxygénase, glutathion S-transférase, succinoxydase mitochondrial, NADH oxydase, etc. ou par chélation d'oligo-éléments impliqués aussi dans la génération de radicaux libres; **(2)** le piégeage des ROS; et **(3)** la surexpression ou la protection des systèmes de défenses antioxydantes (Kumar et Pandey, 2013).

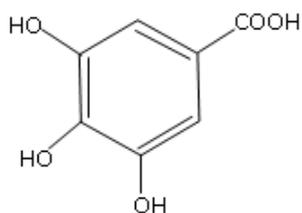
#### 3.1. Relation structure-activité antioxydante des polyphénols (SAR)

L'activité antioxydante des composés phénoliques est due principalement à leur capacité à piéger les radicaux libres, à donner des atomes d'hydrogène ou des électrons, ou à chélater des cations métalliques. Cette activité est déterminée essentiellement par la structure des composés phénoliques, ce qui est appelé des relations structure-activité (Structure-Activity Relationships (SAR)) (Balasundram *et al.*, 2006; Kumar et Pandey, 2013).

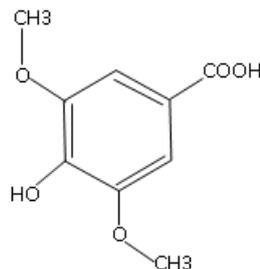
##### 3.1.1. SAR des acides phénoliques

Dans le cas des **acides phénoliques**, l'activité antioxydante dépend du nombre et des positions des groupements hydroxyle (-OH) reliés au groupe fonctionnel carboxylique.

- L'activité antioxydante augmente avec l'augmentation du degré d'hydroxylation, comme dans le cas de l'acide gallique tri-hydroxylé, qui montre une forte activité antioxydante. Alors que, la substitution des groupes hydroxyle en position 3 et 5 par des groupes méthoxyl (-OCH<sub>3</sub>) comme dans le cas de l'acide syringique, réduit l'activité (Rice-Evans *et al.*, 1995).

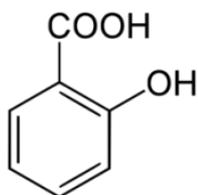


acide gallique

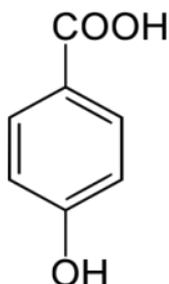


acide syringique

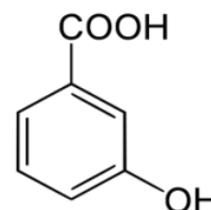
- Les acides mono-hydroxybenzoïques avec le groupement -OH en position ortho- ou para- de la fonction -COOH ne présentent aucune activité antioxydante, mais la même chose n'est pas vrai pour l'acide *mé*ta-hydroxybenzoïque qui est actif (Rice-Evans *et al.*, 1995).



a. *ortho*-hydroxybenzoïque



a. *para*-hydroxybenzoïque



a. *mé*ta-hydroxybenzoïque

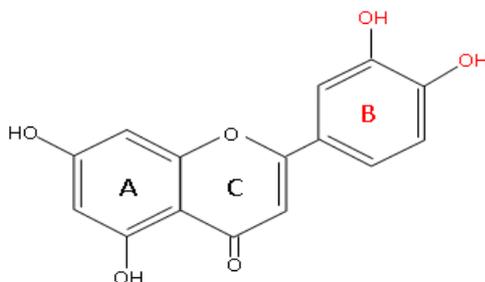
- Les acides hydroxycinnamiques présentent une activité antioxydante plus élevée par rapport aux acides hydroxybenzoïques correspondants. L'activité plus élevée des premiers pourrait être due au groupe CH=CH-COOH, qui assure une plus grande

capacité de donner l'hydrogène (H) et la stabilisation radicalaire par rapport au groupe -COOH dans les acides hydroxybenzoïques (Figure 01) (Rice-Evans *et al.*, 1995).

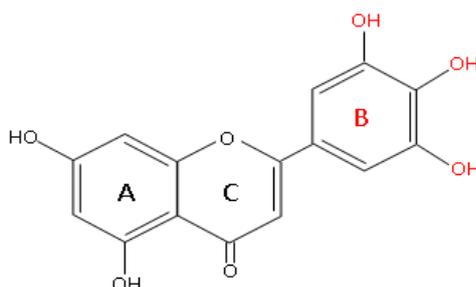
### 3.1.2. SAR des Flavonoïdes

L'activité antioxydante des flavonoïdes dépend fortement de la disposition des groupements fonctionnels sur la structure nucléaire. Cependant, la configuration, la substitution, et le nombre total de groupes hydroxyle influent considérablement sur plusieurs mécanismes d'action antioxydante des flavonoïdes tels que le piégeage des radicaux libres et la chélation des ions métalliques. Parmi les cas principaux de la relation structure-activité des flavonoïdes, on peut citer les suivants (Balasundram *et al.*, 2006; Kumar et Pandey, 2013) :

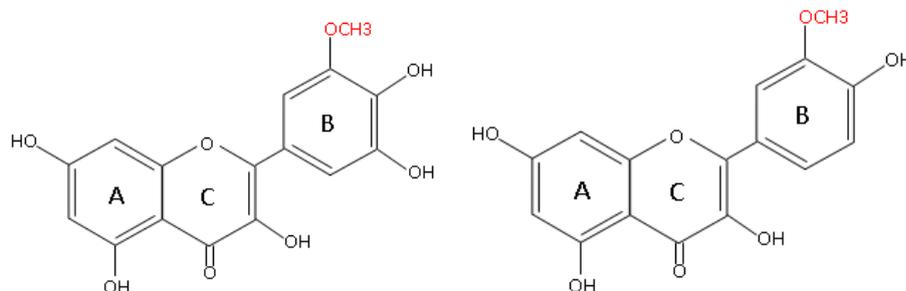
(I) La structure ortho-dihydroxylée (groupe catéchol) du noyau B, entraîne une activité plus élevée car elle confère une plus grande stabilité au radical aroxyyl par délocalisation d'électrons, ou agit en tant que site de liaison pratique pour les métaux de trace (Pietta, 2000).



(II) La présence de groupes hydroxyle (-OH) en positions 3', 4' et 5' du cycle B (un groupe pyrogallol) a été rapportée pour améliorer l'activité antioxydante des flavonoïdes par rapport à ceux qui ont un seul groupe hydroxyle (Pietta, 2000).

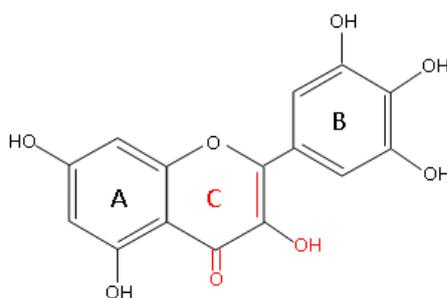


(III) Le remplacement des groupes hydroxyle (-OH) dans le noyau B par des groupes méthoxyl (-OCH<sub>3</sub>) altère le potentiel d'oxydo-réduction, ce qui diminue la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres (Pietta, 2000; Seeram et Nair, 2002).



(VI) La double liaison entre C-2 et C-3, conjugué avec la fonction 4-oxo dans l'anneau C améliore la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres (Pietta, 2000).

(V) La double liaison entre C-2 et C-3, combiné avec une fonction 3-OH, dans l'anneau C, améliore aussi la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux actifs, comme dans le cas de kaempférol. La substitution de 3-OH conduit à l'augmentation de l'angle de torsion et la perte de coplanarité et la diminution de l'activité antioxydante par la suite (Seeram et Nair, 2002).



#### 4. Activité antimicrobienne des polyphénols

Les polyphénols, des flavonoïdes, des acides phénoliques et des tannins ont reçu plus d'attention en raison de leurs activités antimicrobiennes (Tableau 05). La plupart de ces composés sont capables de supprimer un certain nombre de facteurs de virulence microbiens comme l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhérence ligands-hôte, et la

neutralisation des toxines bactériennes et montrent un synergisme avec des antibiotiques (Daglia, 2012). Ces propriétés ont été utilisées soit pour développer de nouveaux agents de conservation des aliments à la place des conservateurs synthétiques, ou de développer des thérapies innovantes pour le traitement des maladies infectieuses, compte tenu de l'augmentation de la résistance microbienne aux antibiotiques conventionnels.

Guil-Guerrero *et al.* (2016), ont rapporté que l'activité antimicrobienne des acides phénoliques est due principalement à la diffusion des acides non dissociés à travers la membrane, conduisant à l'acidification du cytoplasme et, dans certains cas, à la mort cellulaire et que les facteurs liés au caractère lipophile tels que le pH, les substitutions cycliques (groupes hydroxyl et méthoxyl), et la saturation de la chaîne latérale sont déterminantes pour l'activité de ces composés.

L'activité des flavonoïdes est considérée comme étant due à leur capacité de former des complexes avec les protéines extracellulaires solubles, ainsi que avec les parois cellulaires bactériennes, bien que les flavonoïdes hauts lipophiles puissent perturber les membranes microbiennes (Guil-Guerrero *et al.*, 2016).

En ce qui concerne les tannins, l'activité antimicrobienne des tanins hydrolysables est bien connue, ils sont capables de précipiter des protéines et / ou supprimer des cofacteurs métalliques à travers leur forte affinité pour les ions métalliques, agissant comme une barrière microbienne (Yamaguchi *et al.*, 2011; Daglia, 2012). Les effets antimicrobiens des tannins condensés, ont été expliqués par plusieurs mécanismes, telle que la déstabilisation de la membrane cytoplasmique, la perméabilisation de la membrane cellulaire, l'inhibition des enzymes microbiennes extracellulaires, des actions directes sur le métabolisme microbien, la privation des substrats nécessaires à la croissance microbienne, en particulier les micronutriments minéraux essentiels tels que le fer et le zinc (par la chélation des métaux),

dont l'épuisement peut sérieusement limiter la croissance bactérienne (Daglia, 2012; Guerrero *et al.*, 2016).

**Tableau 05.** Activités antimicrobiennes des principaux polyphénols et les germes sensibles (Daglia, 2012).

Polyphénols	Activités	Germes sensibles
Flavonoïdes - Flavan-3-ol - Flavonol	- Antibactérienne	- <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Clostridium perfringes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>P. oralis</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>P. melaninogenica</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>K. pneumonia</i> .
	- Antivirale	- Adenovirus, Enterovirus, Flu virus
	- Antifongique	- <i>Candida albicans</i> , <i>Microsporium gypseum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> .
Acides phénoliques	- Antibactérienne	- <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> .
Tannins Condensés	- Antibactérienne - Antivirale	- <i>S. mutans</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> - Virus Influenza A, virus herpes simplex type -1 (HSV)
Tannins Hydrolysables	- Antibactérienne	- <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Helicobacter</i> , <i>E. coli</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Lysteria</i> .
	- Antivirale	- Epstein-Barr virus, Herpes virus HSV -1 et HSV -2
	- Antifongique	- <i>C. parapsilosis</i> .

## 04. Plantes médicinales

### 1. *Salvia verbenaca* Linn de la famille Lamiaceae

Le nom *Salvia* est dérivé du latin *salvare* qui signifie «guérir ou être sûr et indemne» en se référant aux propriétés médicales de certaines espèces (Blumenthal, 2000). Ce genre englobe environ 900 espèces, répandues dans le monde entier et comprend plusieurs espèces ornementales, culinaires et médicinales parmi eux *Salvia verbenaca* L. (Kamatou *et al.*, 2008).

*S. verbenaca* est une plante herbacée vivace qui peut agrandir jusqu'à 80 cm d'hauteur, mais habituellement moins de 50 cm. Il s'appelle en Français sauge-verveine, sauge à feuilles de verveine ou sauge fausse verveine, en Anglais *verbena sage*, *vervain sage* ou *wild clary*. En Algérie et exactement dans la Wilaya de Bordj Bou Arriridj il s'appelle *Mou Lemdhamed*. Alors que, en Tunisie et en Maroc il est nommé *Al-khyyata* ou *khiyyata* (Ben Farhat *et al.*, 2013 ; Khlifi *et al.*, 2006).

#### 1.1. Classification taxonomique (Judd *et al.*, 2002)

Royaume	: Plantes
Sous royaume	: Tracheobiontes
Embranchement	: Spermatophytes
Division	: Magnoliophytes
Classe	: Magnoliopsides
Sous classe	: Asteridae
Ordre	: Lamiales
Famille	: Lamiaceae
Genre	: <i>Salvia</i>
Espèce	: <i>Salvia verbenaca</i> Linn

## 1.2. Description de la plante (*S. verbenaca*)

- **Tiges et feuilles:** Les tiges sont quadrangulaires et poilues modérément à densément. Les feuilles sont portées par paires le long des tiges et sont de forme assez variable (Figure 10). Elles vont de la forme elliptique à la forme ovale avec des contours dentelés (crénelées), lobés ou profondément divisées (pinnatisées ou pinnatisectes). Les feuilles inférieures (2.5 à 10 cm de long et 1.5 à 8 cm de large) sont portées sur des pétioles de 1 à 10 cm de long et dotées de pointes pointues ou parfois arrondies, tandis que les feuilles supérieures sont plus petites et stalkless (sessiles). Les feuilles sont également un peu velu (pubescent) avec une texture superficielle de grêle (DEEDI, 2016).

- **Fleurs :** sont tubulaires de 7 à 13 mm de long, portées dans des grappes allongées au bout des branches ou les racèmes terminales. Elles sont disposées en verticilles de 6 à 10 au-dessus de bractées de petites feuilles. Chaque fleur est stalkless (sessile) ou portée sur un pédicelle très court jusqu'à 2 mm de long. Ces fleurs ont cinq sépales violacés ou verts (de 3.5 à 9 mm de long) moyennement velus. Les sépales sont fusionnés ensemble dans un tube finement nervuré (tube de calice) qui a un large lobe supérieur à trois dents (la lèvre supérieure) et un lobe inférieur à deux dents plus étroit (la lèvre inférieure). Les pétales principalement sans poils sont également fusionnés ensemble à la base dans un tube (le tube de la corolle). Ils sont bleus, violets, roses ou de couleur lilas et se séparent également en deux lobes (lèvre supérieure et inférieure). La lèvre supérieure est encapuchonnée, tandis que la lèvre inférieure est à trois lobes. Chaque fleur a également deux étamines et un ovaire surmonté d'un style et inégalement stigmatisé à deux lobules. La floraison se produit tout au long de l'année (DEEDI, 2016).

- **Fruits** : (le schizocarpe) se divise en quatre segments d'une seule graine (des mericarpes ou des nutlets) à maturité. Ces «graines» brunes (2-3 mm de long et 1.8-2 mm de large) sont largement ovales (largement ovoïdes) et de texture lisse (DEEDI, 2016).

- **La racine** est longue, fibreuse, et pousse une ou deux tiges grêles, un peu velues, presque simples, et hautes de 50 cm. Les feuilles sont pétiolées, oblongues, assez glabres, veinées en dessous, obtuses à leur sommet, fortement crénelées en leur bord, et même un peu sinuées à leur base ; elles sont presque pinnatifides dans la variété /2 : les fleurs sont fort petites, à peine pédonculées, et forment un épi très-menu ; elles sont d'une couleur bleue (Figure 10), et leurs verticilles sont un peu écartés. Cette plante croît dans les prés secs et montagneux (DEEDI, 2016).



**Figure 10:** Aspect morphologique de *Salvia verbenaca*.

### 1.3. Composition en polyphénols

Selon Ben Farhat *et al.*, (2013), la détermination qualitative et quantitative des polyphénols dans l'extrait méthanolique de *S. verbenaca* évaluée par RP-HPLC couplée à un détecteur UV multi-longueurs d'onde a révélé un profil chimique composé de 18 composés phénoliques individuels. Ces composés ont été répartis dans trois classes: **1)** sous forme d'acides phénoliques (acide p-hydroxybenzoïque, acide vanillique, acide caféique, acide p-coumarique, acide férulique et acide rosmarinique), **2)** des diterpènes phénoliques (acide

carnosique, carnosol, méthylcarnosate ) et **3**) sous forme de Flavonoïdes: Flavanones (naringénine, naringine), flavones (lutéoline, cirsiol, apigénine, cirsilinoléol, genkwanine) et flavone glycosides (apigénine-7-glucoside).

#### **1.4. Utilisation thérapeutique**

Le genre *Salvia* a été utilisé dans la médecine traditionnelle de la Chine, l'Afrique du Sud et de nombreux autres pays contre diverses maladies infectieuses et inflammatoires, le paludisme, les gonflements durs, les abcès, les tumeurs et le cancer (Khosravi Dehaghi *et al.*, 2014). Il est rapporté aussi que les espèces *Salvia* ont des effets contre diverses maladies telles que les troubles respiratoires et gastro-intestinaux, l'hépatite, les maladies cardiovasculaires, la perte de mémoire, les troubles menstruels, les fausses couches et l'insomnie (Khosravi Dehaghi *et al.*, 2014). En médecine traditionnelle d'Afrique du Nord, le genre *Salvia* est l'un des remèdes de plantes les plus populaires. Cependant, la décoction de la partie aérienne était utilisée comme cholagogue, antiseptique, diurétique et astringent (Khlifi *et al.*, 2006). Beaucoup d'espèces de *Salvia* sont utilisées comme tisanes et arômes alimentaires, ainsi que dans les cosmétiques, la parfumerie et l'industrie pharmaceutique (Taarit *et al.*, 2010).

En ce qui concerne *S. verbenaca*, dans les environs de la wilaya de Bordj Bou Arridj en Algérie ainsi que en Tunisie et en Maroc, les feuilles fraîches hachées sont appliquées, en cataplasme, sur les plaies et les abcès vidés pour faciliter leur cicatrisation (Khlifi *et al.*, 2006; Lahsissene *et al.*, 2009). Il est mentionné aussi dans le catalogue des plantes aromatiques et médicinales du Haut Atlas Oriental, que le décocté des feuilles de *S. verbenaca*, est consommé pour traiter les spasmes, les coliques, l'anxiété et que la tisane des feuilles peut être utilisée pour traiter la frigidité, grippe, pharyngite, Angines.

## **2. *Lepidium sativum* Linn de la famille Brassicaceae**

*Lepidium sativum* Linn. (*L. sativum*) est une précieuse plante à des feuilles comestibles, un proche parent des plantes du genre Brassica (moutarde, colza et chou), représentants de la famille Brassicaceae (anciennement Cruciferae). Il a un goût caractéristique, chaud (piquant), et un arôme proche du poivre noir. Ses précieuses propriétés nutritionnelles ne sont conservées que pendant une courte période dans la phase des jeunes pousses (Michalczyk *et al.*, 2011).

Dans certaines régions, *L. sativum* est connu sous le nom, de cresson de jardin (Garden Cress), cresson de poivre de jardin, herbe poivrée, poivre de mouton ou poivre de l'homme pauvre (Prajapati *et al.*, 2014). Il est également connu dans les pays arabes sous le nom, de Rashad (Al-Yahya *et al.*, 1994), ELRshad (Abuelgasim *et al.*, 2008) ou Hab-Rchad (Chatoui *et al.*, 2016) et comme Asaliyo ou Chandrasoor dans les langues locales en Inde (Prajapati *et al.*, 2014).

### **2.1. Origine et répartition géographique du *L. sativum***

L'origine exacte de *L. sativum* est inconnue, mais on pense qu'il provient principalement de la région montagneuse de l'Éthiopie et de l'Érythrée, tandis que le sud-ouest de l'Asie et l'Europe occidentale sont considérées comme des centres secondaires d'origine. La culture de cresson était déjà connue de l'antiquité en Grèce et en Italie et peut-être aussi en Égypte. Il a été consommé en Perse avant même que le pain ait été connu. Actuellement, *L. sativum* ou le cresson est cultivé dans le monde entier, y compris la plupart des pays africains, l'Amérique du Nord et certaines parties de l'Europe. En Inde, il est cultivé presque tout au long couvrant différentes zones agro-climatiques (Prasad *et al.*, 2012, Wadhwa *et al.*, 2012).

*L. sativum* peut être cultivé à toutes les altitudes, tout au long de l'année, mais la meilleure récolte est obtenue en hiver. Il a besoin de ressources agricoles minimales, il pousse bien dans les régions semi-arides et ne nécessite pas beaucoup d'engrais, ses graines peuvent être récoltées en 70 - 90 jours pour donner 800 - 1000 kg / ha (Diwakar *et al.*, 2008).

## 2.2. Classification taxonomique du *L. sativum* (Raval, 2016)

Règne :	Plantae	plantes
Sous-règne :	Tracheobionta	Plantes vasculaires
Superdivision :	Spermatophyta	Spermatophytes
Division :	Magnoliophyta	Angiospermes
Classe :	Magnoliopsida	Dicotyledones
Sous Classe :	Dilleniidae	
Ordre :	Capparales	
Famille :	Brassicaceae	Famille de moutarde
Genre :	<i>Lepidium</i>	Herbes poivrées
Espèce :	<i>Lepidium Sativum</i> Linn	Cresson de jardin

## 2.3. Description de la plante (*L. sativum*)

*L. sativum* est une plante herbacée, dressée, de couleur plus ou moins glauque. Sa tige est glabre, finement striée, profusément ramifiée et pousse jusqu'à 50 - 80 cm d'hauteur (Wadhwa *et al.*, 2012).

- **Les feuilles** de *L. sativum* (Figure 11), sont alternes, irrégulièrement pinnées, d'environ 12 cm de long et 9 cm de large, avec des pétioles jusqu'à 4 cm de long; des Folioles (5 - 11), en forme ovale ou obovale, pinnatisect, les lobes ultimes généralement irrégulièrement dentés, faiblement poilus au-dessus, glabres en dessous, feuillets de feuilles supérieures devenant peu à peu linéaires. Les feuilles supérieures sont généralement simples et linéaires, parfois lobées ou avec dents. Les feuilles basales ont de longs pétioles et une lyreate Pinnatipartite; Les feuilles culinaires sont lancéolées (Prajapati *et al.*, 2014).

- **Les fleurs** (Figure 11) sont bisexuelles, régulières et tétramères: Pédicelle 1.5 - 4.5 mm de long, ascendant; 4 Sépales ovales, 1 - 2 mm de long ; 4 Pétales spatulés à griffe courte, jusqu'à 3 mm de long, blanc ou rose pâle; 6 Étamines, anthères habituellement violacées; Ovaires supérieurs, aplatis, aigus emarginés, style jusqu'à 0,5 mm de long, stigma capitate (Prajapati *et al.*, 2014).

- **Le fruit** est une silique aplatie, ronde ou ovale, de 4-6 mm × 3-5,5 mm, de couleur vert pâle à jaunâtre, de marges en forme d'ailes, déhiscent par 2 valves, habituellement avec 2-semées ou graines (Prajapati *et al.*, 2014).

- **Les graines** de *L. sativum* sont petites, ovales, pointues et triangulaires à une extrémité, lisses, d'environ 3-4 mm de long, 1-2 mm de large, de couleur brun rougeâtre (Figure 11). Un sillon présent sur les deux surfaces s'étendant jusqu'à deux tiers vers le bas et une légère aile comme extension présente sur les deux bords de la graine. En trempant dans l'eau la graine se gonfle et se recouvre d'un manteau transparent, incolore, mucilage avec goût mucilagineux (Prajapati *et al.*, 2014).



**Figure 11.** Aspect morphologique de *L. Sativum*

#### 2.4. Composition phytochimique

Des études phytochimiques sur les graines de *L. sativum*, ont révélé la présence d'alcaloïdes, de glycosides, de stérols, de carotène, d'huile volatile et d'huile fixe.

- Schultz et Gmelin (1952), ont isolé l'acide sinapique et la sinapine à partir de l'extrait méthanolique dégraissé des graines de *L. sativum*.
- Maier *et al.* (1998), ont identifié sept alcaloïdes imidazoles: Lepidine B, C, D, E et F (dimères) et deux nouveaux alcaloïdes monomères semilepidinosides A et B, dans les graines de *L. sativum*.
- Radwan *et al.* (2007), ont étudié les glucosinolates des graines de *L. sativum*. Ils ont signalé la présence de glucotropaeoline et de 2- phényléthyl glucosinolate également appelé gluconasturiine.
- L'extraction d'huile fixe des graines de *L. sativum* avec de l'éther de pétrole, a donné un taux de 25.5%. Cette huile a été de couleur brune jaunâtre et contenant des acides gras saturés et non saturés, tels que l'acide palmitique (1.27 %), stéarique (6.01 %), arachidique (1.54 %), béhénique (1.73 %), lignocérique (0.2 %), oléique (61.25 %) et linoléique (28.0 %). La matière insaponifiable est rapportée comme contenant du  $\beta$ -sitostérol et de l' $\alpha$ -tocophérol (Mali *et al.*, 2007).
- Nayak *et al.* (2009) ont identifié et quantifié l'acide sinapique à partir de l'extrait méthanolique des graines de *L. sativum* par chromatographie en couche mince haute performance (HPLC). L'acide sinapique a été séparé sur une couche mince de gel de silice et déterminé par HPLC-photo densitomètre et a rapporté environ 0.47 % d'acides sinapiques dans les graines de *L. sativum*.
- Zia-Ul-Haq *et al.* (2012) ont identifié des composés phénoliques dans les graines de *L. sativum* sur la base de leurs masses spectrales caractéristiques. La plupart de ces composés ont été des acides phénoliques à savoir, l'acide gallique, l'acide protocatechuique, l'acide coumarique, l'acide caféique, l'acide coumarique hexoside, l'acide caféique hexoside, l'acide ferulique hexoside, l'acide vanillique hexoside, l'acide caffeoylquinique et enfin l'acide

coumaroylquinique. Les autres composés ont été, la quercétine, quercétine hexoside, kaempferol et kaempferol-glucuronide.

## 2.5. Utilisation thérapeutique

Au 8<sup>ème</sup> siècle un docteur célèbre Hebn AL-Bautas a étudié les usages médicaux de *L. sativum* en détail et il a trouvé que cette plante augmente la faim et se débarrasser des vers de l'estomac (Wadhwa *et al.*, 2012). Récemment, on a trouvé que chaque partie de *L. sativum* est utilisée pour divers traitements des maladies: Les graines sont appliquées dans une large gamme de fonctions biologiques et de maladies telles que la lèpre, les maladies de la peau et comme diurétique. Les racines sont utilisées dans le traitement de la syphilis secondaire et du ténésme. Les feuilles constituent un remède antibactérien et un traitement du scorbut et de l'hépatopathie (Karazhiyan *et al.*, 2011).

- Une étude récente des différentes régions d'Arabie saoudite a montré que les graines de *L. sativum* sont couramment utilisées comme fébrifuge, anti-rhumatismales, diurétiques et pour soulager les douleurs menstruelles et abdominales. Elles sont également utilisées pour le traitement et la guérison rapide des fractures osseuses (Al-Yahya *et al.*, 1994).

- En Asie du Sud, les graines de *L. sativum* sont utilisées comme médicament traditionnel pour traiter la bronchite, l'asthme et la toux. Elles sont considérées comme un remède abortif, diurétique, expectorant, antibactérien, stimulant gastro-intestinal, gastro-protecteur, laxatif et stomacal. Elles sont appliquées aussi pour soulager la douleur et l'enflure des articulations rhumatismales, dans le hoquet, la dysenterie, la diarrhée et les maladies cutanées causées par les impuretés du sang. Les bonbons traditionnels pour les mères allaitantes sont préparés à partir des graines de *L. sativum* (Doke et Guha, 2014).

- En Inde, la plante est considérée comme un remède contre l'asthme, la dysenterie, les saignements de piles et comme diurétique (Al-Yahya *et al.*, 1994).

- En Chine et dans d'autres pays d'Orient Extrême, les graines sont utilisées pour le traitement des coliques abdominales, de l'asthme, de la pleurésie et de l'hydropisie (Al-Yahya *et al.*, 1994).
  
- *L. sativum* est considérée comme l'une des meilleures plantes médicinales de divers pays africains où les graines sont mâchées pour guérir les maladies de la gorge, l'asthme, les maux de tête et sont utiles pour la diurèse et les troubles menstruels (Kloos, 1976).
  
- Hartwell (1982) a signalé que les graines de *L. sativum* étaient un remède contre les tumeurs utérines, les polypes nasaux et le cancer du sein.

## 01. Matériel et méthodes

### 1. Matériel

#### 1.1. Plantes médicinales

- ***Salvia verbenaca* L (Mou Lemdhamed):** La récolte a été effectuée le mois de Mai 2011 dans la commune de Ouled sidi Amor (Longitude: 4.9032°, Latitude : 36.0137°) wilaya de Bordj Bou Arreridj. La plante a été identifiée par Pr. Oudjih Bachir, département de l'agronomie, faculté des sciences, université Elhadj Lakhdar, Batna.

- ***Lepidium sativum* L (Habb Errached):** Les graines de *L. sativum*, ont été achetées à partir d'une exposition consacrée aux plantes médicinales à la wilaya de Constantine en 2012.

#### 1.2. Souches microbiennes

- **Souches bactériennes:** Les extraits de *S. verbenaca* et de *L. sativum* ont été testés contre 10 bactéries à Gram-négatif: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*P. aeruginosa*), *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli* A), *Escherichia coli* (*E. coli* B), *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 (*S. typhimurium*), *Salmonella enterica* ATCC 43972 (*S. enterica*), *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 (*A. baumannii*), *Citrobacter freundii* ATCC 8090 (*C. freundii*), *Proteus mirabilis* ATCC 35659 (*P. mirabilis*), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (*K. pneumoniae* A) et *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae* B) et contre 07 bactéries à Gram-positif: *Bacillus cereus* ATCC 10876 (*B. cereus*), *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 (*E. faecalis*), *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 (*L. monocytogenes*), *Listeria innocua* CLIP 74915 (*L. innocua*), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*S. aureus* A), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* B) et *Staphylococcus aureus* résistante à la méticiline (SARM). Ces souches bactériennes proviennent du laboratoire des substances naturelles

de l'Université de Tlemcen. Elles sont conservées dans le milieu MHB (Muller Hinton Broth) additionné de 10 % (v/v) de glycérol à -20 °C.

• **Champignons:** *Aspergillus flavus* NRRL 391 (*A. flavus*), *Aspergillus niger* 2CA 936 (*A. niger*), *Penicillium sp*, *Fusarium sp* et la levure *Candida albicans* ATCC 1024 (*C. albicans*). Ces champignons proviennent du laboratoire de Microbiologie appliquée de l'Université de Sétif1.

### 1.3. Animaux

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des souris mâles, Swiss albinos dont le poids varie entre 25 et 30 g, procurés aux prés de l'Institut Pasteur d'Alger. Ces souris sont utilisées après une période d'adaptation de 7 jours, elles ont eu accès libre à l'eau et à la nourriture standard fourni par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) de Bejaia.

### 1.4. Réactifs chimiques et matériel instrumental

Tous les produits utilisés proviennent de Sigma, Fluka et Prolabo.

Parmi l'appareillage utilisé: Rotavapeur (BÜCHI), Centrifugeuse 3-K30 (Sigma), 1601 Shimadzu Spectrophotomètre, Spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau (Techcomp) et Lecteur de microplaque (BioTek).

## 2. Extraction et dosage des polyphénols et des flavonoïdes

### 2.1. Préparation de l'extrait hydro-méthanolique (EHM)

L'extraction des composés phénoliques de la partie aérienne de *S. verbenaca* et des graines de *L. sativum*, est réalisée suivant la méthode de Markham (1982). Brièvement, 100 g de la matière sèche broyée de chaque plante sont mis à une extraction dans un mélange

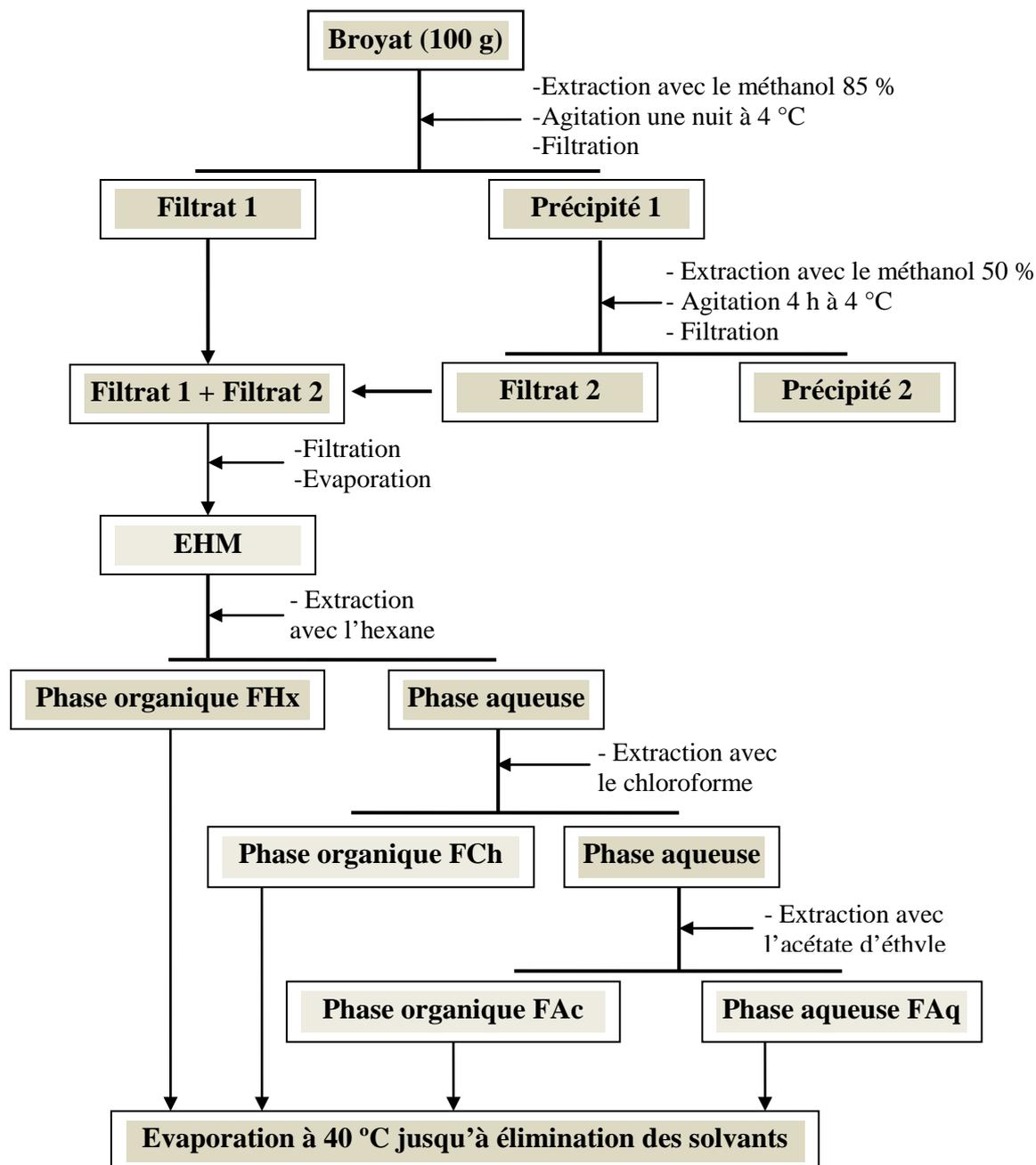
hydroalcoolique (01 litre: 85% méthanol et 15% eau distillée). Le mélange est agité pendant une nuit à l'obscurité. Ensuite, il subit des filtrations répétées sur la laine de verre et sur le papier filtre donnant à la fin, un raffinat (précipité) et un filtrat 1 (Figure 12). Le raffinat est soumis à une deuxième extraction (01 litre: 50% méthanol, 50% eau) sous agitation pendant 04 heures. A l'issue de cette extraction et après le même procédé de filtration, un filtrat 2 est récupéré et mélangé avec le filtrat 1. L'ensemble (filtrat 1 + filtrat 2) est soumis à une évaporation rotative à 40 °C donnant par la suite ce qu'on appelle l'extrait hydro-méthanolique (EHM). Un volume de 50 ml de l'EHM est séché puis conservé à -20 °C, le reste subit un fractionnement par une série de solvants organiques (Figure 12).

### **2.2. Fractionnement de l'extrait EHM**

Le fractionnement est réalisé suivant la méthode de Markham (1982) en utilisant des solvants organiques à polarité croissante; l'hexane, le chloroforme et l'acétate d'éthyle. Au préalable, l'EHM est délipidé par de l'hexane (v/v) jusqu'à l'absence totale de la couleur. Deux phases sont récupérées, une phase organique (lipides) et une phase aqueuse, cette dernière subit un fractionnement par le chloroforme (v/v) en donnant une fraction organique (fraction chloroformique, FCh) et une fraction aqueuse (Figure 12). La fraction aqueuse subit une dernière extraction par l'acétate d'éthyle (v/v) en donnant une phase organique qui représente la fraction d'acétate d'éthyle (FAc) et la phase aqueuse finale qui représente la fraction aqueuse (FAq). Au cours du fractionnement par les solvants organiques, la décantation est répétée (v/v) jusqu'à l'absence totale de la couleur. Les différents extraits sont séchés et conservés à -20 °C jusqu'à l'utilisation (Figure 12).

### 2.3. Préparation de l'extrait méthanolique (EM)

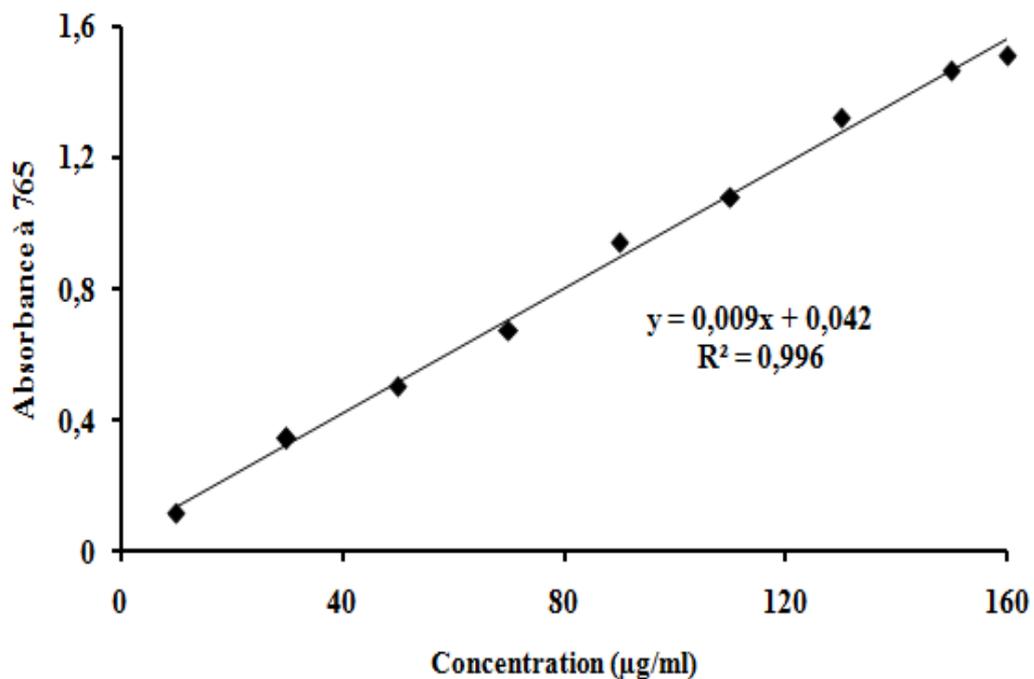
L'extrait méthanolique (EM) des deux plantes *S. verbenaca* et *L. sativum* est préparé par la macération de 01 kg de broyat dans le méthanol pure (99 %) pendant 07 jours. A l'issue de la macération le mélange est filtré sur un papier filtre, évaporé et par la suite séché dans l'étuve à 37 °C. L'extrait sec est conservé à -20 °C jusqu'à l'utilisation.



**Figure 12.** Etapes de l'extraction des polyphénols des broyats des deux plantes par la méthode de Markham (1982).

## 2.4. Dosage des polyphénols totaux

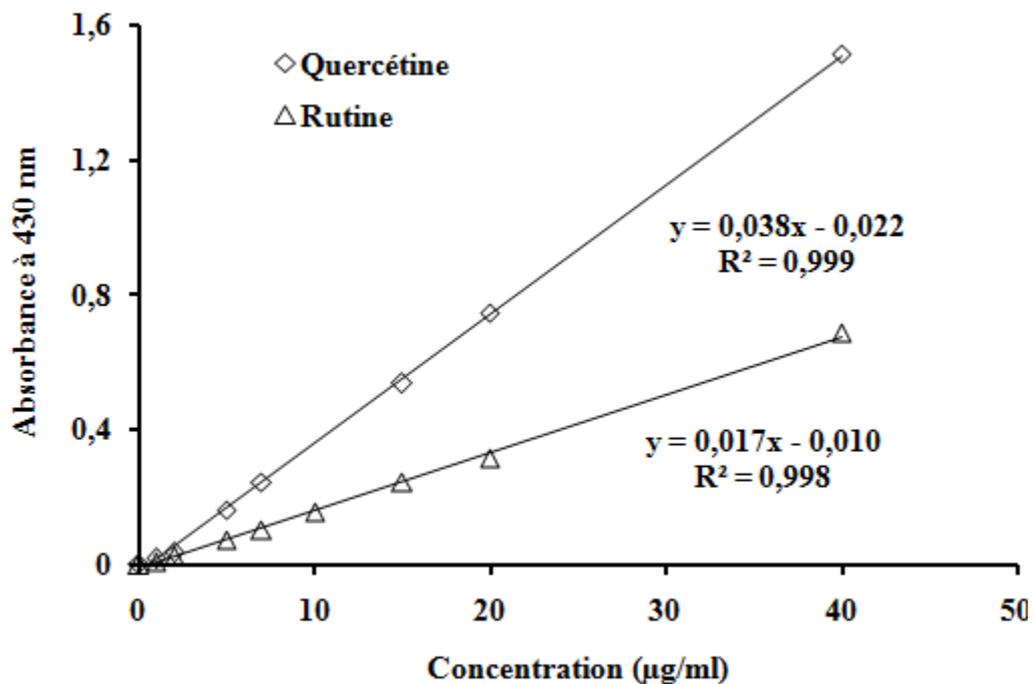
Le dosage des polyphénols totaux des extraits de *S. verbenaca* et de *L. sativum* est réalisé par la méthode du Folin-Ciocalteu (Li *et al.*, 2007). Cette technique est basée sur le principe de réduction des constituants du réactif Folin-Ciocalteu par les groupements hydroxyles des polyphénols en donnant un produit bleu dans un milieu alcalin. Brièvement, 200  $\mu$ l de chaque extrait (dilué dans l'eau distillée ou dans le méthanol) sont ajoutés à 01 ml du Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois) après agitation et 04 min d'incubation à une température ambiante, 800  $\mu$ l du carbonate de sodium (75 g/l) sont ajoutés. Après 2 heures d'incubation à la température ambiante, l'absorbance est lue à 765 nm. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (20-160  $\mu$ g/ml) (Figure 13) et exprimée en milligrammes équivalents d'acide gallique par grammes du poids d'extrait (mg EAG / g E).



**Figure 13.** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  SD (n = 3).

## 2.5. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes des extraits des deux plantes sont quantifiés par la méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun *et al.*, 1996); 1 ml de chaque échantillon (préparés dans l'eau distillée ou dans le méthanol pour avoir des concentrations convenables) est ajouté à 01 ml de la solution d' $\text{AlCl}_3$  (02 %, dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes dans chaque extrait est calculée à partir des courbes d'étalonnage établies avec la quercétine et la rutine (0 - 40  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) (Figure 14) et exprimée en milligrammes équivalents de quercétine ou de rutine par grammes du poids d'extrait (mg EQ / g E) et (mg ER / g E).



**Figure 14.** Courbes d'étalonnage de la quercétine et de la rutine. Chaque point des deux courbes représente la moyenne  $\pm$  SD (n = 3).

### 3. Activités antimicrobiennes des extraits

#### 3.1. Activité antibactérienne

Les extraits des deux plantes sont testés individuellement contre un groupe de bactéries ATCC; *E. coli*, *P. aerogenosa*, *S. aureus*, *B. cereus*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium*, *E. faecalis*, *C. freundii*, *A. baumannii* et *L. monocytogenes*. Ce test est réalisé par deux méthodes, la méthode des disques de diffusion sur agar et par la méthode des puits de diffusion sur agar (Rahal, 2005). Dans les deux méthodes, les souches bactériennes sont cultivées pendant 18 heures à 37 °C sur la gélose Mueller Hinton (MHA). A partir de ces cultures jeunes des suspensions bactériennes sont préparées dans du sérum physiologique stérile (NaCl 0.9 %). La turbidité des suspensions est fixée à (0.5 MacFarland) déterminée spectrophotométriquement par une densité optique entre 0.08 et 0.10 à 625-630 nm ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml). A partir de ces suspensions, les souches bactériennes sont étalées par écouvillonnage sur des milieux MHA dans des boites de Pétri (Rahal, 2005).

##### 3.1.1. Méthode des disques de diffusion sur gélose

Une fois l'ensemencement est effectué, des disques de papier filtre (06 mm de diamètre) imprégnés chacun de 15 µl d'extrait, sont placés sur la surface des milieux inoculés. Après 24 heures d'incubation à 37 °C, les diamètres des zones d'inhibition produites par les différents extraits sont mesurés en millimètres et comparés à celles produites par la gentamicine (contrôle positif) et le DMSO (contrôle négatif). Tous les tests sont effectués en triplicata (Rahal, 2005).

##### 3.1.2. Méthode des puits de diffusion sur gélose

Après l'étalement des souches sur les plats MHA, des puits de 07 mm de diamètre sont coupés à partir des géloses inoculées et remplis d'un volume de 60 µl d'extrait solubilisé dans le DMSO en trois concentrations (100, 200 et 300 mg/ml) équivalentes à (06, 12 et 18 mg

extrait/puits, successivement). Après 24 heures d'incubation à 37 °C, les diamètres des zones d'inhibition produites par les différents extraits sont mesurés en millimètres (Sokmen *et al.*, 2004).

### 3.1.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Sur une microplaque de 96 puits, une gamme de concentrations de chaque extrait est effectuée par des dilutions au demi (1/2) dans du bouillon nutritif (BN) à partir d'une solution mère de 100 mg/ml préparée dans le DMSO (Moroh, 2013).

A partir d'une culture bactérienne de 24 heures d'incubation sur gélose MH, une suspension bactérienne est préparée dans du bouillon nutritif à une turbidité de (0.5 Mac Farland). Ensuite 100 µl de cet inoculum, sont homogénéisés dans chaque puits de la gamme de concentrations préalablement préparée, puis incubée à 37 °C pendant 24 heures (Moroh, 2013). Après l'incubation, la lecture est effectuée par un lecteur de microplaques à 630 nm. La CMI de chaque extrait est déterminée par l'équation de la courbe de tendance tracée par les absorbances des puits en fonction des concentrations de l'extrait ( $Y = a X + b$ ). La CMI correspond à la concentration qui donne après incubation une densité optique égale à celle du blanc (Bouillon nutritif stérile) sans bactéries.

### 3.2. Activité antifongique

Les extraits des deux plantes sont testés contre quatre champignons filamenteux: *A. flavus*, *A. niger*, *Penicillium sp* et *Fusarium sp* et contre une levure; *C. albicans*. Les champignons sont activés sur des milieux de pomme de terre dextrose agar (PDA) (200 g de pommes de terre, 10 g de saccharose et 15 g d'agar dans 01 litre d'eau distillée) à 28 °C pendant 07 jours. Pour la détermination de l'activité antifongique, deux méthodes différentes ont été utilisées; méthode de diffusion sur gélose en utilisant les disques et la méthode de diffusion sur gélose en utilisant les puits. En bref, des suspensions fongiques sont préparées à partir des cultures

précédentes (07 jours), avec une turbidité entre  $1 \times 10^6$  et  $5 \times 10^6$  spores/ml (DO de 0.12 - 0.15 à 525-530 nm). A partir de ces suspensions, les souches sont étalées sur des milieux solides (PDA) par écouvillonnage.

- Dans la première méthode, des disques de papier électrophorétique (07 mm de diamètre), ont été placés sur les PDA inoculées et imprégnés de 30  $\mu$ l d'extrait en deux doses (06 ou 09 mg/disque). Le Fluconazole et le Griseofulvine (30  $\mu$ g/disque) ont été utilisés comme contrôle positif.

- Dans la deuxième méthode, des puits de 07 mm de diamètre ont été coupés à partir des milieux inoculés ensuite remplis de 60  $\mu$ l ou 80  $\mu$ l d'extrait en 02 concentrations (200 et 300 mg/ml) pour donner 04 doses ; 12 mg/puits, 16 mg/puits, 18 mg/puits et 24 mg/puits. L'Econazole a été utilisé comme contrôle positif à une concentration de 0.6 mg/ml équivalente à 36  $\mu$ g/puits.

- Toutes les boîtes ont été incubées à 28 °C et les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés en millimètres chaque 48 h pendant 10 jours d'incubation. Tous les tests ont été effectués en triplicata.

## **4. Activités antioxydantes (*in vitro*)**

### **4.1. Effet scavenger du radical DPPH**

L'activité anti-radicalaire des différents extraits des deux plantes a été évaluée, *in vitro*, par le test de DPPH. Cette méthode spectrophotométrique utilise le radical DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette comme réactif, qui vire au jaune, en présence de capteurs de radicaux libres, et se réduit en 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazine. Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm. Pour cela, 50  $\mu$ l de chacune des différentes concentrations des extraits ont été incubés avec 1.25 ml d'une solution méthanolique de

DPPH à 0.004 %. Après une période d'incubation de 30 minutes, les absorbances à 517 nm ont été enregistrées (Boumerfeg *et al.*, 2012). Les résultats obtenus ont été exprimés par rapport à ceux obtenus pour le BHT pris comme antioxydant de référence. Le pourcentage d'inhibition (I %) du radical DPPH par les extraits de *S. verbenaca* et *L. sativum* a été calculé comme suit:

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

A<sub>C</sub>: absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif)

A<sub>E</sub>: absorbance en présence de l'inhibiteur (échantillon)

La concentration inhibitrice de 50 % de DPPH (IC<sub>50</sub>) de chaque extrait a été par la suite calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur. Elle a été exprimée en µg/ml et comparée avec celle du BHT.

#### 4.2. Test de β-carotène / acide linoléique

L'activité antioxydante des extraits de *S. verbenaca* et *L. sativum* a été étudiée par le test au β-carotène / acide linoléique. Cette méthode est basée sur la capacité des extraits à inhiber la formation des diene-hydroperoxydes conjugués durant l'oxydation de l'acide linoléique (Barriere *et al.*, 2001; Aslan *et al.*, 2006). Une solution de β-carotène / acide linoléique a été préparée comme suit: premièrement, 0.5 mg de β-carotène a été dissous dans 1 ml de chloroforme, ensuite 25 µl d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 ont été ajoutés. Le chloroforme a été évaporé à 40 °C dans le rotavapeur. 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène (100 ml / min / 30 min) ont été ajoutées au mélange avec agitation vigoureuse. Le mélange réactionnel a été par la suite aliquoté (2.5 ml) dans des tubes à essai, et 350 µl de chacun des extraits préparés des deux plantes (02 mg / ml, dans l'eau distillée ou dans le méthanol) ont été ajoutés. La même procédure a été répétée avec le BHT (02 mg/ml) comme un contrôle positif et avec le méthanol et l'eau distillée comme des contrôles négatifs. Les

absorbances ont été lues à 490 nm, après 01 heure, 02 h, 04 h, 06 h, 24h et 48 h d'incubation à température ambiante à l'obscurité. Le pourcentage de l'activité antioxydante (AA %) a été calculé ainsi:

$$AA \% = (A_E / A_C) \times 100$$

$A_E$  : absorbance en présence de l'extrait

$A_C$  : absorbance en présence du contrôle positif BHT

Remarque: les valeurs d'AA % prises pour la comparaison sont ceux calculées à 48 h.

### 4.3. Effet chélateur des métaux

L'effet chélateur des métaux par les extraits de *S. verbeneca* et *L. sativum* a été testé par l'évaluation de l'inhibition de formation du complexe Ferrozine-Fe(II) selon la méthode de Decker et Welch (1990). 250  $\mu$ l des extraits des deux plantes (une gamme de dilutions) ont été mélangés avec 450  $\mu$ l méthanol et 50  $\mu$ l FeCl<sub>2</sub> (0.6 mM). Après 05 min 50  $\mu$ l de Ferrozine (05 mM) ont été ajouté au mélange et après 10 min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance a été lue à 562 nm. L'EDTA (0 - 40  $\mu$ g/ml) a été utilisé comme contrôle positif et le pourcentage d'inhibition a été calculé ainsi:

$$\% \text{ Chelation} = [1-(AC-AE) \times 100]$$

AC: Absorbance du contrôle (Méthanol + FeCl<sub>2</sub> + Ferrozine).

AE: Absorbance en présence des extraits.

### 4.4. Pouvoir réducteur des extraits

Cet effet a été déterminé selon la méthode de Topçu et ses collaborateurs (2007), avec quelques modifications. Brièvement, 200  $\mu$ l d'extrait de plantes à différentes concentrations préparées dans de l'eau distillée ont été mélangés avec 200  $\mu$ l du tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et du ferricyanure de potassium (200  $\mu$ l, 1%). Le mélange a été incubé à 50 ° C pendant 20 min. L'acide trichloracétique (TCA) (200  $\mu$ l, 10%) a été ajouté au mélange et

centrifugé à 3000 g pendant 10 min. Le surnageant résultant (400 µl) a été mélangé avec de l'eau distillée (400 µl) et FeCl<sub>3</sub> (80 µl, 0.1%) et les absorbances des échantillons et de l'acide ascorbique (standard) ont été lues à 700 nm après 10 min.

#### **4.5. Inhibition de l'hémolyse oxydative des érythrocytes induite par l'AAPH**

Afin d'évaluer la résistance des érythrocytes prétraités par les extraits des plantes à un attaque radicalaire, l'AAPH (2,2, -azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride) dissous dans du PBS (NaCl 125 mM, phosphate de sodium 10 mM, pH 7,4), est utilisé pour induire la chaîne d'oxydation des radicaux libres dans les érythrocytes (Takebayashi *et al.*, 2010 ; Girard *et al.*, 2006). Donc, le sang provenant d'une souris mâle est collecté dans un tube contenant 0.1% d'EDTA, il est centrifugé à 6000 tpm pendant 10 minutes, le culot de globules rouges résultant est lavé trois fois avec le tampon PBS. A partir du culot de globules rouges obtenu, un aliquote de 100 µl de sang total est transféré immédiatement vers un autre tube contenant 2,4 ml de PBS afin d'obtenir une dilution de 1/25<sup>ème</sup>. Brièvement, 80 µl de chacune des solutions sanguines obtenues précédemment, sont pré-incubés sur des microplaques avec 20 µl d'échantillons (0.1 mg/ml) à 37°C pendant 15 min. Après, 136 µl AAPH (300 mM) sont ajoutés et les mélanges réactionnels étant alors incubés à 37°C pendant 04 à 05 h (Girard *et al.*, 2006). Le degré d'hémolyse est déterminé spectrophotométriquement à 620 nm, où la densité optique est lue toutes les 15 min, dans le but de mesurer le plus correctement possible le temps de demi-hémolyse (HT<sub>50</sub>). Dans toutes les expériences, un contrôle négatif (GRs avec l'AAPH), est utilisés. La vitamine C (0.1 mg/ml) est utilisée comme agent antihémolytique de référence.

## 5. Etude *in vivo*

### 5.1. Toxicité aiguë des extraits méthanoliques

Pour évaluer la toxicité aiguë des extraits EM/SV et EM/LS, des souris mâles, Swiss albinos, adultes de poids variant entre 25 et 30 g, sont utilisées. Les souris ont été adaptées pendant environ 1 semaine puis réparties en 6 lots homogènes de 8 à 9 souris. Elles ont été mises à jeun pendant 1 nuit avant l'administration de l'extrait. Deux doses différentes ont été testées pour chaque extrait 02 g/kg et 05 g/kg en plus d'un lot témoin. Le traitement des souris a été fait par voie orale (Tableau 06).

**Tableau 06.** Traitement des souris par administration unique des extraits (Toxicité aiguë).

Lot	Solution administrée	Dose
Témoin 1	Eau physiologique + DMSO	NaCl (0.9 %) + DMSO (10%, v/v)
Témoin 2	Eau physiologique	NaCl (0.9%)
EM/LS/D1	EM/LS	2 g/kg
EM/LS/D2	EM/LS	5 g/kg
EM/SV/D1	EM/SV	2 g/kg
EM/SV/D2	EM/SV	5 g/kg

Les souris des six lots ont été suivies pendant 14 jours, le poids corporel a été pris après les 07 premiers jours en plus du dénombrement des cas de mort. Le 14<sup>ème</sup> jour les souris des différents lots sont mises à jeun pendant 1 nuit pour être sacrifier et disséquer le jour après. A l'issue de la dissection des souris, les organes (foie, reins, poumons, cerveau, cœur, rate et l'estomac) ont été récupérés et pesés.

## 5.2. Activité antioxydante *in vivo*

Des souris mâles, swiss albinos, adultes de poids variant entre 25 et 30 g, ont été réparties selon l'homogénéité de leurs poids en 04 lots expérimentaux de 09 à 10 animaux chacun.

L'administration des extraits s'est faite par injection intra-péritonéale quotidiennement durant 21 jours selon le Tableau 07.

**Tableau 07.** Traitement des souris par injection intra-péritonéale quotidienne pendant 21 jours

Lot	Solution reçue
Témoin	Eau physiologique (NaCl 0.9%)
Vit C	Vitamine C (50 mg/kg)
EM/SV	Extrait EM/SV (100 mg/kg)
EM/LS	Extrait EM/LS (100 mg/kg)

Après 21 jours d'injection intrapéritonéale et par décapitation des souris anesthésiées par l'éther diéthylique, le sang est récupéré dans des tubes héparinés. Après la récupération du sang de chaque groupe, un volume de sang total est transféré immédiatement vers un autre tube contenant le tampon phosphate (300 mOs, pH 7.4) afin d'obtenir une suspension érythrocytaire de 2% d'hématocrite. Cette suspension est utilisée pour évaluer la capacité antioxydante totale du sang de chaque souris. La quantité du sang restante est centrifugée à 1500 g pendant 05 min à 04°C. Le plasma obtenu est aliquoté et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation (test du DPPH et le test du pouvoir réducteur).

Après la disséquation des animaux, le foie de chaque souris a été récupéré, pesé et préservé dans une solution physiologique de NaCl (0.9%) à -20°C jusqu'à l'utilisation.

### 5.2.1. Effet sur la capacité antioxydante totale du sang (activité antihémolytique)

La capacité antioxydante totale du sang est mesurée suivant le protocole décrit par Takebayashi et ses collaborateurs (2010) avec quelques modifications (Manna *et al.*, 2002) en remplaçant le radical AAPH [2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) HCl] par le *tert*-butyle hydroperoxyde (*t*-BHP) à une concentration de 166µM. Le sang obtenu précédemment (hématocrite de 2%) est soumis à une attaque radicalaire par l'addition du *t*-BHP à la suspension érythrocytaire. La cinétique de disparition progressive des hématies est suivie à 37°C par la mesure de la diminution de l'absorbance à 620 nm. La résistance du sang à l'attaque radicalaire est exprimée par le temps nécessaire à la lyse de 50% des érythrocytes (HT50). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne HT50 ± SEM.

### 5.2.2. Effet sur la capacité antioxydante du plasma

#### A) Effet sur la capacité antioxydante du plasma vis-à-vis le radical DPPH<sup>•</sup>

Dans ce test, la capacité du plasma à piéger le radical DPPH a été évaluée selon la méthode de Hasani et ses collaborateurs (2007) avec quelques modifications. Brièvement, 625 µl de la solution DPPH (0.004 % dans le méthanol) ont été ajoutés à 25 µl de plasma. Après 30 min d'incubation à l'obscurité suivie d'une centrifugation, l'absorbance du surnageant a été lue à 517 nm. Le pouvoir antioxydant plasmatique a été ensuite calculé selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ d'activité anti-radicalaire} = [(\text{Abs cont} - \text{Abs éch}) / \text{Abs cont}] \times 100$$

Abs cont: l'absorbance du contrôle.

Abs éch: l'absorbance d'échantillon (plasma).

#### B) Effet sur le pouvoir réducteur du plasma

Le pouvoir réducteur du plasma a été évalué en mesurant sa capacité à réduire le  $\text{Fe}^{+3}$  en  $\text{Fe}^{+2}$  selon la même procédure suivie *in vitro* (Topçu *et al.*, 2007). Le mélange réactionnel a été comme suit: 100  $\mu\text{l}$  de plasma plus 100  $\mu\text{l}$  du tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) plus 100  $\mu\text{l}$  de solution ferricyanure de potassium ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) (1%); le mélange est incubé dans un bain-marie à 50 °C pendant 20 min; après, 250  $\mu\text{l}$  d'acide trichloracétique (TCA, 1%) sont ajoutés au mélange, qui a été ensuite centrifugé à 3000 tpm pendant 10 min. 250  $\mu\text{l}$  du surnageant ont été mélangés avec 250  $\mu\text{l}$  d'eau distillée et 500  $\mu\text{l}$  ( $\text{FeCl}_3$ ). Après 10 min, les absorbances des échantillons ont été lues à 700 nm.

### **5.2.3. Estimation des indicateurs enzymatiques et non enzymatiques d'oxydation au niveau du tissu hépatique**

#### **A) Préparation d'homogénat**

Après décongélation, les foies des souris ont été maintenus à 04°C pendant toute la durée de dosage. On a pris un morceau de 0.5 g du foie de chaque souris et l'homogénéiser dans 4.5 ml de KCl (1.15%, 04°C). L'homogénéisation a été faite dans deux étapes successives ; un broyage par un broyeur de douce puis une sonication pour libérer le contenu intracellulaire des cellules hépatiques. L'homogénat obtenu est centrifugé à 4000 tpm pendant 10 min à 04°C. Le surnageant, contenant le cytosol, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les protéines cytosoliques est récupéré pour la détermination des indicateurs enzymatiques et non enzymatiques d'oxydation au niveau du tissu hépatique: L'activité CAT, les protéines totales, et le MDA.

#### **B) Activité de la catalase**

L'activité de catalase (CAT) a été dosée par le procédé de Claiborne (1985). Le mélange réactionnel était constitué de tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4), peroxyde d'hydrogène

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 19 mM) et 50 µl d'homogénat à tester. La réaction a été effectuée à 25 °C et le changement d'absorbance a été enregistré à 240 nm. L'activité CAT a été calculée en termes de µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consommé / min / mg de protéine (Peixoto *et al.*, 2013). (**K= 2.303/T \* log A1/A2**)

Ce test est basé sur la décomposition enzymatique du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par la catalase, déterminée en tant que décroissance d'absorbance à 240 nm.

### **C) Quantification des protéines totales**

Les protéines totales ont été dosées en utilisant le kit de Biuret (Ref: 1001290, 2 × 250ml) ; 1ml de ce réactif a été mélangé avec 25 µl d'homogénat; le mélange est incubé pendant 5 minutes dans un bain-marie à 37 °C; Ensuite, la densité optique est mesurée à une longueur d'onde de 540 nm. La quantité de protéine dans l'échantillon est exprimée en **mg / dl**.

Ce test est basé sur la réaction des protéines avec des sels de cuivre donnant un complexe bleu-violet dans un milieu alcalin. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration en protéines totales dans l'échantillon, qui peut être mesurée par spectroscopie optique à 540 nm (Shen *et al.*, 1999).

### **D) Estimer la quantité du MDA (Malondialdéhyde)**

Le Malondialdéhyde (MDA) est l'un des composés finaux formés à partir de la peroxydation des lipides en présence de radicaux libres. En effet, la peroxydation lipidique peut être mesurée en estimant la quantité de MDA formée au niveau du foie (Ohkawa *et al.*, 1979). Ce test est basé sur la liaison entre une molécule MDA et deux molécules TBA formant un complexe de couleur rose absorbe à 530 nm. Brièvement, 250 µl d'homogénat du foie plus 250 µl de solution TCA (20%) et 500 µl de solution TBA (0.67%), ont été mélangés et chauffés à 100 °C pendant 15 minutes ; après, le mélange est refroidi, lui ajouter 02 ml de n-

butanol puis centrifugé à 3000 tpm pendant 15min le surnageant est récupéré et lire la densité optique à 532nm.

la quantité de MDA dans l'échantillon est exprimée en nmol / gramme de tissus du foie, et est obtenue à partir d'une courbe d'étalonnage de 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (Malonaldéhyde bis(diethyl acetal) produit après la décomposition en solution) dans les mêmes conditions précédentes.

### **5.3. Activité anti-inflammatoire *in vivo***

L'effet anti-inflammatoire des extraits a été évalué selon la méthode de Garrido et ses collaborateurs (2004) sur des souris mâles adultes (25-30 g). 4 mg/oreille de PMA (phorbol myristate acétate) dans 20 µl de DMSO, sont appliqués sur la surface de l'oreille gauche de chaque souris. L'oreille droite (contrôle) a reçu le véhicule (20 µl DMSO). L'extrait méthanolique des deux plantes est administré 01 heure avant l'application du PMA (Tableau 08).

**Tableau 08.** Doses injectées avant une heure de l'application de PMA

---

<b>Lot</b>	<b>Solution injectée</b>	<b>Dose</b>
<b>Témoin</b>	Eau physiologique	NaCl (0.9 %)
<b>DCF</b>	Diclofénac	15 mg/kg
<b>EM/SV</b>	EM/SV	100 mg/kg
<b>EM/LS</b>	EM/LS	100 mg/kg

---

Six heures après l'application du PMA, les souris sont tuées par dislocation cervicale et un disque de 06 mm de diamètre de chaque oreille est enlevé et pesé. L'œdème de l'oreille est calculé par la soustraction du poids de l'oreille gauche (véhicule) de l'oreille droite (traitée), et

est exprimé en poids de l'œdème. Le pourcentage d'inhibition est exprimé comme une réduction en poids par rapport au groupe témoin.

## **6. Analyse statistique**

Les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  SD (déviation standard), et en moyenne  $\pm$  SEM (erreur standard de la moyenne). Les résultats ont été analysés par le test d'ANOVA univariée (one-way ANOVA) suivie du test de Tukey pour la comparaison des résultats en présence des extraits avec les contrôles négatifs (en absence des extraits). La différence a été considérée statistiquement significative lorsque la valeur de  $p$  est  $< 0.05$ .

## 02. Résultats et Discussion

### 1. Extraction et dosage des polyphénols et des flavonoïdes

#### 1.1. Rendements des extraits

Dans cette étude, l'extraction des composés phénoliques à partir de la partie aérienne de *S. verbenaca* (SV) et des graines de *L. sativum* (LS) a été effectuée par un mélange hydro-alcoolique (méthanol/eau 85 % et 50 %) en donnant l'extrait brut hydro-méthanolique (EHM). Ce dernier a subi une série d'extractions par des solvants de polarité croissante à fin de séparer les composés phénoliques et en particulier les flavonoïdes selon leur degré de solubilité et donc selon leur degré de glycosylation en flavonoïdes aglycones, mono, di, tri et tetra-glycosylés (Markham, 1982). A l'issue de cette extraction on a récupéré pour chaque plante un EHM et trois fractions (FCh, FAc, FAq).

Le calcul des rendements par rapport au poids de broyat (100 g) a donné les valeurs illustrées dans le Tableau 09. L'EHM des deux plantes a enregistré un rendement considérable, mais après fractionnement on a trouvé que la grande partie de cet extrait est une phase aqueuse résiduelle notamment chez l'EHM/LS. Ainsi, la comparaison entre les extraits de *S. verbenaca* (ESV) et les extraits de *L. sativum* (ELS), montre que les premiers ont des rendements plus importants que les seconds à l'exception de la FAq (Tableau 09).

En ce qui concerne le contenu qualitatif des ESV et des ELS, Newman *et al.*, (1997) et Markham, (1982), ont rapporté que à l'issue de cette méthode d'extraction, l'EHM peut contenir des polyphénols dont des flavonoïdes, des acides phénoliques et des tannins en plus des aminoacides, des terpènes et des cires. La FCh contient en grande partie des flavonoïdes aglycones et peut contenir aussi des terpénoïdes. La FAc renferme des flavonoïdes

glycosidiques, notamment les mono et les diglycosidiques, des flavonoïdes sulfatés et des coumarines. Finalement, la FAq peut contenir des flavonoïdes plus polaires (di, tri et tetraglycosidiques), des alcaloïdes, des acides aminés, des tannins, des acides phénoliques et des coumarines.

**Tableau 09.** Rendements en pourcentage (%) des extraits ESV et ELS.

<b>Extrait</b>	<b>Rendement / Poids totale (%)</b>		<b>Rendement / EHM (%)</b>	
	<b>ESV</b>	<b>ELS</b>	<b>ESV</b>	<b>ELS</b>
<b>EHM</b>	14.97	12.60	/	/
<b>FCh</b>	0.45	0.293	03.01	02.33
<b>FAc</b>	1.59	0.493	10.62	03.91
<b>FAq</b>	9.37	11.53	62.59	91.51

ESV: les extraits de *S. verbenaca*, ELS: les extraits de *L. sativum*. EHM : extrait hydrométhanolique, FCh: fraction chloroformique, FAc: fraction d'acétate d'éthyle, FAq: fraction aqueuse.

### **1.2. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes**

Les polyphénols totaux et les flavonoïdes contenus dans les ESV et les ELS ont été dosés par la méthode de Folin-Ciocalteu et la méthode de trichlorure d'aluminium, respectivement. Les résultats obtenus dans les Tableaux 10 et 11, montrent que les ESV semblent avoir les teneurs les plus élevées en polyphénols ainsi que en flavonoïdes. Cependant, la FAc des deux plantes a été la plus riche en polyphénols, suivi par l'EHM puis la FCh et enfin la FAq. Pour les flavonoïdes, la FAc des deux plantes a été la fraction représentative de ces composés, suivi par la FCh puis l'EHM et en fin la FAq.

**Tableau 10.** Teneurs des différents extraits ESV en polyphénols totaux en (mg EAG / g E) et en flavonoïdes en (mg EQ / g E) et en (mg ER / g E).

<u>ESV</u>	Polyphénols		Flavonoïdes	
	<sup>(a)</sup> (mg EAG/g d'E)	<sup>(b)</sup> (mg EQ/g d'E)	<sup>(c)</sup> (mg ER/g E)	
EHM	177.56 ± 2.51	08.13 ± 0.45	17.00 ± 1.00	
FCh	156.81 ± 1.57	13.75 ± 1.54	29.55 ± 3.45	
FAc	661.78 ± 4.00	26.21 ± 1.15	57.42 ± 2.58	
FAq	123.18 ± 4.20	06.73 ± 0.14	13.88	0.30

(a) mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait, (b) mg équivalent quercétine par gramme d'extrait (c) mg équivalent rutine par gramme d'extrait. Les valeurs sont les moyennes ± SD (n = 3)

**Tableau 11:** Teneurs des différents extraits ELS en polyphénols totaux en (mg EAG / g E) et en flavonoïdes en (mg EQ / g E) et en (mg ER / g E).

<u>ELS</u>	Polyphénols		Flavonoïdes	
	<sup>(a)</sup> (mg EAG/g d'E)	<sup>(b)</sup> (mg EQ/g d'E)	<sup>(c)</sup> (mg ER/g E)	
EHM	175.26 ± 7.75	05.94 ± 1.10	12.18 ± 1.55	
FCh	164.22 ± 2.83	09.14 ± 1.19	18.23 ± 0.96	
FAc	305.44 ± 12.09	11.29 ± 0.23	23.03 ± 2.11	
FAq	65.53 ± 6.47	05.01 ± 0.79	10.10 ± 0.88	

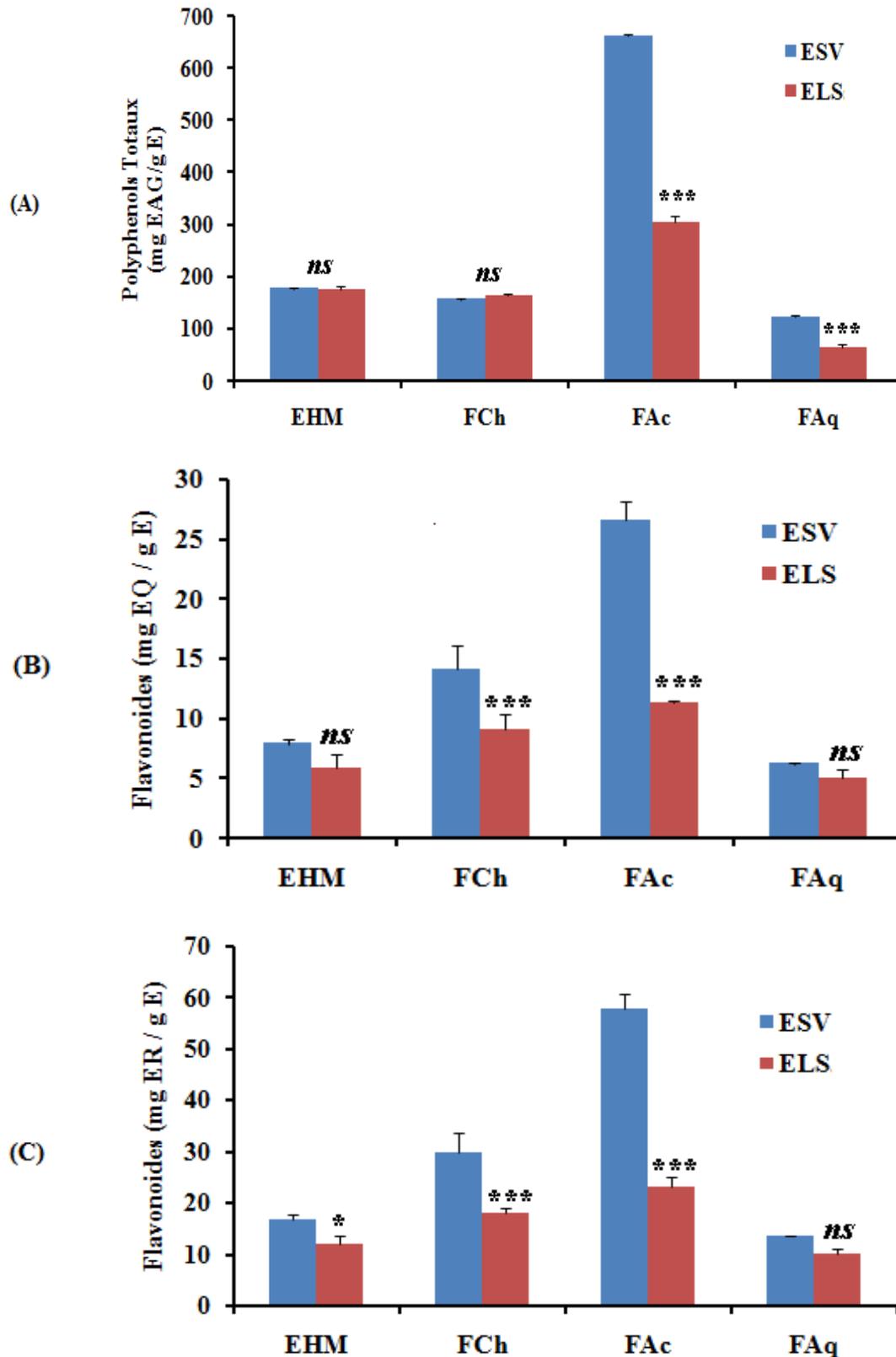
(a) mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait, (b) mg équivalent quercétine par gramme d'extrait, (c) mg équivalent rutine par gramme d'extrait. Les valeurs sont les moyennes ± SD (n = 3).

La comparaison entre les ESV et les ELS extrait – extrait (Figure 15; A, B et C) montre que les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes dans l'EHM des deux plantes sont

statistiquement égaux ( $p < 0.05$ ). La FCh présente la même teneur en polyphénols chez les deux plantes (Figure 15 ; A) mais elle est significativement plus riche en flavonoïdes chez SV (Figure 15; B et C). Concernant la FAc, elle préserve des quantités exceptionnelles de polyphénols totaux et de flavonoïdes chez SV, plus que le double des teneurs dans la FAc/LS ( $p < 0.001$ ). La FAq/SV est significativement plus riche en composés phénoliques que la FAq/LS et avec des teneurs statistiquement égaux en flavonoïdes (Figure 15 ; B et C).

Les différences de teneurs en polyphénols et en flavonoïdes entre les ESV et ELS peuvent être dues à la partie végétale utilisée dans la préparation des extraits puisque les ESV sont préparés à partir de la partie aérienne (tiges + feuilles + fleurs) de la plante alors que les ELS sont préparés des graines. La synthèse et l'accumulation des polyphénols dans les plantes sont généralement stimulées en réponse aux stress biotique et abiotique comme la salinité dont les Ultraviolets. Les organes végétaux les plus exposés aux rayonnements UV sont les plus riches en flavonoïdes, tel que, les feuilles, le pollen et le méristème apicale (Naczka et Shahidi, 2004 ; Winkel-Shirley, 2002).

Ben Farhat *et al.* (2013) ont enregistré des teneurs entre 55.49 mg et 136.33 mg EAG/g de broyat dans les extraits méthanoliques de la partie aérienne des *S. verbenaca* récoltés de différentes régions. Ils ont attribué cette variation de teneur en composés phénoliques totaux aux différences des conditions de croissance et aux génotypes, qui influencent l'accumulation de ces composés en synthétisant différentes quantités et / ou différents types de phénoliques. Egalement, Bonnaillie *et al.* (2012), ont attribué les différences de teneurs à la méthode d'extraction et aux solvants utilisés.



**Figure 15.** Comparaison entre les teneurs des extraits ESV et ELS en (A): polyphénols totaux en (mg EAG / g E), (B): Flavonoïdes en (mg EQ / g E) et (C): Flavonoïdes en (mg ER / g E). Valeurs exprimées en moyenne  $\pm$  SD (n = 3 à 4), *ns*: non significatif, \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

## **2. Activité antimicrobienne des extraits ESV et ELS**

### **2.1. Principe**

L'activité antimicrobienne de nos extraits a été évaluée par la technique de diffusion sur gélose ; un essai semi-quantitatif qui consiste à appliquer une concentration connue de l'extrait sur la surface d'une gélose inoculée précédemment avec une quantité standardisée de cellules bactériennes ou fongiques. Deux méthodes ont été réalisées, par les disques et par les puits où les extraits diffusent dans le milieu gélosé, créant ainsi un gradient de concentration circulaire. Après incubation à 37 °C pendant 24h pour les bactéries et à 28 °C pendant 48h pour les champignons, les cellules bactériennes ou fongiques seront multipliées et si l'extrait a une activité antimicrobienne, une zone d'inhibition (claire) de la croissance apparaît autour du disque ou du puits.

La lipophilicité, la volatilisation, la quantité du composé, le type du milieu gélosé, le pH et le volume de gélose peuvent tous affecter fortement la zone d'inhibition. Ces facteurs dans la technique de diffusion sur gélose doivent être soigneusement évalués pour la cohérence de façon à éviter des résultats faussement positifs ou négatifs (Pauli, 2006 ; Scorzoni *et al.*, 2016).

### **2.2. Activité antibactérienne des extraits**

#### **2.2.1. Activité antibactérienne par la méthode des disques**

Les résultats obtenus (Tableau 12) montrent que les différents extraits ESV et ELS ont été actifs contre l'ensemble des souches bactériennes testées. Parmi les ESV, la FAc a été la plus active contre les 10 souches en produisant des diamètres d'inhibition (DI) compris entre 08 et 11 mm, la FCh a donné des DI de 07 à 09 mm contre 04 souches. L'EHM a inhibé 02 souches

avec un DI de 07 et 09 mm tandis que, la FAq était complètement inactive contre les bactéries testées.

En ce qui concerne les ELS, la FAc a été ainsi la plus active en provoquant des DI de 08 à 11 mm contre les 10 souches, suivie par la FCh avec des DI de 08 à 09 mm contre 07 souches puis l'EHM contre 04 souches avec des DI compris entre 07 et 09 mm et enfin la FAq qui était complètement inactive.

La comparaison avec la Gentamicine (Gen); un antibiotique à large spectre d'activité antibactérienne, montre que avec la quantité 1.5 mg/disque, les extraits ESV et ELS sont considérés moins actifs (Tableau 12).

**Tableau 12.** DI (mm) produites par les ESV et les ELS contre les 10 souches bactériennes testées. La Gentamicine (Gen) utilisée comme contrôle positif.

Bactéries	ESV (100 mg/ml)*			ELS (100 mg/ml)			Gen
	EHM	FCh	FAc	EHM	FCh	FAc	10 µg/disque
<i>E. coli</i>	-	07	09	09	08	10	19
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	10	-	-	08	27
<i>S. aureus</i>	09	09	10	07	09	11	30
<i>B. cereus</i>	-	09	11	-	-	09	16
<i>S. typhimurium</i>	-	-	09	09	08	10	14
<i>E. faecalis</i>	-	07	10	-	-	08	14
<i>C. freundii</i>	09	-	10	-	08	10	34
<i>A. baumannii</i>	-	-	08	07	08	10	27
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	08	-	09	10	13
<i>P. mirabilis</i>	-	-	11	-	09	09	26

\*: 1.5 mg / disque, Valeurs représentent la moyenne de 03 mesures (n=3)

Sur la base des travaux de Delahousse (2003), les ESV et ELS, ont montré deux niveaux d'activité antibactérienne: une activité faible exprimée par les DI inférieures à 10 mm et une activité moyenne exprimée par les DI compris entre 10 et 14 mm (Tableau 12). Par contre la

Gen était plus active et a donné trois niveaux d'activité: moyenne (13 et 14 mm), forte (16 à 30 mm) et très forte avec un DI de 34 mm contre *C. freundii* (Tableau 12).

Akrayi et Tawfeeq, (2012), ont mentionné que les résultats négatifs ou la faible activité des extraits n'indiquent pas que les constituants bioactifs sont absents ou que la plante est inactive. Ils ont expliqué ça par l'insuffisance de la dose utilisée et que l'activité antibactérienne peut être obtenue avec des doses plus élevées. En effet le doublement de la quantité des extraits et également le volume dans les disques, a permis d'obtenir une bonne activité antibactérienne (Belkhiri *et al.*, 2017).

D'après ces résultats les deux fractions non polaires FAc et FCh apparaissent plus actives que l'EHM et la FAq qui sont polaires. En effet la FAc, est plus riche en flavonoïdes que la FCh, cette richesse en flavonoïdes est peut être l'origine de cette importante activité antibactérienne. Des résultats similaires ont été obtenus avec les extraits des racines de *Tamus communis L.* et *Carthamus caeruleus L.* où les deux fractions non polaires FCh et FAc étaient les plus actives (Belkhiri et Baghiani, 2017). Sur la base de ces résultats on peut conclure qu'il y a une bonne corrélation entre l'activité antibactérienne des extraits ESV et ELS et leurs teneurs en composés phénoliques et notamment en flavonoïdes.

Ahmed et Aqil, (2007), ont rapporté que la présence d'un ou plusieurs groupes de composés phytochimiques comme les flavonoïdes, les tanins, les glycosides, les phénols, les saponines, etc. est responsable de l'activité antibactérienne des extraits, seule ou en combinaison. Ainsi, Shan et ces collaborateurs (2007), ont indiqué que les composés phénoliques contribuent de manière significative à l'activité antibactérienne des extraits.

### 2.2.2. Activités antibactérienne par la méthode des puits

Par cette technique on a testé l'activité des deux fractions non polaires (FCh et FAc) extraites à partir de l'extrait méthanolique (EM) des deux plantes (macération dans le méthanol pure), en augmentant la teneur en composés phénoliques non polaires et lipophiles, ainsi en augmentant la quantité mise en contact avec les bactéries. Trois concentrations ont été testées 100 mg/ml, 200 mg/ml et 300 mg/ml et le volume versé dans chaque puits est 60 µl, donc la quantité de l'extrait par puits soit 6 mg/puits, 12 mg/puits ou 18 mg/puits.

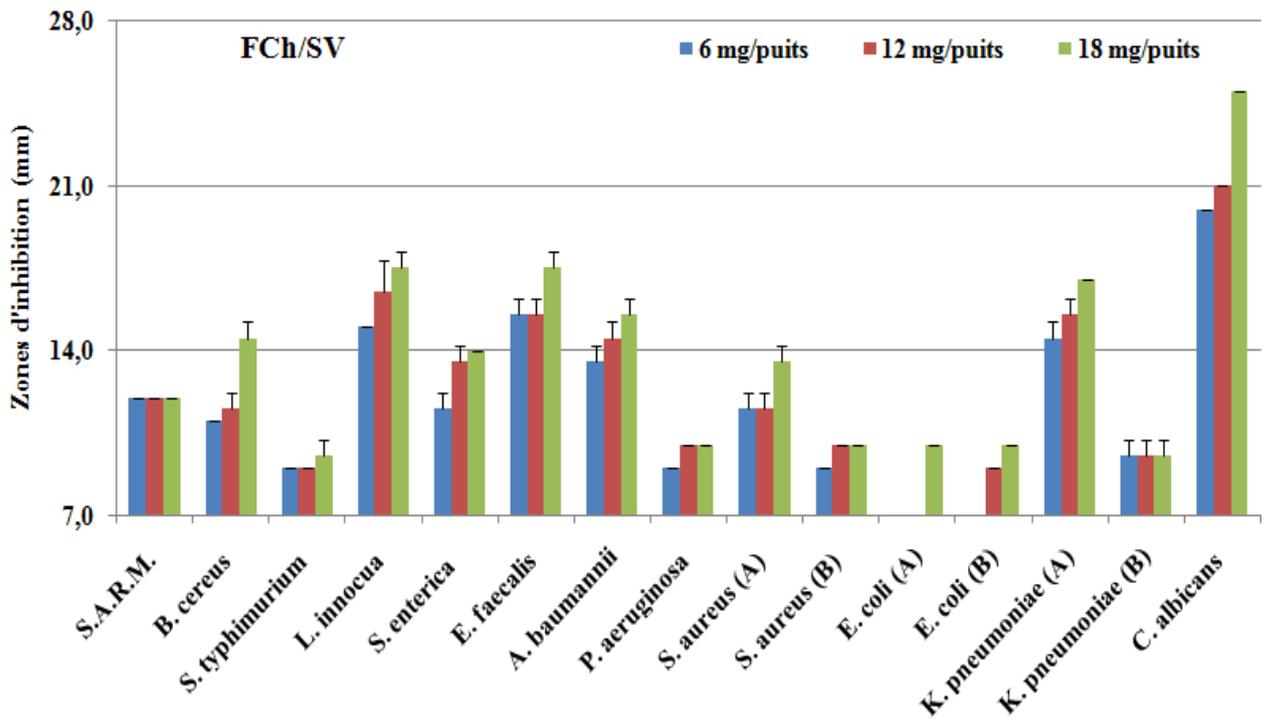
La FCh et la FAc des deux plantes ont été appliquées contre 14 souches bactériennes à savoir *S.A.R.M.*, *B. cereus* ATCC, *S. typhimurium* ATCC, *L. innocua* CLIP, *S. enterica* ATCC, *S. aureus* ATCC, *E. coli* ATCC, *K. pneumoniae* ATCC, *E. faecalis* ATCC, *P. aeruginosa* ATCC, *A. baumannii* ATCC, *S. aureus* non ATCC, *E. coli* non ATCC et *K. pneumoniae* non ATCC et contre une levure *C. albicans* ATCC.

Les DI obtenus montrent que les quatre fractions ont été capables d'inhiber la croissance de la totalité des souches bactériennes testées d'une manière dose-dépendante; lorsqu'on a doublé puis triplé la concentration des extraits les DI augmentaient chaque fois contre l'ensemble des bactéries et la levure *Candida* (Figures 16, 17, 18, 19).

#### A) Comparaison entre les effets des trois doses

La fraction FCh/SV a été capable d'inhiber la croissance de la majorité des bactéries en plus de la levure *Candida*. (Figure 16). Pour la dose 6 mg/puits, les DI étaient entre 09 et 15.5 mm contre 12 bactéries et de 20 mm contre *C. albicans*. Cependant, le doublement de la dose (12 mg/puits) a augmenté les DI contre 07 souches bactériennes (10 à 16.5 mm) et contre *C. albicans* avec un DI de 21 mm. La troisième dose a permis d'avoir une activité antibactérienne importante contre 07 bactéries ; *B. cereus*, *L. innocua*, *S. enterica*, *E. faecalis*,

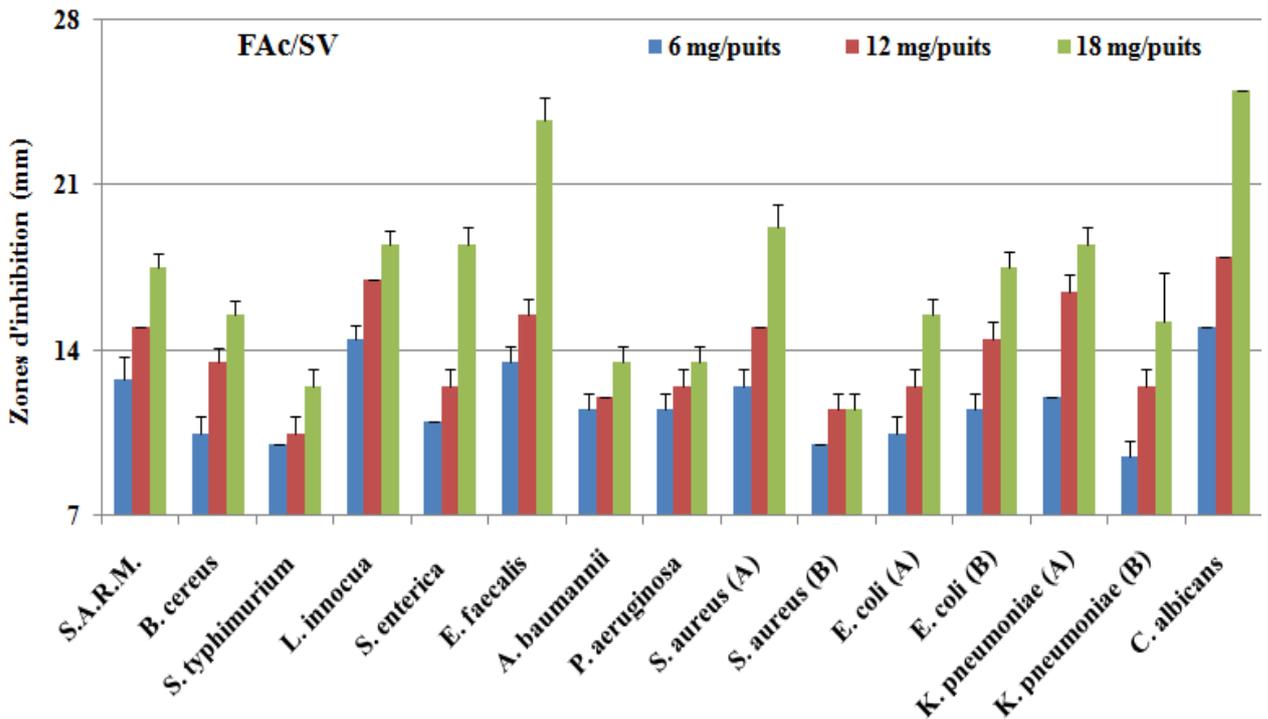
*A. baumannii*, *S. aureus* et *K. pneumoniae* (A) où les DI sont entre 13.5 et 17.5 mm. Par contre, elle est restée moins active contre: *S.A.R.M* (12 mm), *S. typhimurium* (9.5 mm), *P. aeruginosa* (10 mm), *S. aureus* non ATCC (10 mm), *E. coli* ATCC et non ATCC (10 mm) et *K. pneumoniae* non ATCC (9.5 mm). Contre *C. albicans* la zone d'inhibition est de 25 mm de diamètre.



**Figure 16.** Activité antimicrobienne de la FCh/SV en termes des diamètres des zones d'inhibition (mm) par trois doses: 06 mg/puits, 12 mg/puits et 18 mg/puits. S.A.R.M: *Staphylococcus aureus* résistante à la métilicine (A): ATCC, (B): non ATCC. Valeur = moyenne  $\pm$  SD (n = 3 à 4 mesures).

La FAc/SV (Figure 17), semble avoir le spectre d'activité le plus large en inhibant la croissance des 14 souches bactériennes et la levure *Candida*. Les DI sont entre 10 et 14.5 mm pour les bactéries et de 15 mm pour *C. albicans*. L'augmentation de la concentration au double (12 mg/puits) a permis d'obtenir des DI de 14.5 mm à 16.5 mm, *L. innocua* (17 mm), *K. pneumoniae* ATCC (16.5 mm), *E. faecalis* (15.5 mm), *S.A.R.M* (15 mm), *S. aureus* ATCC (15 mm) et *E. Coli* (14.5 mm). Alors que la zone d'inhibition de *C. albicans* est de 18 mm de

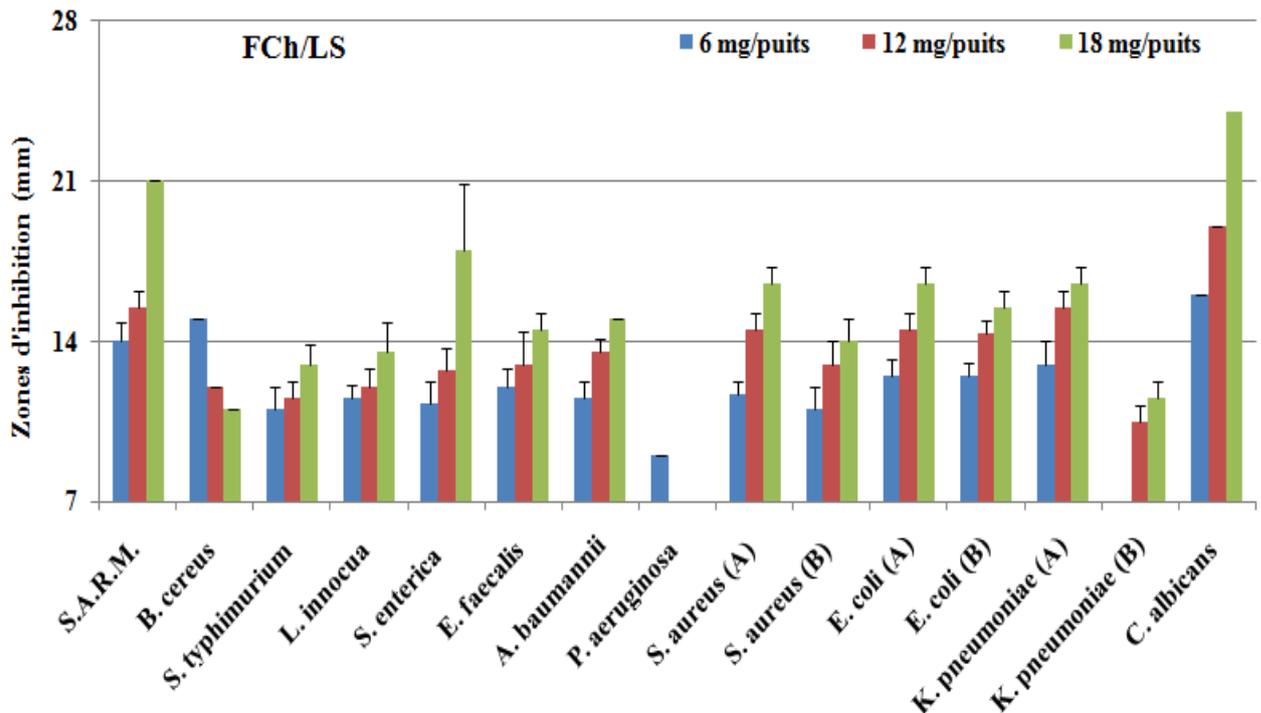
diamètre. Egalement, la troisième concentration (18 mg/puits) a été encore plus active contre les 14 souches bactériennes en produisant des DI de 11.5 à 23.75 mm parmi eux 01 diamètre est supérieur à 21 mm, 09 diamètres sont supérieurs à 14 mm et les 04 restants sont compris entre 11.5 et 13.5 mm. La plus forte activité inhibitrice est enregistrée contre *E. faecalis* 23.75 mm et contre *C. albicans* sur une zone de 25 mm de diamètre.



**Figure 17.** Activité antimicrobienne de la FAC/SV en termes des diamètres des zones d'inhibition (mm) par trois doses: 06 mg/puits, 12 mg/puits et 18 mg/puits. *S.A.R.M.*: *Staphylococcus aureus* résistante à la métilicine (A): ATCC, (B): non ATCC. Valeur = moyenne  $\pm$  SD (n = 3 à 4 mesures).

Concernant la fraction FCh/LS, les résultats obtenus montrent que cette fraction est active contre 13 bactéries en plus de *Candida* (Figure 18). Les DI sont entre 09 et 15 mm pour les bactéries et de 16 mm pour *C. albicans*. Cependant, le doublement de la dose a rendu 11 souches plus sensibles avec des DI compris entre 11.5 et 15.5 mm, notant qu'il y'a une diminution du DI contre *B. cereus* et la fraction est devenue inactive contre *P. aeruginosa* et active contre *K. pneumoniae* non ATCC en produisant un DI de 10.5 mm. Egalement, l'inhibition était maximale contre *C. albicans* avec un DI de 19 mm. Pour la troisième dose

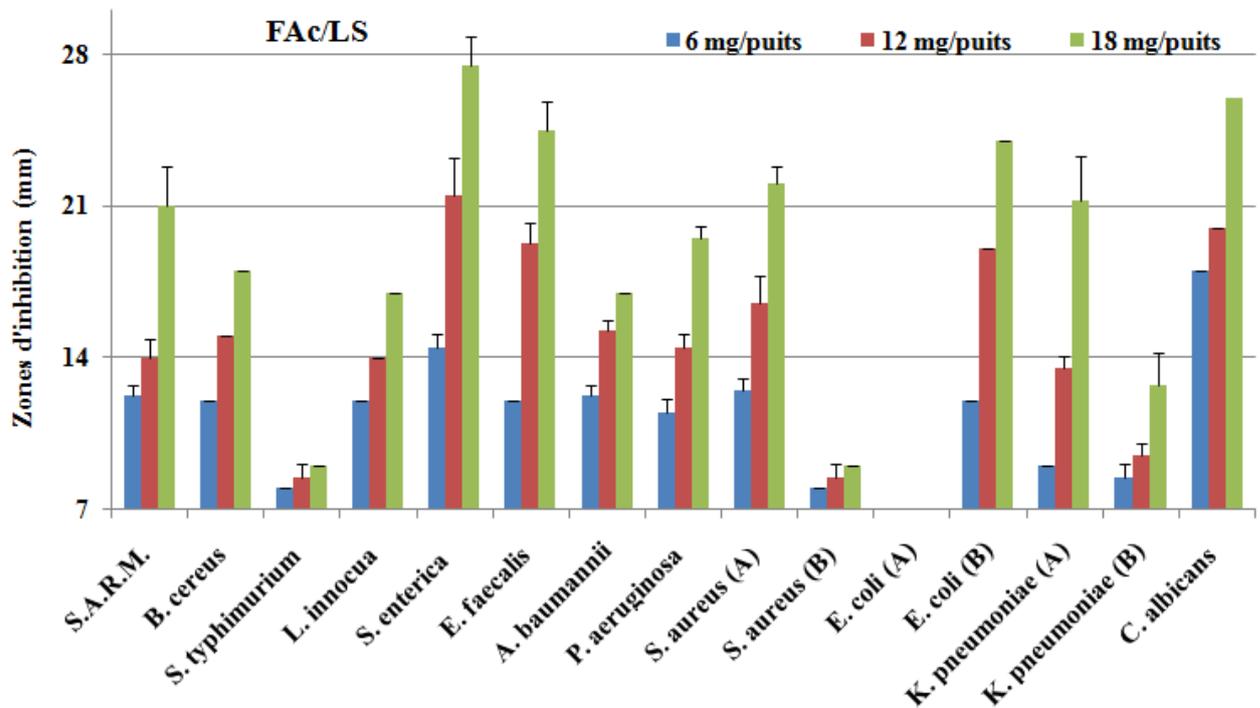
(18 mg/puits), la FCh/LS est devenue plus active contre *S.A.R.M* (21 mm), *S. enterica* (18 mm), *S. aureus* ATCC, *E. coli* ATCC et *K. pneumonie* ATCC avec le même diamètre (16.5 mm).



**Figure 18.** Activité antimicrobienne de la FCh/LS en termes des diamètres des zones d'inhibition (mm) par trois doses: 06 mg/puits, 12 mg/puits et 18 mg/puits. S.A.R.M : *Staphylococcus aureus* résistante à la meticiline (A): ATCC, (B): non ATCC. Valeur = moyenne  $\pm$  SD (n = 3 à 4 mesures).

En se qui concerne la fraction FAc/LS avec la dose 6 mg/puits, elle est moins active contre 04 souches bactériennes; *S. typhimurium*, *S. aureus* non ATCC et les deux *K. pneumonie* (DI entre 08 et 09 mm), et plus active contre 09 bactéries avec des DI de 11.5 à 14.5 mm, notant que *E. coli* ATCC n'est pas testé (Figure 19). L'utilisation de la dose 12 mg/puits a permis d'obtenir des DI plus élevés, supérieurs à 14 mm (14 à 21.5 mm). Egalement, la fraction a devenue fortement active par la troisième dose, où 06 souches bactériennes sont inhibées avec des DI très élevés: 21 mm, 21.25 mm, 22 mm, 24 mm, 24.5 mm et 27.5 mm; contre *S.A.R.M*, *K. pneumonie* ATCC, *S. aureus* ATCC, *E. coli* non ATCC, *E. faecalis* et *L. enterica*,

respectivement. En ce qui concerne la levure *Candida*, était plus sensible aux trois doses avec des DI de 18 mm (6 mg/puits), 20 mm (12 mg/puits) et 26 mm (18 mg/puits).

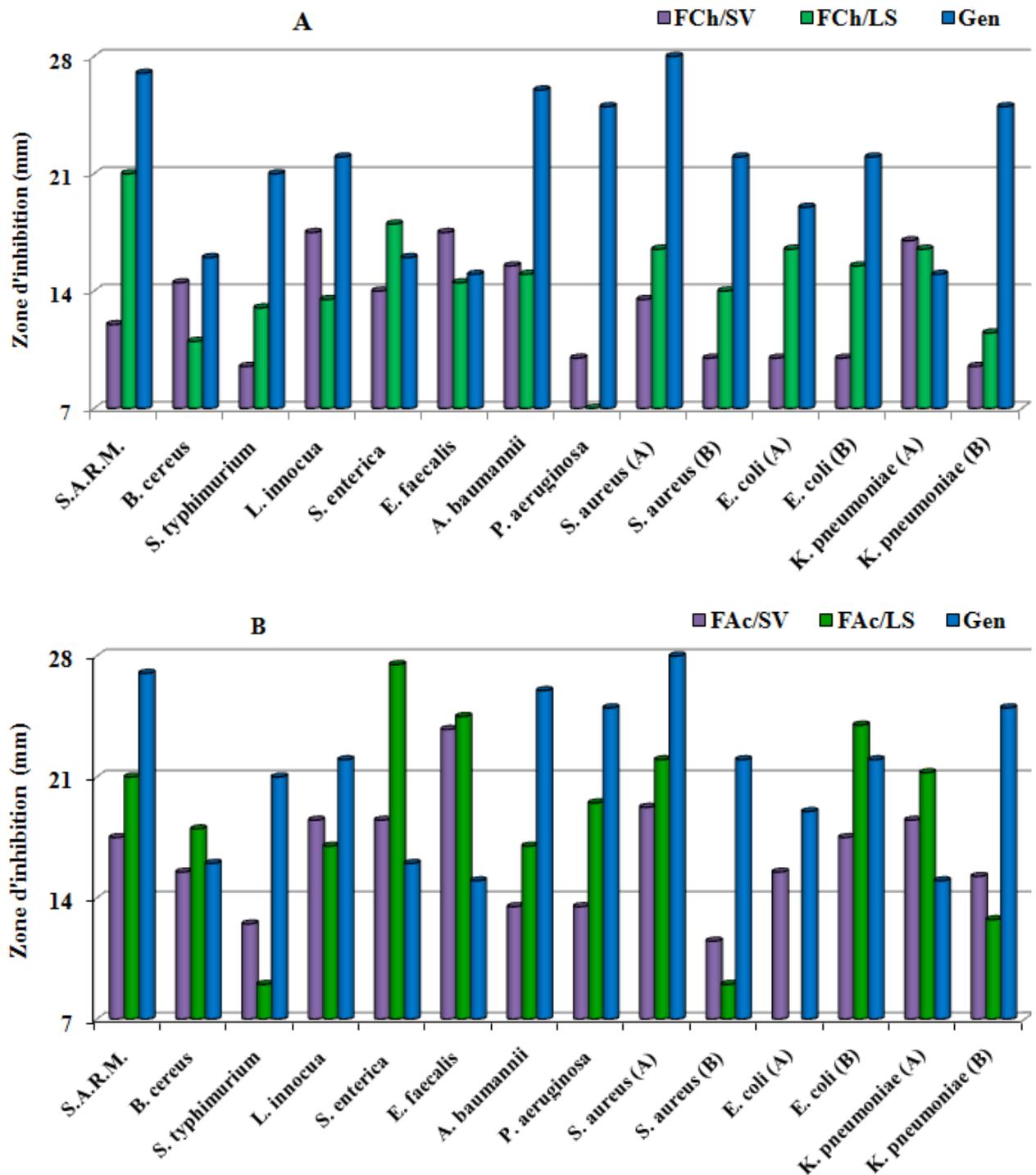


**Figure 19.** Activité antimicrobienne de la FAC/LS en termes des DI (mm) par trois doses: 06 mg/puits, 12 mg/puits et 18 mg/puits. *S.A.R.M.* : *Staphylococcus aureus* résistante à la méticiline (A): ATCC, (B): non ATCC. Valeur = moyenne  $\pm$  SD (n = 3 à 4 mesures).

## B) Comparaison avec la Gentamicine

La comparaison des DI obtenus par les deux fractions chloroformiques (FCh/SV et FCh/LS) à la dose de 18 mg/puits et la Gen (Figure 20 ; A), a permis de distinguer 05 ordres d'inhibition: **1)** 07 bactéries sont plus sensibles à la Gen (19 à 30 mm), puis à la FCh/LS (11.5 et 21 mm) et en dernier à la FCh/SV (9.5 à 13.5 mm); **2)** 04 bactéries sont plus sensibles en premier rang à la Gen (16 à 26 mm) puis à la FCh/SV (10 et 17.5 mm), tandis que, la FCh/LS était moins active (DI < 15 mm) ; **3)** 01 bactérie (*S. enterica*), est sensible beaucoup plus à la FCh/LS (18 mm), puis à la Gen (16 mm) et enfin à la FCh/SV (14 mm) ; **4)** 01 bactérie (*E. faecalis*) est plus sensible à la FCh/SV (17.5 mm) puis à la Gen (15 mm) et enfin à la FCh/LS (14.5 mm) ;

5) la bactérie restante (*K. pneumoniae* ATCC) était plus sensible à la FCh/SV (17 mm), puis à la FCh/LS (16.5 mm) et en fin à la Gen (15 mm).



**Figure 20.** Comparaison d'activité antibactérienne en termes des DI (mm), des quatre fractions par la 3<sup>ème</sup> dose (18 mg/puits) avec la gentamicine (Gen). **A:** représente les deux fractions FCh et **B:** représente les deux fractions FAc. (A): ATCC, (B): non ATCC. Valeur = moyenne  $\pm$  SD (n = 3 à 4 mesures).

En ce qui concerne les fractions FAc (Figure 20 ; B), également, 5 ordres d'inhibition sont constatées: 1) la FAc/LS a montré le meilleur effet inhibiteur sur 38.5% des bactéries, en produisant de grands DI (18 et 27.5 mm) dont 23.1% sont plus sensibles à la FAc/SV qu'à la Gen. Les autres bactéries (64.3%) ont présenté une grande sensibilité à la Gen, parmi ces bactéries, 30.8 % ont été plus sensibles à la FAc/LS (17 à 22 mm) puis à la FAc/SV (12.5 à 18.5 mm), les autres (30.8 %) ont été plus sensible à la FAc/SV que à la FAc/LS.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude, permet de conclure que les deux fractions non polaires FCh et FAc des deux plantes, sont capables d'inhiber la croissance de la totalité des bactéries testées dans l'ordre suivant: la FAc/LS la plus active suivie par la FAc/SV, puis la FCh/LS et en fin la FCh/SV. Cependant, les deux fractions FAc présentent une activité antibactérienne plus puissante par rapport aux deux fractions FCh. D'autre part, on a noté que les bactéries à Gram positif sont relativement plus sensibles à la Gen et aux quatre fractions testées que les bactéries à Gram négatif (Tableau 13).

**Tableau 13.** Diamètres des zones d'inhibition des bactéries selon le Gram

	<b>Gram+</b>	<b>Gram-</b>
<b>Gen</b>	15 - 30 mm	15 - 26 mm
<b>FCh/SV</b>	10 - 17.5 mm	09.5 - 15.5 mm
<b>FCh/LS</b>	11 - 21 mm	07 - 18 mm
<b>FAc/SV</b>	11.5 - 23.75 mm	12.5 - 18.5 mm
<b>FAc/LS</b>	09 - 24.5 mm	09 - 27.5 mm

### **C) Concentration minimale inhibitrice (CMI) des Fractions**

La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des quatre fractions: FCh/SV, FAc/SV, FCh/LS et FAc/LS a donné les résultats illustrés dans le Tableau 14. Les

valeurs de CMI obtenues pour la FCh/SV sont comprises entre 08.25 et 27.12 mg/ml, celles obtenues pour la FAc/SV sont de 07.60 à 25.47 mg/ml alors que les CMI enregistrées par la FCh/LS sont comprises entre 07.38 et 21.96 mg/ml.

Les valeurs de CMI révèlent que les souches les plus sensibles à la FAc/SV sont dans l'ordre suivant: *S. aureus* ATCC et *K. pneumonia* non ATCC, *S.A.R.M*, *E. coli* ATCC, *E. faecalis*, *B. cereus*, *L. innocua* et *E. coli* non ATCC. La majorité de ces bactéries sont Gram positives (Tableau 14). Pour la FCh/SV, l'ordre des bactéries les plus sensibles est: *E. faecalis*, *S. enterica*, *E. coli* ATCC, *K. pneumoniae* ATCC, *K. pneumoniae* non ATCC, *S.A.R.M*, *S. aureus* non ATCC, *L. innocua*, *S. typhimurium*. La majorité de ces bactéries sont Gram négatives (Tableau 14). Alors que les souches les plus sensibles à la FCh/LS sont: *S.A.R.M*, *L. innocua*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* ATCC, *K. pneumoniae* non ATCC, *S. enterica*, et *B. cereus*. La majorité de ces bactéries sont Gram positives (Tableau 14).

En tenant compte des DI produits par ces trois fractions dans l'étude menée par les puits de diffusion sur gélose. Il convient de dire que la compatibilité entre les valeurs de CMI et les DI (mm) enregistrés par les trois fractions FAc/SV, FCh/SV et FCh/LS, est moyennement faible puisque il y a des souches qu'ont été inhibées avec des DI faibles, elles sont devenues plus sensibles en termes de CMI et l'inverse (Tableau 14).

**Tableau 14.** Concentrations minimales inhibitrices (CMI) enregistrées par les quatre fractions FCh/SV, FAc/SV, FCh/LS et FAc/LS en utilisant la méthode des micro-dilutions.

Bactéries	FAc/SV	FCh/SV	FAc/LS	FCh/LS
<i>S.A.R.M.</i>	13.09 ± 0.67	12.38 ± 0.11	nt	07.38 ± 0.22
<i>B. cereus</i>	14.39 ± 0.42	27.12 ± 0.93	nt	14.90 ± 0.85
<i>S. typhimurium</i>	25.47 ± 0.18	15.00 ± 0.15	nt	17.70 ± 0.15
<i>L. innocua</i>	14.53 ± 0.11	13.88 ± 0.06	nt	07.58 ± 0.26
<i>S. enterica</i>	22.20 ± 0.00	10.00 ± 0.30	nt	14.42 ± 1.25
<i>E. faecalis</i>	13.48 ± 0.39	08.25 ± 0.00	nt	08.50 ± 0.62
<i>A. baumannii</i>	18.57 ± 0.56	19.38 ± 0.04	nt	19.39 ± 0.02
<i>P. aeruginosa</i>	21.52 ± 0.02	16.61 ± 0.15	nt	19.52 ± 0.93
<i>S. aureus (A)</i>	07.60 ± 0.15	16.62 ± 0.38	nt	15.54 ± 0.17
<i>S. aureus (B)</i>	24.37 ± 0.81	13.26 ± 0.66	nt	15.58 ± 0.05
<i>E. coli (A)</i>	13.30 ± 0.14	10.13 ± 0.24	nt	21.96 ± 0.65
<i>E. coli (B)</i>	14.98 ± 0.84	16.41 ± 0.28	nt	16.73 ± 0.20
<i>K. pneumoniae (A)</i>	17.39 ± 0.00	11.59 ± 1.15	nt	11.85 ± 0.39
<i>K. pneumoniae (B)</i>	07.97 ± 1.26	12.26 ± 1.00	nt	14.05 ± 0.37

nt : non testé, Les valeurs représentent les moyennes ± SD (n = 3).

Ces résultats obtenus par des doses élevées des fractions, peuvent être considérés meilleurs que ceux obtenus par Kostic *et al.* (2015) qu'ont appliqué différents extraits de *S. verbenaca* obtenus par différents solvants et par différentes procédures sur 08 microorganismes pathogènes à savoir *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis*, *C. albicans* et *A. niger*. Puisque, les valeurs de CMI enregistrées par la FAc et la FCh de *S. verbenaca* dans notre étude (07.60 à 27.12 mg/ml) sont faibles par rapport aux CMI

marquées par les différents extraits de *S. verbenaca* dans l'étude de comparaison (06 et 100 mg/ml).

## 2.3. Activité antifongique des extraits

### 2.3.1. Activité antifongique par la méthode des disques

Dans ce test la capacité des ESV et ELS à inhiber la croissance fongique a été évaluée contre quatre champignons filamenteux à savoir *A. flavus*, *A. Niger*, *Penicillium sp.* et *Fusarium sp.* en utilisant deux concentrations pour chaque extrait, 200 et 300 mg/ml équivalentes successivement à 06 et 09 mg/disque. Les résultats obtenus (Tableau 15), montrent qu'après 48 h d'incubation à 28°C, seul la FCh/LS et la FAc/SV ont inhibé la croissance fongique.

Selon les travaux de Delahousse (2003), la FCh/LS a manifesté par la 1<sup>ère</sup> dose (6 mg/disque), une forte activité contre *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.* et *A. Niger* avec des DI de 17, 19 et 21 mm, respectivement et une activité moyenne contre *A. flavus* avec un DI égale à 12 mm. Cependant, la FAc/SV a montré un effet inhibiteur moyen contre un seul champignon, *Fusarium sp.*, avec une zone de 10 mm de diamètre. Cependant, l'utilisation de la 2<sup>ème</sup> dose (09 mg/disque) pour la FCh/LS a permis de produire des DI plus importants, 22 et 20.5 mm contre *A. Niger* et *Penicillium sp.*, respectivement, tandis qu'elle a donné les mêmes DI contre *A. flavus* et *Fusarium sp.* produits par la 1<sup>ère</sup> dose (12 et 17 mm). Egalement, aucun effet n'a été constaté par l'élévation de la dose de FAc/SV contre *Fusarium sp.* et le DI est resté le même (10 mm). Il faut noter que le contrôle positif (Griséofulvine) est inactif contre les quatre champignons avec une dose de 30 µg/disque (Tableau 15).

**Tableau 15.** Zones d'inhibition des champignons filamenteux produites par FCh/LS et FAc/SV après 48 h d'incubation à 28 °C (DI en mm). Griséofulvine antifongique standard.

Champignons	FCh/LS		FAc/SV		Griséofulvine
	C1	C2	C1	C2	30 µg/disque
<i>A. flavus</i>	12 ± 0.00	12 ± 0.00	na	na	na
<i>A. niger</i>	21 ± 1.00	22 ± 2.45	na	na	na
<i>Penicillium sp.</i>	19 ± 1.15	20.5 ± 0.58	na	na	na
<i>Fusarium sp.</i>	17 ± 0.00	17 ± 0.00	10 ± 0.00	10 ± 0.00	na

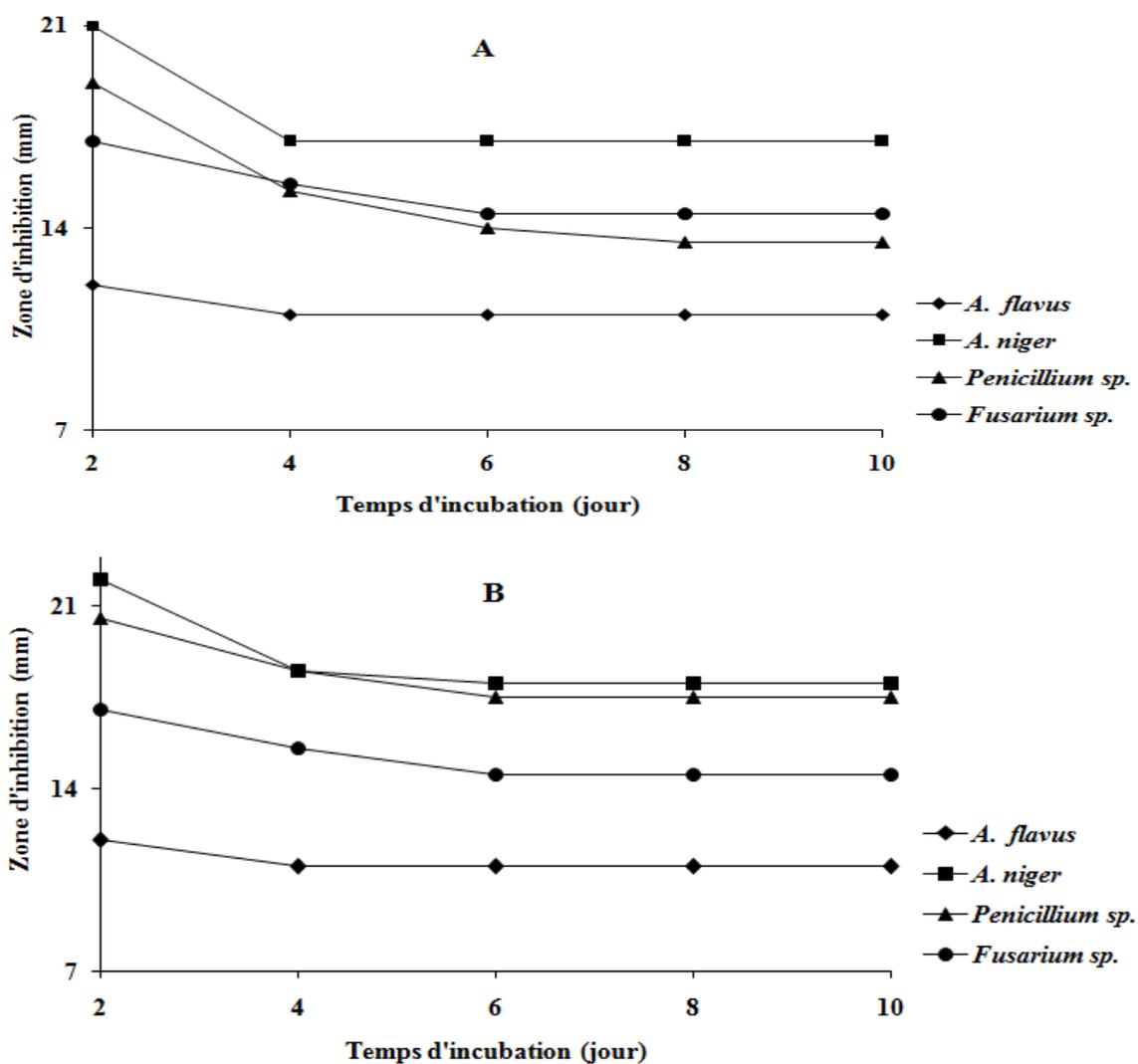
C1: 6 mg/disque, C2: 9 mg/disque, na: non actif. Valeurs exprimées en moyenne ± SD (n = 3 à 4 mesures).

Le prolongement du temps d'incubation des cultures fongiques traitées par la FCh/LS, a donné les courbes présentées dans la Figure (21 ; A et B). D'après, ces courbes, il apparaît que les zones d'inhibition produites par la FCh/LS demeuraient claires durant les 10 jours d'incubation pour les deux doses 06 mg/disque (Figure 21 ; A) et 09 mg/disque (Figure 21 ; B). En effet, après une réduction mineure des DI au 4<sup>ème</sup> jour, ces derniers sont stabilisés pour toute la période restante d'incubation. Pour la 1<sup>ère</sup> dose (Figure 21 ; A) ; *A. flavus* (11 mm contre 12 mm), *A. niger* (17 mm contre 21 mm), *Fusarium sp* (14.5 mm contre 17 mm). Cependant, dans le cas de *Penicillium sp*, la réduction a été un peu grand (13.5 mm contre 19 mm).

La diminution des DI est également observée (au 4<sup>ème</sup> jour) en utilisant la 2<sup>ème</sup> dose de la FCh/LS (Figure 21 ; B), mais les DI sont stabilisés dans la période restante jusqu'aux 10 jours d'incubation. Pour *A. flavus* le DI est devenu 11 mm contre 12 mm, *Fusarium sp* (14.5 mm contre 17 mm), *A. niger* (18 contre 22 mm) et *Penicillium sp.* (17.5 contre 20.5 mm). Par contre après une incubation de 48 h, le champignon *Fusarium sp.* a développé une résistance

contre la FAc/SV, avec disparition des zones d'inhibition due à une sporulation du champignon.

Les diminutions des DI par le prolongement du temps d'incubation, peuvent indiquer que les champignons se sont adaptés aux constituants de la FCh/LS et commençaient à développer une résistance vis-à-vis les extraits. Selon les travaux de Thembo *et al.* (2010), on peut dire que l'activité de la FCh/LS contre les quatre champignons est fongicide, par contre celle de FAc/SV contre *Fusarium sp.* est fongistatique.



**Figure 21.** Cinétiques d'inhibition de la croissance fongique en terme de diamètres des zones d'inhibition produites par la FCh/LS, en deux doses ; **A** : (C1 = 6 mg/disque) et **B** : (C2 = 9 mg/disque) durant 10 jours d'incubation à 28°C. DI exprimé en moyenne  $\pm$  SD, (n = 3 à 4 mesures).

### 2.3.2. Activité antifongique par la méthode des puits

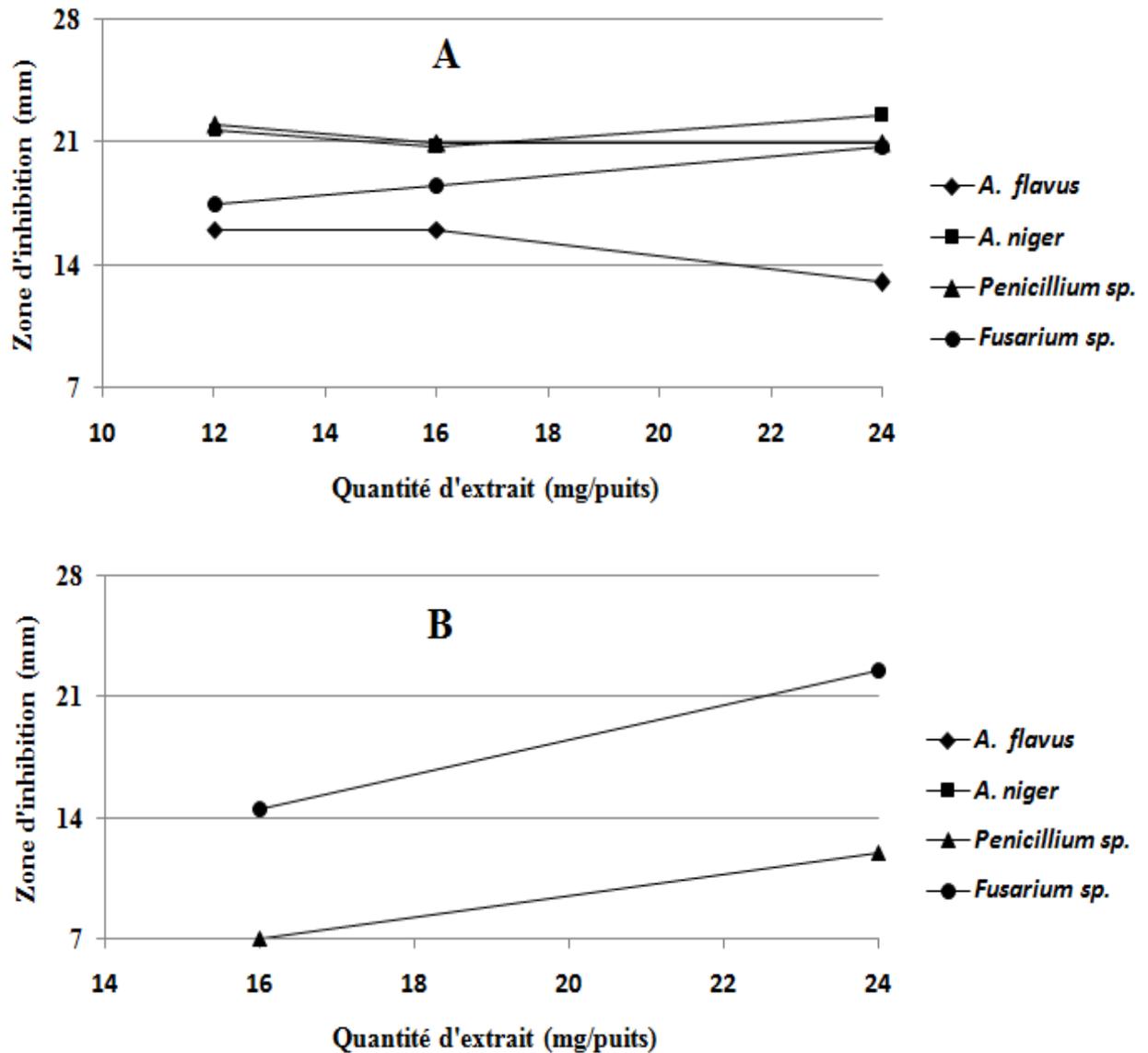
Ce test a été réalisé dans le but de connaître l'effet d'augmentation de la quantité de l'extrait mise en contact avec les champignons sur le milieu PDA. Trois doses ont été testées; (C1: 12 mg/puits, C2: 16 mg/puits, C3: 24 mg/puits) et l'antifongique Econazole (1%), a été utilisé comme témoin positif à une dose de 36 µg/puits (solubilisé dans le DMSO). Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau (16) et présentés en courbes dans la figure (22; A et B).

**Tableau 16.** Les DI (mm) produits par FCh/LS et FAc/SV contre les champignons filamenteux, après 48 h d'incubation à 28 °C, en utilisant une gamme de concentrations (mg/puits).

Champignons	FCh/LS			FAc/SV		Econazole 1%
	C1	C2	C3	C2	C3	36 µg/puits
<i>A. flavus</i>	16.0±1.15	16.0±1.15	13.0±1.15	-	-	21.0±1.4
<i>A. niger</i>	21.5±1.73	21.25±1.5	22.5±2.89	-	-	25.5±0.7
<i>Penicillium sp.</i>	21.0±0.00	21.0±1.15	21.0±2.94	-	12.00±0.0	30.0±0.0
<i>Fusarium sp.</i>	18.0±0.00	19.0±1.15	20.75±2.99	14.5±0.58	22.50±2.9	35.0±0.0

C1: 12 mg/puits, C2: 16 mg/puits, C3: 24 mg/puits. Valeurs exprimées en moyenne ± SD (n = 3 à 4).

Les résultats (Tableau 16 et Figure 22), montrent qu'il existe une certaine augmentation dans les valeurs des DI en fonction de la dose de la FCh/LS contre *A. niger* et *Fusarium sp*, tandis que le DI est resté presque constant contre *Penicillium sp.* et il est diminué contre *A. flavus* (Figure 22 ; A). L'activité antifongique de la FAc/SV contre *Fusarium sp* est dose-dépendante (Figure 22, B), l'élévation de la dose dans les puits a permis d'avoir des DI plus élevés, 14.5 mm pour la dose C2 et de 22.5 pour la dose C3, en plus de l'apparition d'une zone d'inhibition (DI = 12 mm) contre *Penicillium sp* par la dose C3 alors qu'elle était nulle par la dose C2.



**Figure 22.** Effet de la dose d'extrait sur les DI (mm) produits **A** : par la FCh/LS et **B** : par la FAc/SV. Valeurs exprimées en moyenne  $\pm$  SD (n = 3 à 4).

La comparaison entre les DI produits par la FCh/LS et ceux obtenus par l'Econazole (Tableau 16) montre que ce dernier est plus actif contre les quatre champignons notamment *Fusarium sp.* en produisant un DI de 35 mm. On peut ordonner les champignons selon leur sensibilité à la FCh/LS comme suit: *A. niger* est le plus sensible (22.5 mm), suivi par *Penicillium sp.* (21 mm) puis *Fusarium sp.* (20.75 mm) et enfin *A. flavus* (16 mm). Concernant, la sensibilité à l'Econazole l'ordre des champignons est le suivant: *Fusarium sp.* (35 mm), suivi par

*Penicillium sp* (30 mm), puis *A. niger* (25.5 mm) et en dernier *A. flavus* (21 mm). Donc, *A. flavus* est le champignon le moins sensible à la FCh/LS et à l'Econazole.

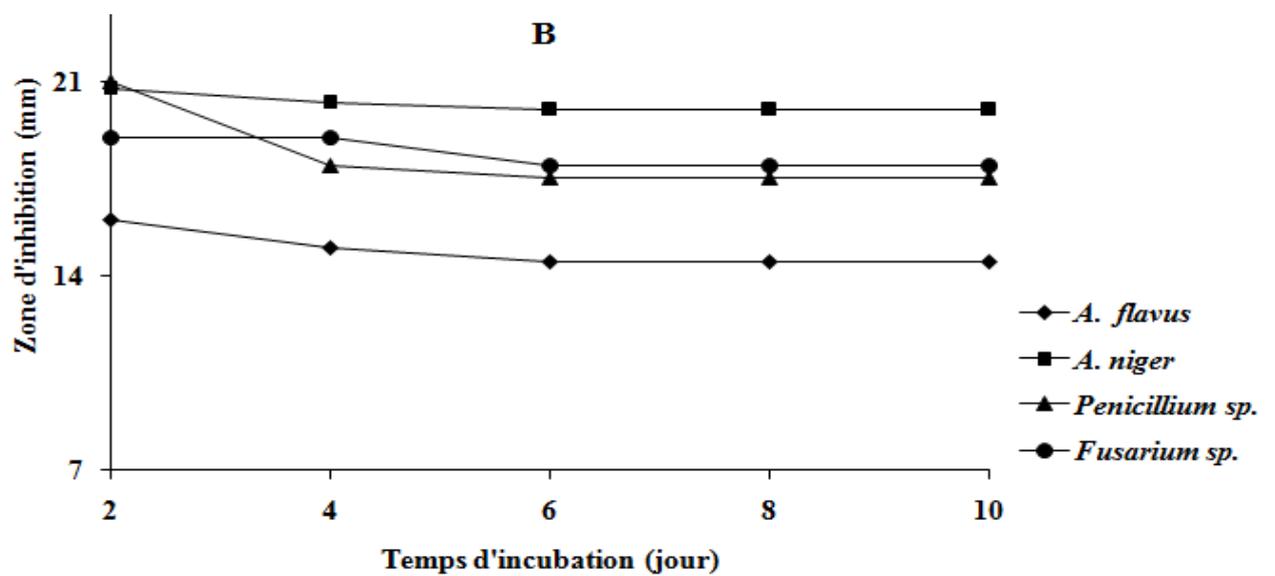
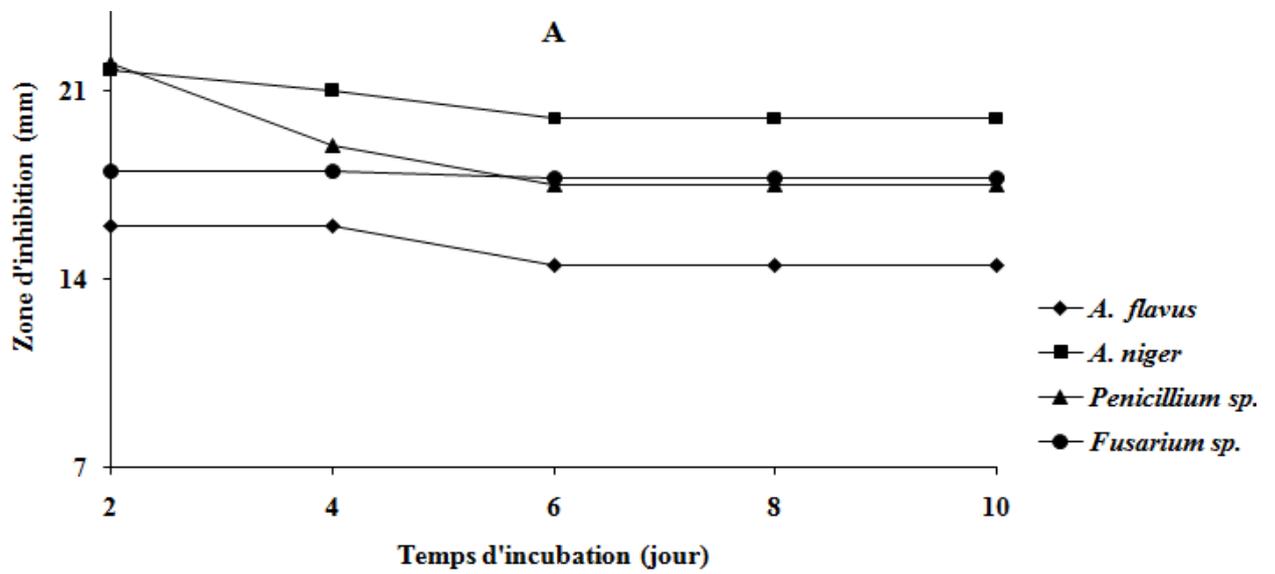
Pour déterminer la stabilité des deux fractions FCh/LS et FAc/SV concernant leurs effets inhibiteurs sur la croissance (fongicides et/ou fongistatiques), l'incubation des cultures fongiques a été prolongée jusqu'à 10 jours en mesurant les DI jour par jour (c.à.d. chaque 02 jours). Les résultats obtenus sont présentés sous forme de courbes tracées par la variation des DI en fonction du temps d'incubation (Figure 23).

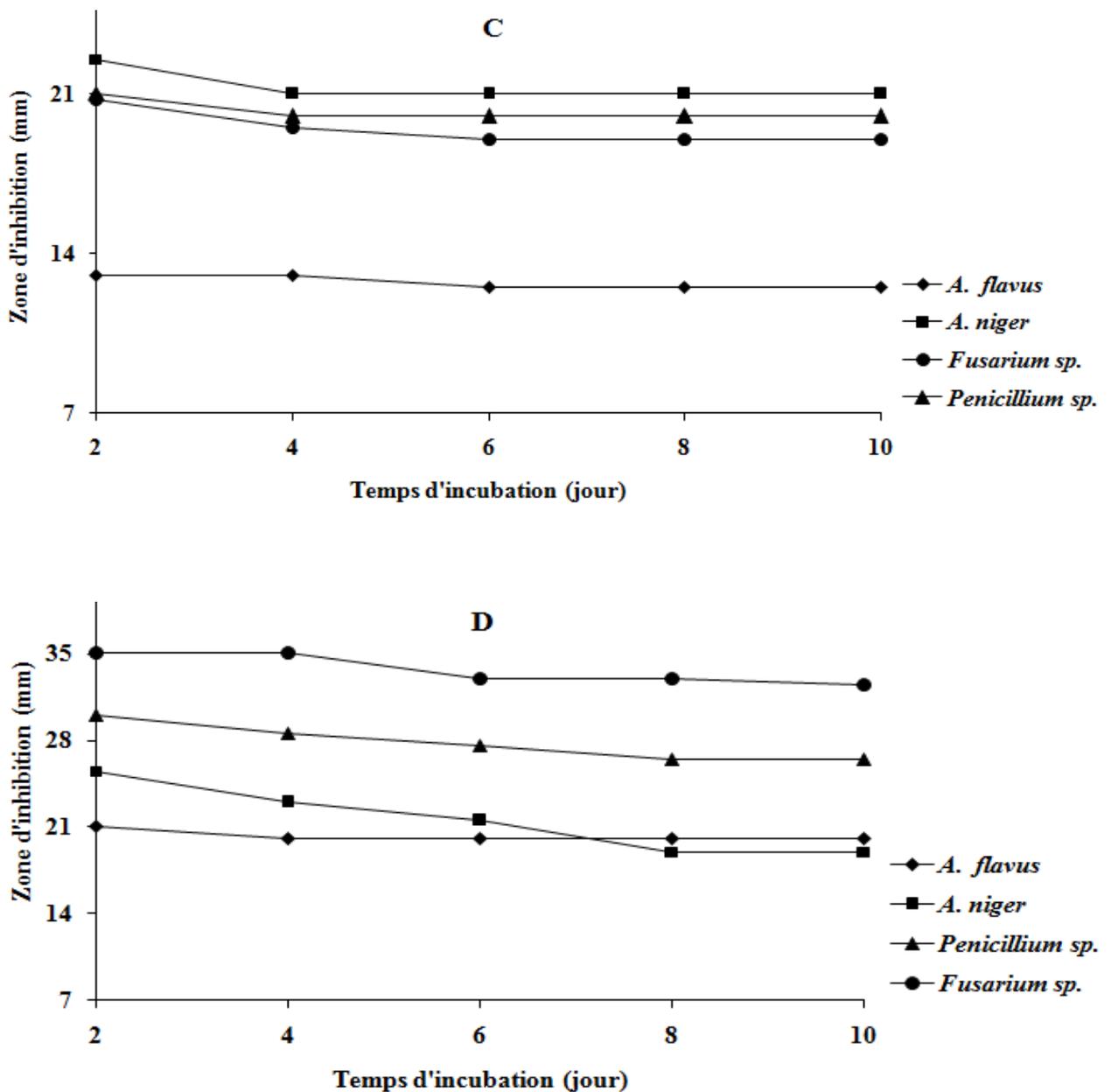
Les courbes de la Figure (23 ; A, B et C) montrent que l'effet inhibiteur de la FCh/LS sur la croissance des quatre champignons testés est maintenu pendant plus de 10 jours d'incubation puisque les zones d'inhibition sont restées claires malgré les petites réductions des DI pour certaine dose et contre certain champignon (Tableau 17). La persistance de l'activité peut indiquer que la FCh/LS est restée stable pendant la période d'incubation et que les champignons se sont adaptés au milieu mais ils n'ont pas développés une résistance vis à vis les principes actifs de cette fraction. Donc la FCh/LS a un effet fongicide vis-à-vis les quatre champignons filamenteux testés; *Fusarium sp*, *A. niger*, *Penicillium sp* et *A. flavus*.

Ces résultats sont proches de ceux de Thembo *et al.* (2010), qui ont évalué l'activité antifongique de leurs extraits en termes de CMI durant 120 h (05 jours), ils ont suggéré que les extraits présumèrent un effet fongicide puisque les faibles valeurs de CMI obtenues après 48 h sont maintenues pendant 120 h, et si la CMI a augmenté pendant la période d'incubation, un effet fongistatique apparent est implicite.

En ce qui concerne la FAc/SV, la zone d'inhibition produite contre *Penicillium sp.* par la dose 24 mg/puits (12 mm) est disparue après deux jours d'incubation, alors que les zones d'inhibition produites contre *Fusarium sp.* par la dose 16 mg/puits (14.5 contre 14.5 mm) et 24 mg/puits (21 contre 22.5 mm), sont disparues après 05 jours d'incubation ce qui signifie

que cette fraction a un effet fongistatique contre *Penicillium sp* et fongicide contre *Fusarium sp.*





**Figure 23.** Cinétiques d'activité antifongique en termes des DI (mm) durant 10 jours d'incubation à 28 °C ; **A** : FCh/LS par la dose (C1= 12 mg/puits), **B** : FCh/LS par la dose (C2 = 16 mg/puits), **C** : FCh/LS par la dose (C4 = 24 mg/puits) et **E** : Econazole (36 µg/puits). Chaque point présente la moyenne  $\pm$  SD (n = 3 à 4).

Dans la Figure (23 ; D), l'Econazole (1%) a montré une bonne stabilité aux quatre champignons testés, puisque ses zones d'inhibition ont persistées jusqu'à plus de 10 jours d'incubation. Exception faite contre *A. niger* car la zone d'inhibition a montré une petite

réduction notamment dans les derniers quatre jours de 25.5 mm à 19 mm de diamètre. Cela peut indiquer que l'Econazole a un effet fongicide contre les quatre champignons.

**Tableau 17.** Les DI (mm) produits par FCh/LS et l'Econazole contre les champignons filamenteux, après 02 et 10 jours d'incubation à 28 °C,

Champignons	FCh/LS						Econazole 1%	
	C1		C2		C3		36 µg/puits	
	02 j	10 j	2 j	10 j	2 j	10 j	2 j	10 j
<i>A. flavus</i>	16.0±1.15	14.5±0.58	16.0±1.15	14.5±0.58	12.0±1.15	12.5±0.58	21.0±1.41	20.0±0.00
<i>A. niger</i>	21.5±1.73	20.0±0.00	21.25±1.5	20.0±1.63	22.5±2.89	21.0±0.00	25.5±0.71	19.0±1.41
<i>Penicillium sp.</i>	21.0±0.00	17.5±0.58	21.0±1.15	17.5±0.58	21.0±2.94	20.0±1.15	30.0±0.0	26.5±0.71
<i>Fusarium sp.</i>	18.0±0.00	17.75±0.50	19.0±1.15	18.0±0.00	20.75±2.99	19.0±2.31	35.0±0.00	32.5±0.71

C1: 12 mg/puits, C2: 16 mg/puits, C3: 24 mg/puits, j : jours. Valeurs exprimées en moyenne ± SD (n =3 à 4).

Nonobstant que, la FCh/LS a montré une forte activité par les petites doses contre les quatre champignons, elle a révélé une faible augmentation des DI avec les grandes doses. Cela peut être expliqué par la mauvaise diffusion des principes actifs de l'extrait sur le milieu PDA à raison que l'augmentation de la concentration des molécules rend l'extrait sous un aspect lourd ou visqueux, ce qui défavorise leur diffusion sur le milieu gélosé. Il est connu également que la fraction chloroformique (FCh) selon (Markham, 1982) contient beaucoup plus des flavonoïdes aglycones caractérisés par une mauvaise diffusion sur la gélose (Osawa *et al.*, 1992). Pour cette raison Cushnie et Lamb (2005), ont mentionné que les essais basés sur la

diffusion des flavonoïdes peuvent ne pas donner une mesure quantitative fiable de l'activité antibactérienne car un flavonoïde antibactérien puissant peut avoir un faible taux de diffusion.

En outre, les extraits testés (ESV et ELS) sont des mélanges complexes de molécules de natures chimiques différentes, ce qui signifie qu'il est possible que les principes actifs dotés d'activité antibactérienne et antifongique ont trouvé des obstacles ont empêché à mettre en évidence leur rôle réel dans l'inhibition de la croissance microbienne. Akrayi et Tawfeeq (2012), ont rapporté que si le principe actif est présent dans l'extrait et avec des quantités suffisamment élevées, il pourrait y avoir d'autres constituants exerçant des effets antagonistes sur leurs effets positifs, réduisant ainsi à zéro l'activité antimicrobienne du principe.

Les résultats des activités antimicrobiennes concernant les extraits des graines de *L. sativum* (ELS), sont en accord avec ceux obtenus par Adam *et al.* (2011). Ces derniers ont trouvé que l'extrait d'éther de pétrole (non polaire) est plus actif que l'extrait aqueux et du méthanol. Ils ont trouvé aussi comme nous l'avons vu dans notre étude que le DI produit par l'extrait d'éther de pétrole diminue avec l'élévation de la dose ce qui explique la mauvaise diffusion de cet extrait sur les milieux gélosés avec les grandes concentrations. Par contre, l'effet inhibiteurs des deux extraits méthanolique et aqueux ont été dose-dépendant.

Adam *et al.* (2011), Falana *et al.* (2014) et Parajapati (2014), ont expliqué l'activité antimicrobienne des extraits de graines de *L. sativum* par la présence d'isothiocyanate de benzyle de flavonoïdes, de tanins, de triterpènes, d'alcaloïdes, de stérols et de glucosinolates. Les tanins en particulier agissent par inhibition de la synthèse protéique en formant un complexe irréversible avec des protéines riches en proline (Adam *et al.*, 2011; Falana *et al.*, 2014).

L'activité antimicrobienne de nos extraits notamment les fractions non polaires est attribuée sans doute à leur contenu en composés phénoliques, qui sont connus pour causer des

dommages aux membranes cellulaires, provoquant des fuites de matériaux cellulaires et finalement la mort du microorganisme (Cox *et al.*, 2001). Aleksic et Knezevic (2014), ont également associé les propriétés antifongiques du myrte à leur contenu élevé en polyphénols et en monoterpènes oxygénés.

En effet, il est rapporté que l'activité antimicrobienne des composants phytochimiques des extraits, peut être exercée par différents modes d'action au niveau cellulaire en raison de leur nature chimique et de leur quantité, à savoir (1) la désintégration de la membrane cytoplasmique, (2) l'interaction avec les protéines membranaires (ATP ases et autres), (3) la perturbation de la membrane externe des bactéries Gram négatives avec la libération des lipopolysaccharides, (4) la déstabilisation de la force motrice du proton avec une fuite d'ions, (5) la coagulation du contenu cellulaire et (6) l'inhibition de la synthèse enzymatique (Aleksic et Knezevic, 2014 ; Amensour *et al.*, 2010 ; Hammer *et al.*, 2008 ; Bakkali *et al.*, 2008 ; Di Pasqua *et al.*, 2007 ; Burt, 2004 ; Cox *et al.*, 2001).

Les modes d'action antifongiques sont assez similaires à ceux décrits pour les bactéries, en ce qui concerne les dommages irréversibles de la membrane cellulaire et la coagulation du contenu cellulaire (Djilani et Dicko 2012). Il existe des phénomènes supplémentaires qui sont également importants lorsque les levures sont considérées. Le premier est l'établissement d'un gradient de pH à travers la membrane cytoplasmique, et le second bloque la production d'énergie de levures qui entraîne une perturbation de la membrane cellulaire (Djilani et Dicko, 2012).

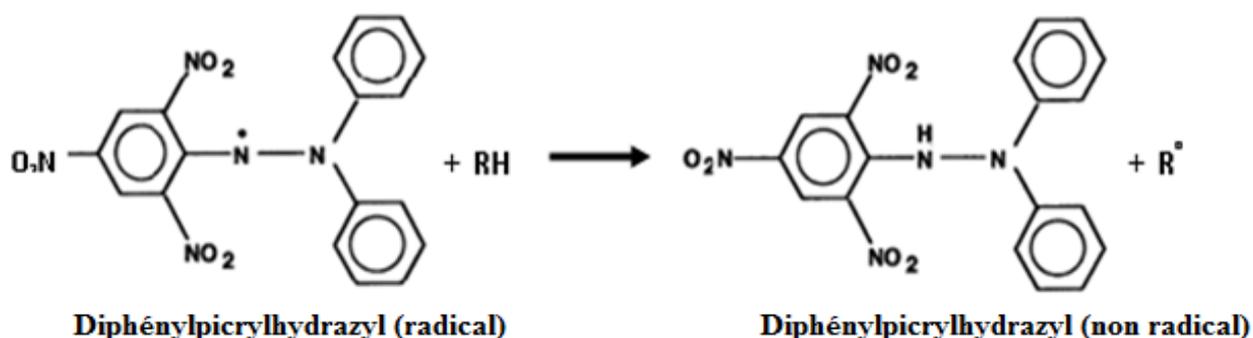
Concernant le Gram des bactéries, plusieurs études ont lié la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens à la structure morphologique et à la composition chimique de leurs membranes (Delaquis *et al.*, 2002). Or, la résistance de nombreuses bactéries Gram-négatives a été associée à leur membrane externe phospholipidique constituée principalement de

polysaccharides. Cette membrane est considérée imperméable, empêchant les inhibiteurs de passer au travers (Nostro *et al.*, 2000 ; Hailu *et al.*, 2005). Par contre, au manque de membrane externe, les bactéries Gram positives seront plus sensibles aux antimicrobiens.

### 3. Activité antioxydante *in vitro*

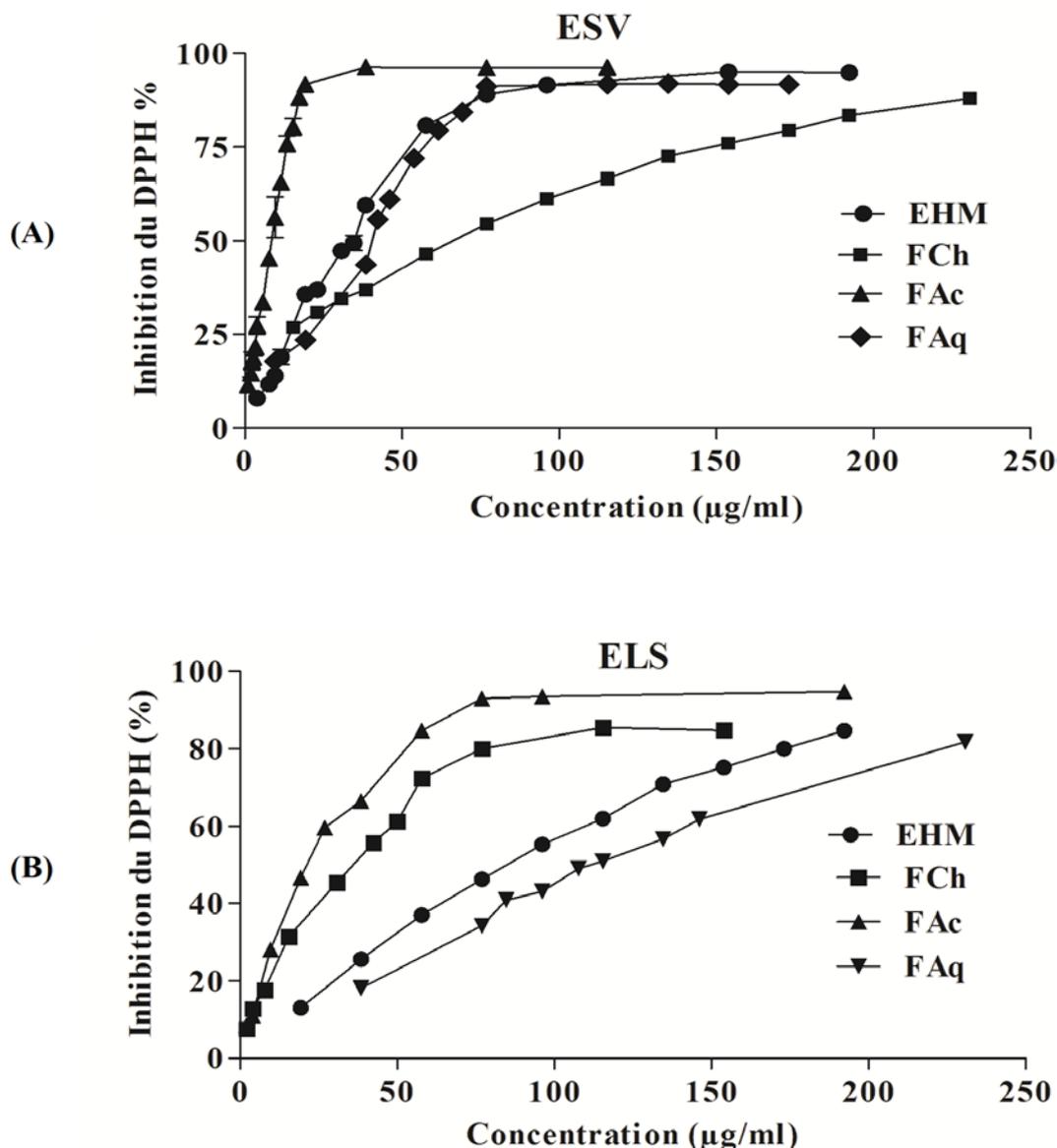
#### 3.1. Piégeage du radical DPPH•

Le DPPH; 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est un radical libre possédant un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure 24). Cette délocalisation, empêche la dimérisation des molécules du radical DPPH• et restent dans leur forme monomère relativement stable. La délocalisation donne aussi une couleur pourpre caractéristique à la solution de DPPH• absorbe à 515-518 nm (Popovici *et al.*, 2009). Alors, la mesure de l'effet scavenger d'un antioxydant sur ce radical se fait spectrométriquement en mesurant la diminution de la coloration pourpre, due à une réduction des radicaux DPPH• (Figure 24).



**Figure 24.** La réduction du radical DPPH par un proton d'hydrogène.

La Figure 25, montre que l'effet scavenger du radical DPPH• exercé par les ESV (Figure 25 ; A) et les ELS (Figure 25 ; B) est dose-dépendant. Egalement, ces résultats sont exprimés par le calcul des IC<sub>50</sub> (concentrations inhibitrices de 50 % des radicaux DPPH•), or l'extrait possédant l'IC<sub>50</sub> la plus faible, exerce l'activité anti-radicalaire la plus puissante. Le BHT a été utilisé comme contrôle positif, il a donné une IC<sub>50</sub> de 04.83 ± 0.15 µg/ml.

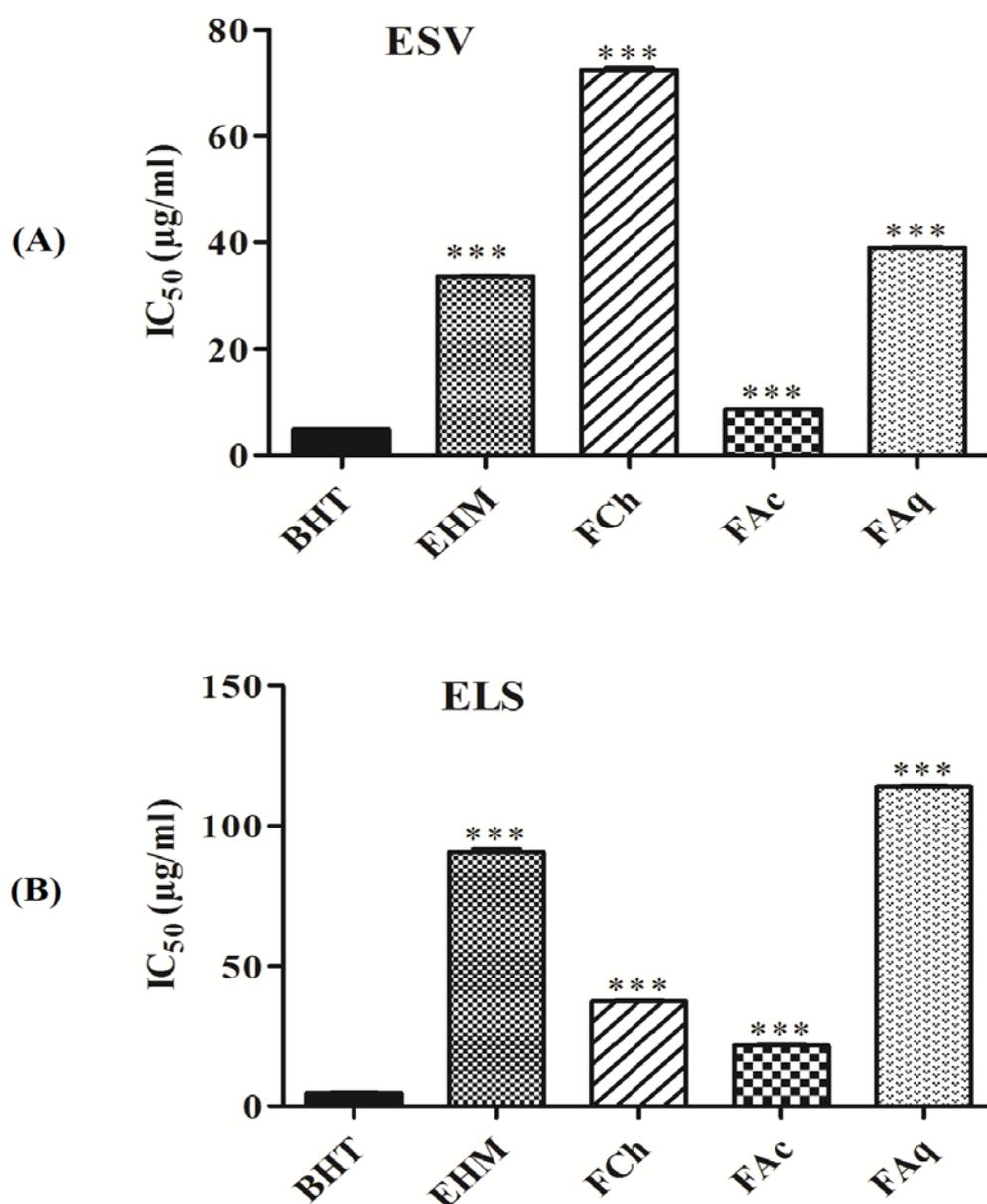


**Figure 25.** La variation des pourcentages d'inhibition du radical DPPH avec la concentration des extraits (A) ESV et (B) ELS. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  SD (n=3).

La comparaison entre les ESV dans la Figure 26, montre que la FAc présente l'effet scavenger le plus puissant du radical DPPH $\cdot$  ( $IC_{50} = 08.56 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$ ), suivi par l'EHM, la FAq et la FCh avec des  $IC_{50}$  de  $33.56 \pm 0.23$ ,  $38.93 \pm 0.33$  et  $72.51 \pm 0.84 \mu\text{g/ml}$ , respectivement (Figure 26 ; A). En ce qui concerne les ELS, la FAc exhibite la meilleure activité antiradicalaire sur le radical DPPH $\cdot$  ( $IC_{50} = 21.51 \pm 0.64 \mu\text{g/ml}$ ) suivi par la FCh

( $37.17 \pm 0.59 \mu\text{g/ml}$ ) puis l'EHM ( $90.53 \pm 2.03 \mu\text{g/ml}$ ) et en fin la FAq ( $114.11 \pm 0.26 \mu\text{g/ml}$ ), notant que les différences entre leurs  $\text{IC}_{50}$  sont très significatives (Figure 26 ; B).

La comparaison entre les ESV et les ELS, montre que l'EHM/SV et ses deux fractions FAc et FAq manifestent de fortes activités antiradicalaires par rapport aux ELS, car les  $\text{IC}_{50}$  enregistrées par les premiers sont plus faibles ( $p < 0.001$ ).



**Figure 26.** Effet scavenger du radical DPPH (A) des ESV et (B) des ELS, exprimé par les valeurs d' $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ).  $\text{IC}_{50}$  = moyenne  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \*\*\*:  $p < 0.001$ , ns: non significatif, comparant avec le BHT.

Une forte corrélation est aperçue entre l'activité antiradicalaire des ESV et les ELS et leurs teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes à l'exception de la FCh/SV. Cette dernière est riche en polyphénols et notamment en flavonoïdes mais elle a montré une faible activité par rapport aux ESV. Ça peut être expliqué selon Popovici *et al.* (2009) par la nature des molécules anti-radicalaires en particulier les polyphénols, qui ont une grande hétérogénéité structurale se traduisant par des différences dans leurs propriétés antioxydantes.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Senguttuvan *et al.* (2014) qui ont trouvé que l'activité antiradicalaire de l'extrait d'acetate d'ethyle de *Hypochaeris radicata* est plus puissante que l'activité des extraits préparés par autres solvants tels que le méthanol, l'éther de petrol, le chloroforme et l'eau. Ils ont attribué cette puissance à la présence d'une teneur plus élevée en flavonoïdes, qui sont les biocomposants les plus nécessaires pour l'activité antiradicalaire. A côté de l'extrait d'acetate d'ethyle, ils ont trouvé l'extrait méthanolique aussi efficace et ils ont expliqué son activité par la présence d'une teneur plus élevée en polyphénols et en tannins. Tepe *et al.* (2008) ont trouvé la capacité antiradicalaire de l'extrait méthanolique de *S. verbenaca* extrêmement puissante ( $IC_{50} = 14.30 \pm 1.42 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) comparant à l'extrait méthanolique de deux autres *Salvia*. Ces auteurs ont suggéré que l'acide rosmarinique et ses dérivés sont plus susceptibles d'être responsables de l'activité antioxydante.

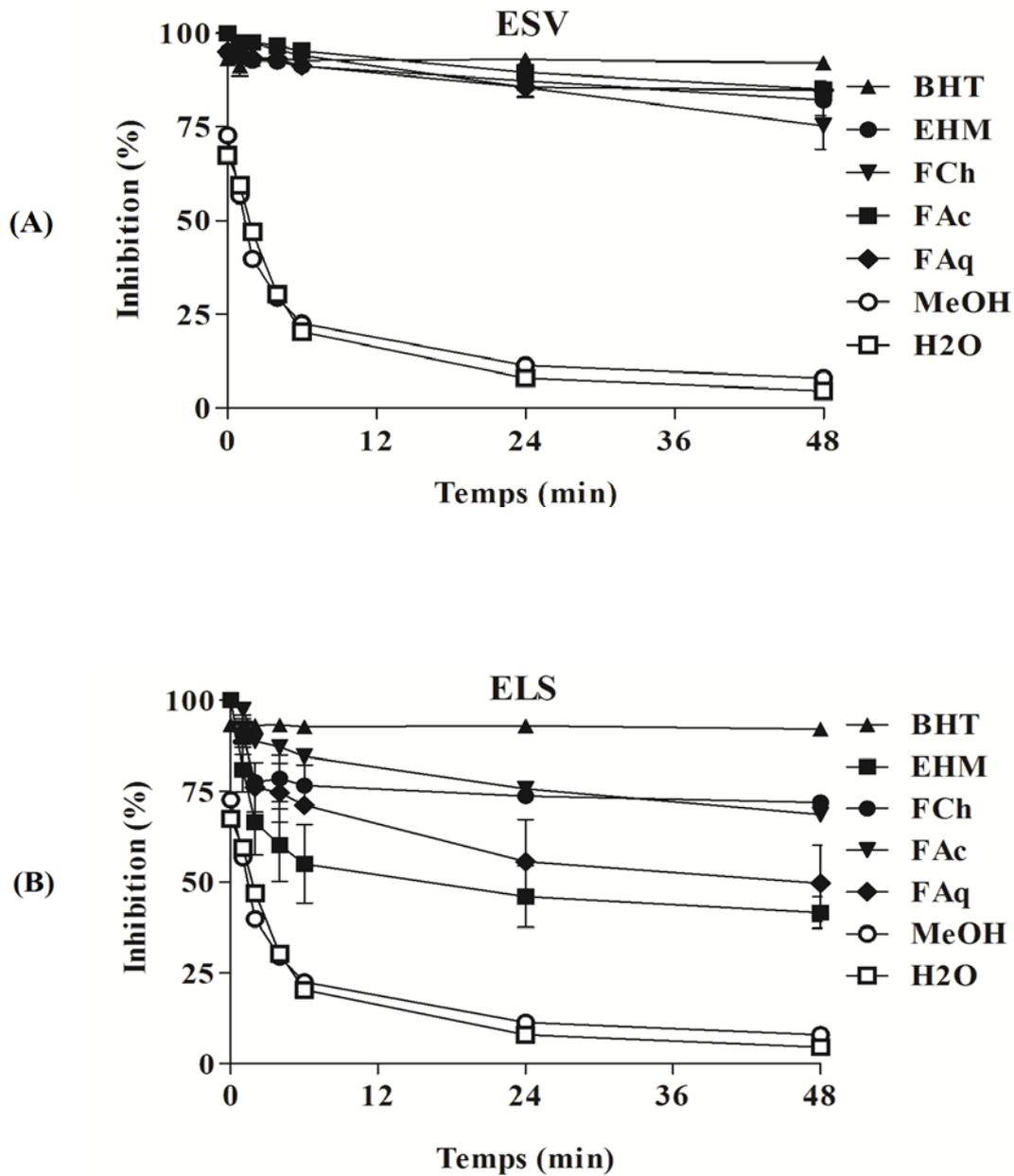
L'EHM de *S. verbenaca* testé dans notre étude a montré une  $IC_{50}$  de  $33,6 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Cette valeur est presque identique aux résultats trouvés par Ben Farhat *et al.* (2013);  $IC_{50}$  entre  $24.47 \pm 1.87$  et  $40.91 \pm 0.50 \mu\text{g}/\text{ml}$ . En ce qui concerne l'EHM/LS ( $IC_{50} = 90,5 \pm 2,0 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), il peut être considéré plus actif comparant aux résultats de Shirwaikar *et al.* (2001), qui ont enregistré une  $IC_{50}$  de  $171.13 \mu\text{g}/\text{ml}$  pour l'extrait éthanolique des graines de *L. sativum*.

### 3.2. Inhibition d'oxydation du $\beta$ -carotène

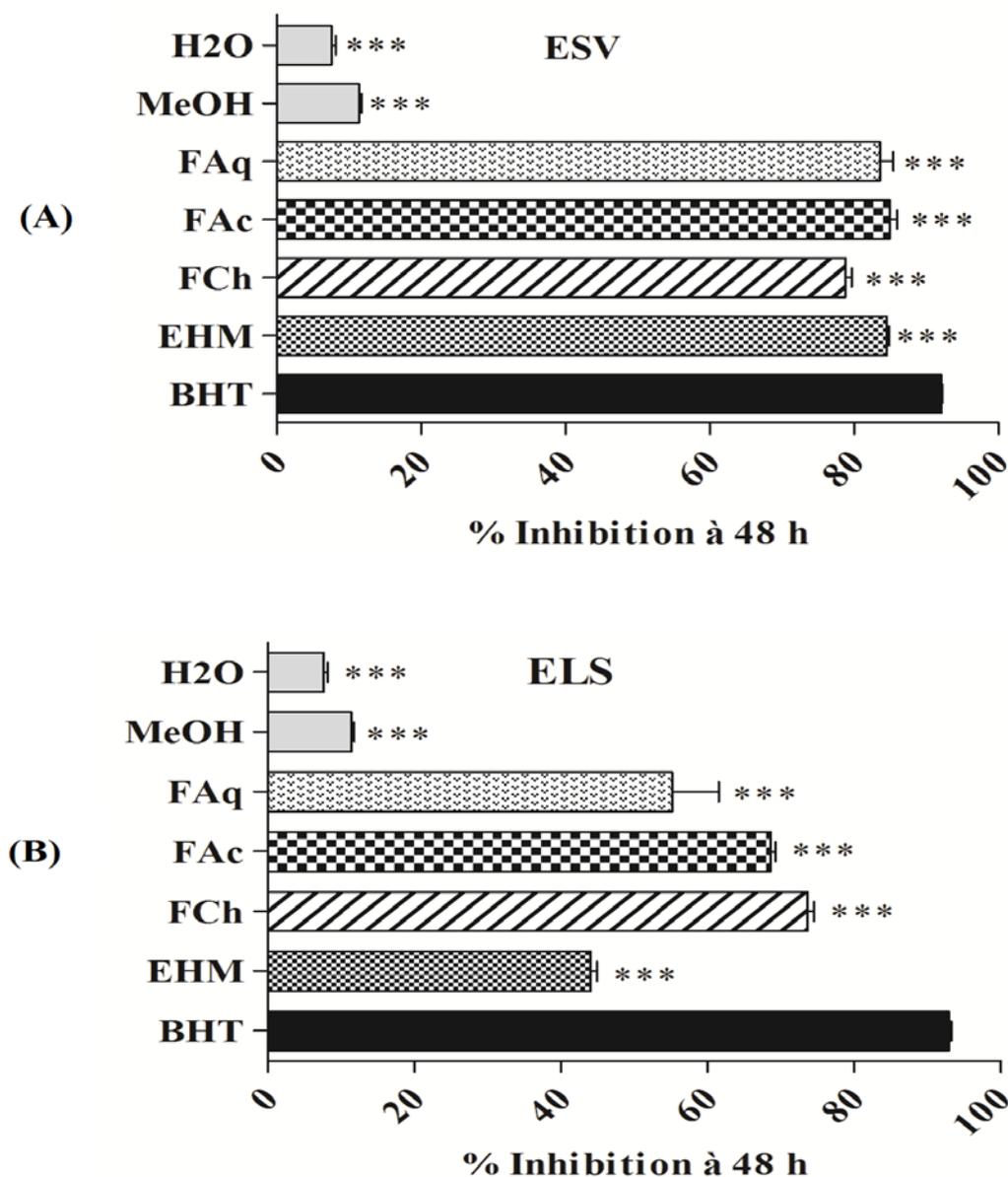
Le potentiel antioxydant des extraits ESV et ELS, est évalué dans cette technique, par la détermination de leur capacité à inhiber l'oxydation du  $\beta$ -carotène par les diène-hydroperoxydes conjugués issus de l'oxydation de l'acide linoléique. En effet, ce phénomène conduit à la diminution de l'absorbance du mélange réactionnel survenant de blanchissement de  $\beta$ -carotène. La substance antioxydante, joue un rôle protecteur et empêche ou ralentit cette oxydation. Cet effet protecteur est exprimé par le taux d'inhibition du blanchissement de  $\beta$ -carotène durant 48 h d'incubation dans les temps: 0, 1, 2, 4, 6, 24 et 48 h.

La Figure (27 ; A et B) montre la variation des pourcentages d'inhibition d'oxydation du  $\beta$ -carotène dans le temps. Les cinétiques durant 48 h, montrent que les ESV sont plus actifs que les ELS. Cette différence d'activité se manifeste clairement entre les courbes des ESV qui sont condensées et très proches à celle du BHT (Figure 27 ; A) et les courbes des ELS qui sont éloignées et montrent une diminution du pourcentage d'inhibition (I%) avec le temps (Figure 27 ; B).

La Figure (28 ; A et B), montre le taux d'inhibition de blanchissement du  $\beta$ -carotène au temps 48 h, exercée par les ESV et les ELS comparant au contrôle positif (BHT) à la dose test de 2 mg/ml. Les ESV ont donné des pourcentages d'inhibition excellents et comparables à celui du BHT (Figure 28 ; A). Ils ont été dans l'ordre: FAc ( $84.94 \pm 0.96$  %), presque égale à celui de l'EHM ( $84.52 \pm 0.31$  %), puis la FAq ( $83.56 \pm 1.88$  %) et enfin la FCh ( $78.81 \pm 0.84$  %). Concernant les ELS, ils ont présenté des effets modestes par rapport au BHT avec des différences très significatives ( $p < 0.001$ ). Ils ont été dans l'ordre: FCh ( $74.10 \pm 0.78$  %), FAc ( $68.99 \pm 0.31$  %), FAq ( $44.60 \pm 6.36$  %) et finalement l'EHM ( $44.06 \pm 0.83$  %) (Figure 28 ; B).



**Figure 27.** Cinétiques de protection du  $\beta$ -carotène contre l'oxydation; (A) : en présence des ESV, (B) : en présence des ELS. BHT: contrôle positif, MeOH et H<sub>2</sub>O: contrôles négatifs. I% = moyenne  $\pm$  SD (n=3).



**Figure 28.** Comparaison entre les pourcentages d'inhibition d'oxydation du  $\beta$ -carotène, présentés par (A): les ESV, (B): les ELS et celui du BHT (Con +) après 48 h d'incubation. I% à 48 h = moyenne  $\pm$  SD (n=3).

Le test de  $\beta$ -carotène / acide linoléique est très utile comme modèle mimétique de la peroxydation lipidique dans les membranes biologiques (Ferreira *et al.*, 2006). Il a été rapporté que l'échantillon qui inhibe ou retarde le blanchissement du  $\beta$ -carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme antioxydant primaire (Liyana-Pathirana et Shahidi, 2006). Les résultats enregistrés par les ESV dans l'inhibition d'oxydation du  $\beta$ -

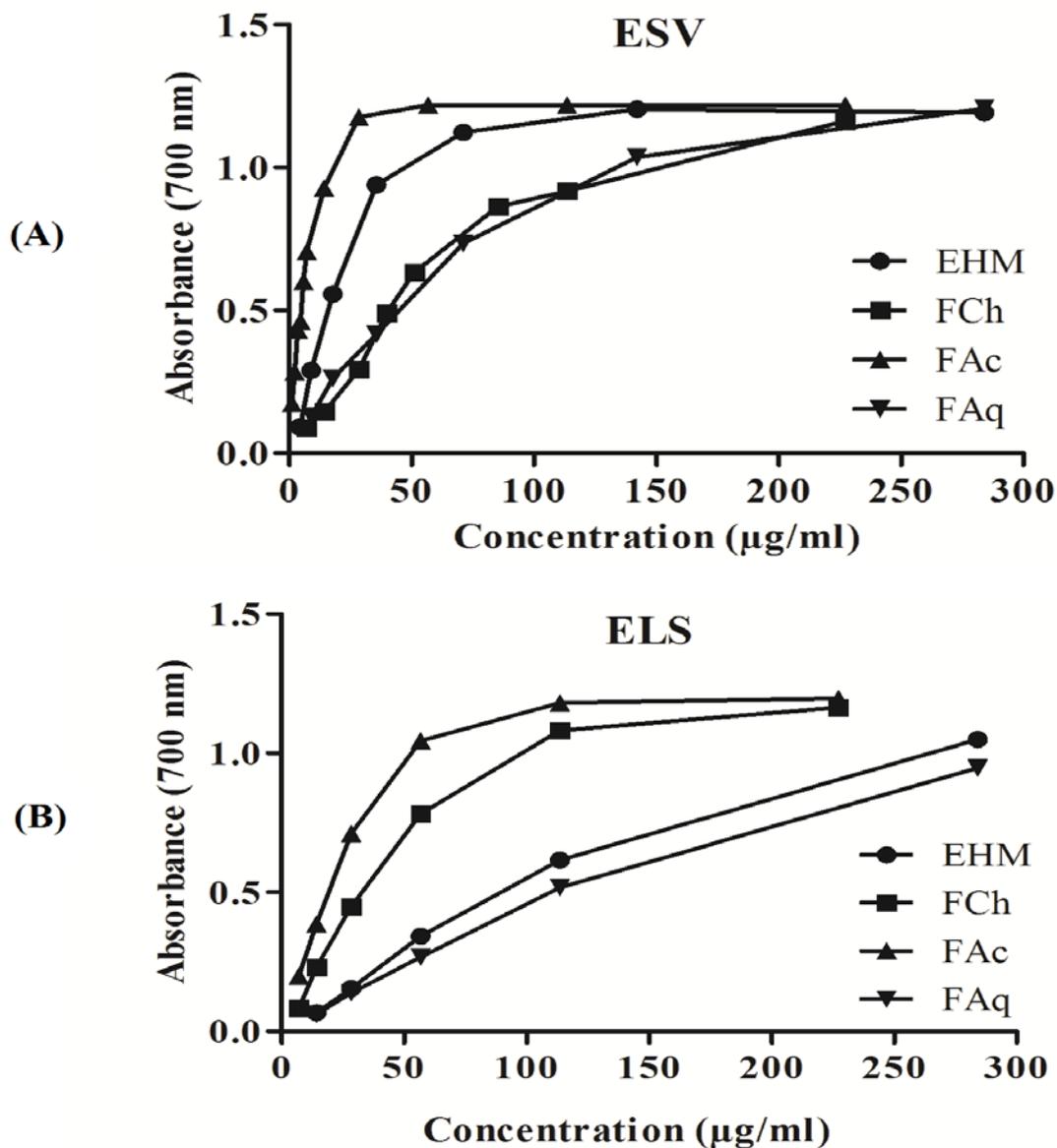
carotène sont en accord avec les résultats obtenus par Baghiani *et al.* (2010) et par Belkhiri et Baghiani (2017), qui ont testé les mêmes extraits (EHM et ses trois fractions FCh, FAc et FAq) de *Carthamus caeruleus*. Les résultats obtenus pour les ELS sont en accord avec les résultats enregistrés par les mêmes extraits des racines de *Capparis spinosa* étudiés par Baghiani *et al.* (2012), ainsi que, les résultats obtenus par Belkhiri *et al.* (2015) sur les extraits des racines de *Tamus communis*. Les deux études ont trouvé que les deux fractions non polaires (FCh et FAc) ont une activité antioxydante significativement plus puissante comparant à l'EHM et la FAq.

La bonne corrélation existée entre l'activité antioxydante de la plupart des extraits ESV et ELS et leurs teneurs en polyphénols ou en flavonoïdes en particulier les ESV, peut indiquer que cette activité est attribuable sans doute à la présence de ces composés dans les extraits. Il a été signalé que les polyphénols jouent un rôle important dans la stabilisation de la peroxydation lipidique (Baghiani *et al.*, 2010) et que l'activité antioxydante des polyphénols peut être largement prédite en fonction de leur structure chimique (Rastija et Medic-Saric, 2009).

### 3.3. Pouvoir réducteur du fer ferrique en fer ferreux

Le pouvoir réducteur des extraits ESV et ELS a été mesurée selon la méthode de Oyaizu (1986). Selon cette méthode, la réduction de  $Fe^{3+}$  à  $Fe^{2+}$  est déterminée en mesurant l'absorbance du complexe bleu prussien de Perl. Elle est basée sur la réduction du ferricyanure ( $Fe^{3+}$ ) en excès stœchiométrique par rapport aux antioxydants. La présence d'agents réducteurs dans les extraits provoque la conversion du complexe ferricyanure /  $Fe^{3+}$  à la forme ferreuse ( $Fe^{2+}$ ). Le  $Fe^{2+}$  est surveillé en mesurant la formation du bleu prussien de Perl à 700 nm, avec une augmentation de l'absorbance indiquant une augmentation de la puissance réductrice. Alors, la capacité de réduction des extraits peut servir d'indicateur important de

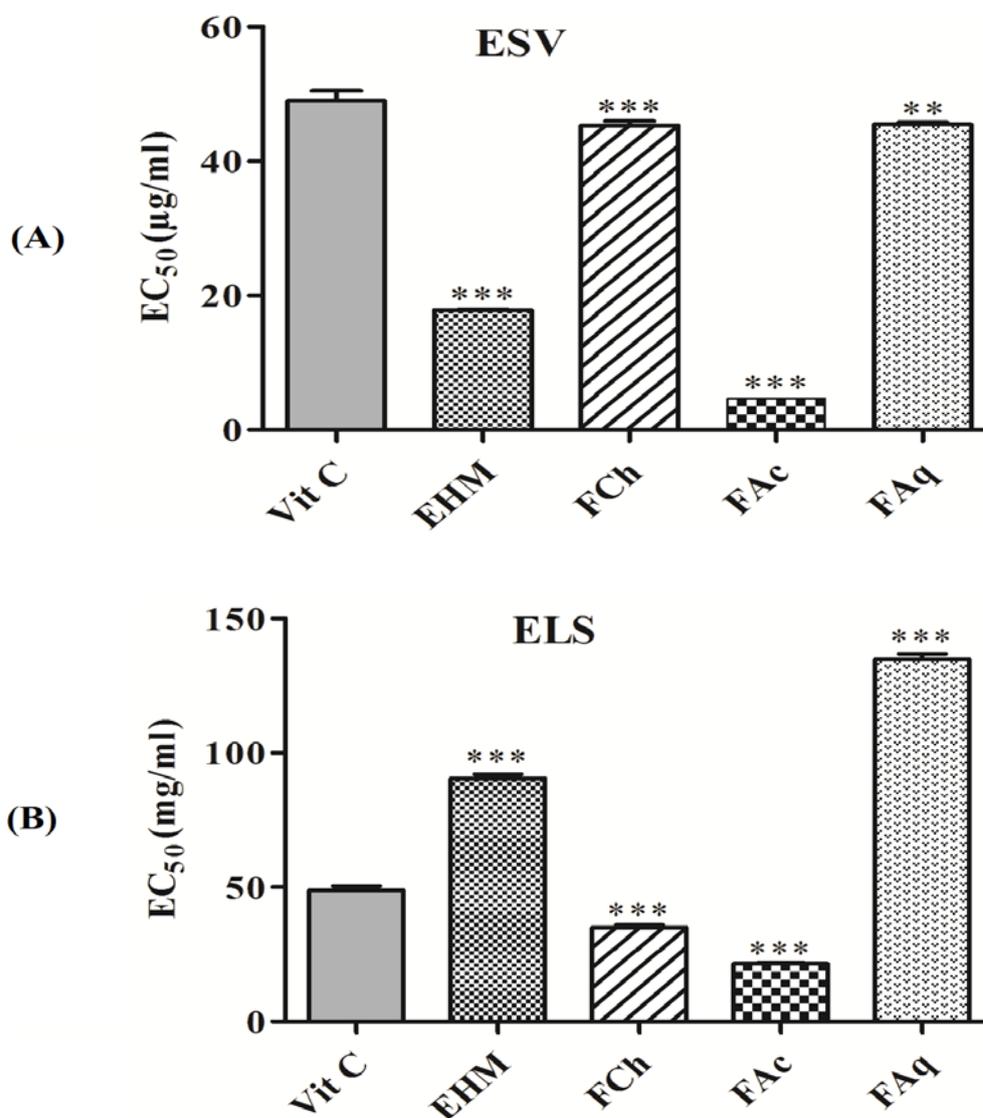
leur potentiel d'activité antioxydante (Meir *et al.*, 1995). La Figure (29 ; A et B), montre que tous les ESV et les ELS sont dotés d'un pouvoir réducteur du fer de manière dose-dépendante. Ces résultats sont également exprimés en  $EC_{50}$  (concentration effectrice de 50% de réduction), or l' $EC_{50}$  la plus faible correspond à l'extrait le plus actif.



**Figure 29.** Pouvoir réducteur des extraits (A): ESV et (B): ELS exprimé par l'augmentation de l'absorbance en fonction de la concentration. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  SD (n=3).

Les valeurs d' $EC_{50}$  enregistrées (Figure 30 ; A), indiquent que les ESV sont significativement plus actifs que la Vit C ( $p < 0.001$ ). Cette dernière a donné une  $EC_{50} = 48.9 \pm 1.4 \mu\text{g/ml}$  tandis que les  $EC_{50}$  marquées par les ESV sont plus faibles; la FAc a exhibé la capacité

réductrice la plus forte avec une  $EC_{50}$  de  $04,7 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ , suivie par l'EHM ( $EC_{50} = 17.8 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ ), puis la FCh et la FAq ( $45.3 \pm 0.6$  et  $45.5 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ , respectivement).



**Figure 30.** Comparaison des  $EC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) des extraits (A): ESV et (B): ELS avec l' $EC_{50}$  de l'acide ascorbique (Vit C). Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD ( $n=3$ ). \*\*\*:  $p < 0.001$ .

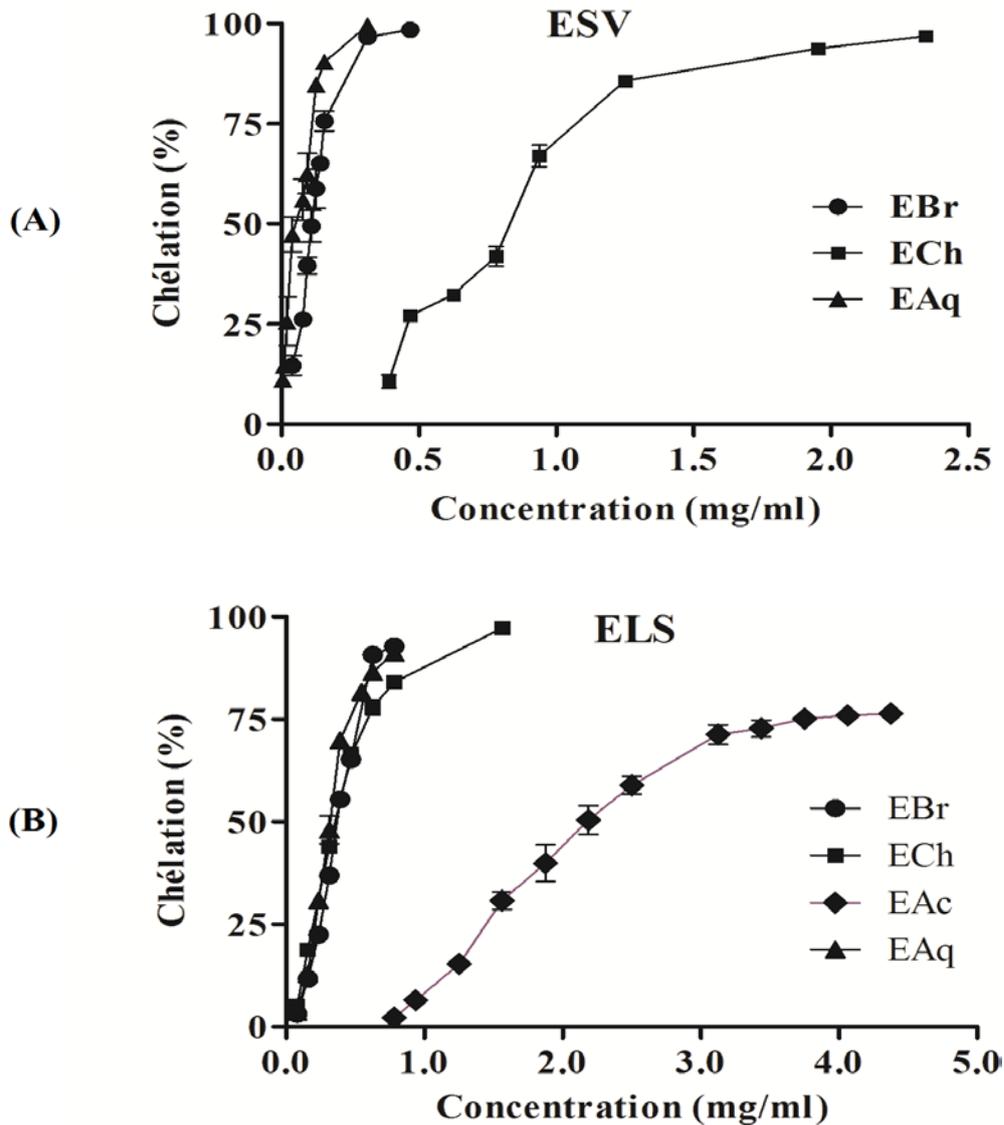
En ce qui concerne les ELS (Figure 30 ; B), la FAc a exhibé le pouvoir réducteur le plus puissant avec une  $EC_{50}$  de  $21.5 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$ . En deuxième rang vient la FCh avec une  $EC_{50}$  de  $35.0 \pm 0.8 \mu\text{g/ml}$  plus faible que l' $EC_{50}$  de l'EHM ( $90.6 \pm 1.5 \mu\text{g/ml}$ ) et l' $EC_{50}$  de la FAq ( $135.0 \pm 1.9 \mu\text{g/ml}$ ). Cependant, leur comparaison avec la Vit C montre que les deux fractions non polaires FAc et FCh sont significativement plus actives ( $p < 0.001$ ).

Elle existe une bonne corrélation entre le pouvoir réducteur des extraits ESV et ELS et leurs teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes sauf avec la FCh/SV qui est plus riche en flavonoïdes mais moins active. Donc, le pouvoir réducteur des différents extraits ESV et ELS pourrait être lié à la présence de composés phénoliques et de flavonoïdes qui ont la capacité de donner des électrons. Kumarappan *et al.* (2012), ont signalé que les donneurs d'électrons pourraient réagir avec les radicaux libres pour les transformer en produits plus stables et arrêter les réactions radicalaires en chaîne, c'est ce qu'on appelle pouvoir réducteur. Ils ont rapporté aussi que l'activités antioxydante des composés naturels peuvent avoir une corrélation réciproque avec leur pouvoir réducteur du fer (Kumarappan *et al.*, 2012).

### 3.4. Test de chélation des métaux (Ferrozine)

La chélation des ions ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) par les extraits ESV et ELS a été estimée par la méthode de Le *et al.* (2007). La réaction se base sur la formation d'un complexe chromophore rouge entre la ferrozine et l'ion  $\text{Fe}^{2+}$  ayant un maximum d'absorption à 562 nm. En présence d'agents chélateur, la formation du complexe est interrompue, ce qui se traduit par une diminution de l'intensité de la couleur rouge du complexe (ferrozine- $\text{Fe}^{2+}$ ) (Yamaguchi *et al.*, 2000 ; Sowndhararajan *et al.*, 2011).

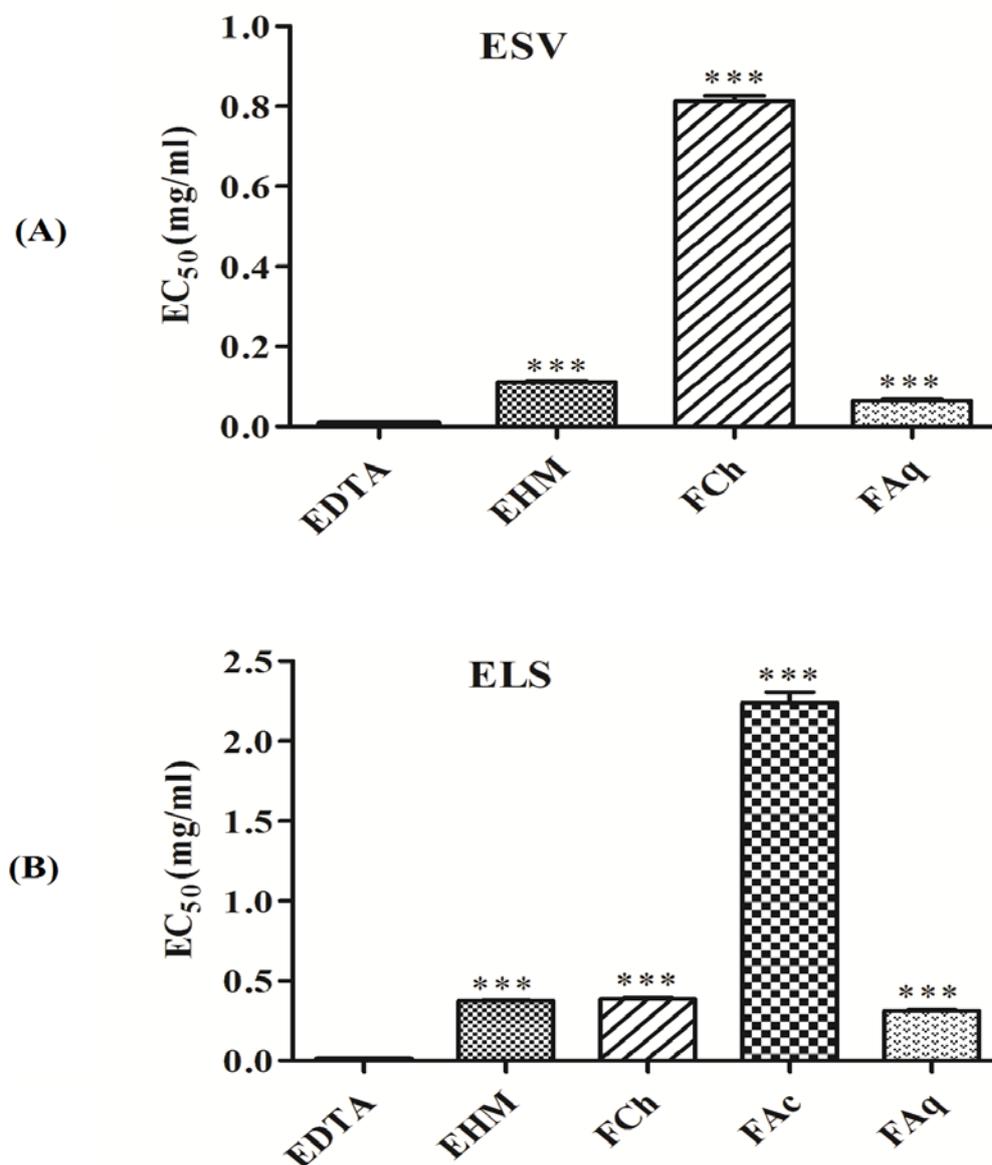
Les résultats obtenus (Figure 31 ; A et B) ont montré que tous les extraits ESV et ELS, à l'exception de la FAc/SV ont montré une activité chélatrice dose-dépendante. Cependant, les extraits polaires (EHM et la FAq) des deux plantes ont été plus actifs que les extraits non polaires (FCh et FAc).



**Figure 31.** Chélation des ions ferreux par les extraits (A): ESV et (B): ELS. Les résultats sont exprimés en moyen  $\pm$  SD (n = 3).

Les différences d'activité entre les extraits testés apparaissent clairement par le calcul des concentrations effectives provoquant 50 % de chélation de fer ( $EC_{50}$ ) (Figure 32 ; A et B). Les valeurs d' $EC_{50}$  enregistrées par les ESV (Figure 32 ; A), montrent que la FAq/SV est capable de chélater 50% des ions  $Fe^{2+}$  par une faible dose ( $0.065 \pm 0.003$  mg/ml) comparant à l'EHM et la FCh ( $0.112 \pm 0.003$  et  $0.812 \pm 0.013$  mg/ml, respectivement). Cependant, la FAc n'a manifesté aucune activité quelque soit sa concentration. En ce qui concerne les ELS, l'EHM et les deux fractions FAq et FCh ont présenté des activités de chélation très importantes et significativement égales, leurs  $EC_{50}$  sont respectivement:  $0.376 \pm 0.002$ ,  $0.314$

$\pm 0.006$  et  $0.387 \pm 0.009$  mg/ml. Ces trois extraits ont été plus efficaces que la FAc ( $EC_{50} = 2.241 \pm 0.067$  mg/ml) pourtant elle est la plus riche en composés phénoliques et en flavonoïdes (Figure 32 ; B).



**Figure 32.** Les  $EC_{50}$  (chélation du  $Fe^{2+}$ ) des extraits (A): ESV et (B): ELS comparant à l'EDTA. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD ( $n = 3$ ), (\*\*\*) :  $p < 0.001$ .

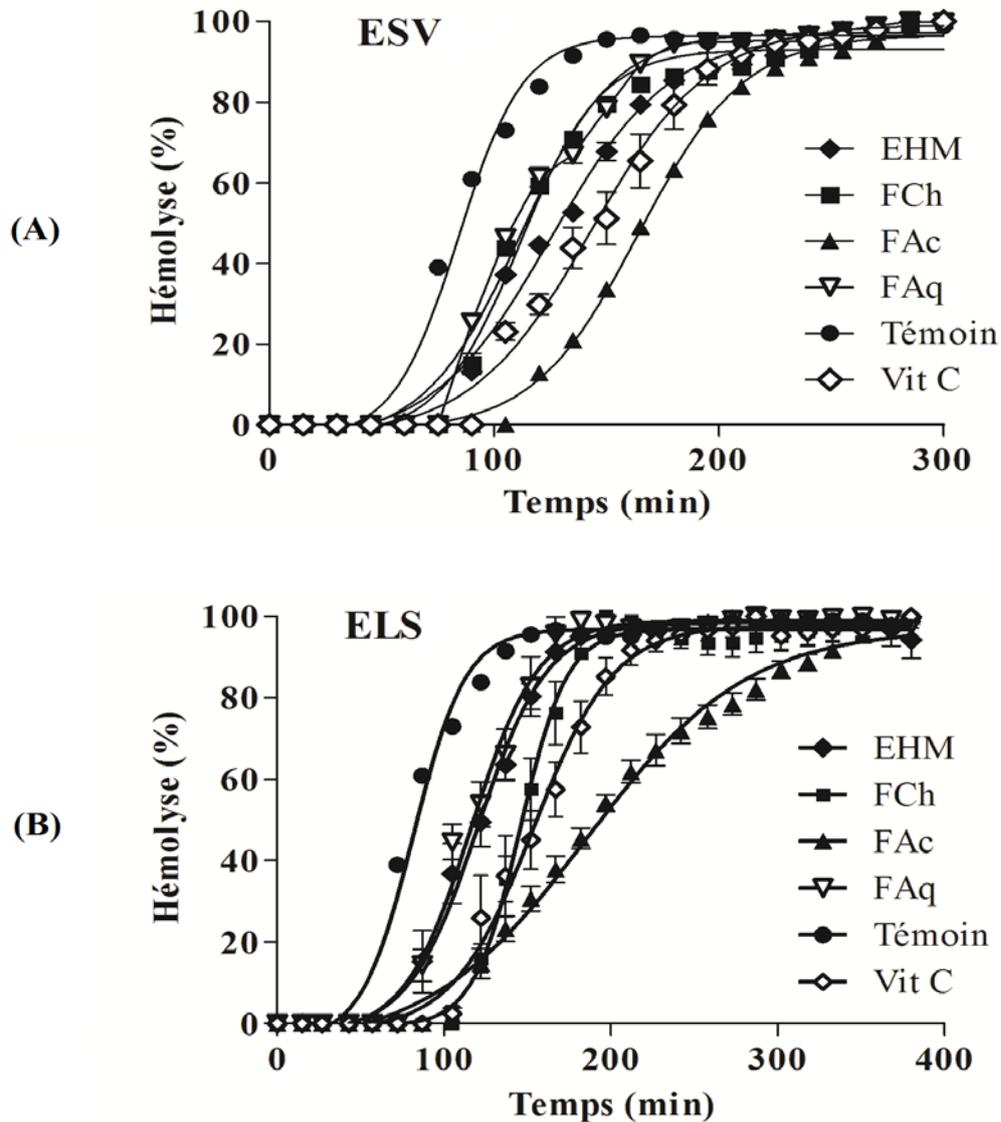
Il existe une corrélation négative entre l'activité chélatrice des extraits ESV et ELS et leurs teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes. La FAq des deux plantes trouvée plus pauvre en polyphénols totaux et en flavonoïdes a exhibé la capacité chélatrice la plus puissante, suivi par l'EHM puis la FCh et en fin la FAc. La forte activité des extraits polaires

(FAq et l'EHM) peut être expliquée par la nature des polyphénols existants dans ces extraits. Il est vrai que les composés phénoliques présentaient des propriétés redox (comme agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et désactivateurs d'oxygène singulet) et qu'ils sont responsables de l'activité chélatrice du fer (Song et Barlow, 2004 ; Heim *et al.*, 2002 ; Balasundram *et al.*, 2006 ; Loizzo *et al.*, 2012), mais la chélation des métaux peut être également, due à la présence d'autres antioxydants non phénoliques dans les extraits tels que l'acide phosphorique, l'acide citrique, l'acide ascorbique, la carnosine, certains acides aminés, des peptides et des protéines comme la transferrine et l'ovotransferrine (Lee *et al.*, 2004). Il est également rapporté que les agents chélateurs, qui forment des liaisons- $\sigma$  avec le métal, sont efficaces comme antioxydants secondaires, car ils réduisent le potentiel redox, stabilisant ainsi la forme oxydée de l'ion métallique (Gulcin *et al.*, 2004 ; Sowndhararajan *et al.*, 2011).

### 3.5. Activité anti-hémolytique (*in vitro*)

Dans cette étude, la capacité des extraits ESV et ELS à protéger les globules rouges (érythrocytes) contre la lyse oxydative induite par l'AAPH est évaluée. L'AAPH est un générateur de radicaux peroxydes qui attaquent les érythrocytes. Cette attaque provoque l'oxydation de la chaîne des lipides et des protéines, perturbe l'organisation de la membrane et conduit finalement à une hémolyse (Abirami *et al.*, 2014 ; Kumar *et al.*, 2015). La présence d'une substance antioxydante dans le milieu va retarder ce phénomène en protégeant les érythrocytes contre l'agression des radicaux libres.

Les cinétiques d'hémolyses présentées dans la Figure (33 ; A et B), montrent un décalage vers la droite de toutes les courbes sigmoïdales issues du traitement par nos extraits et par la Vit C, et ça par rapport au contrôle négatif (érythrocytes dans le PBS + AAPH). Ce décalage explique l'augmentation de la durée totale de l'hémolyse ainsi la capacité de nos extraits et la Vit C à retarder ce phénomène induit par l'AAPH.



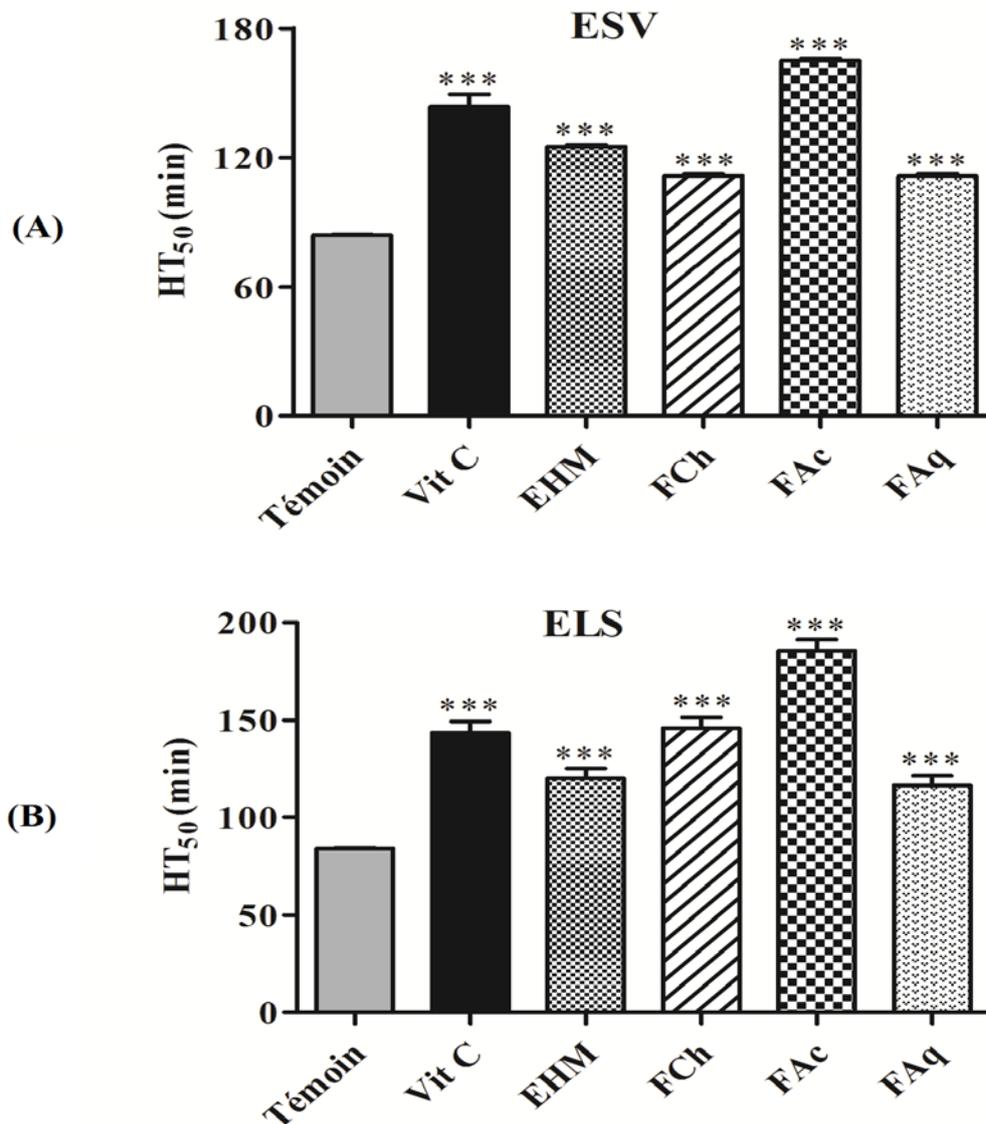
**Figure 33.** Cinétique d'hémolyse des globules rouges en absence (Témoin) et en présence des extraits: (A): ESV et (B): ELS. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n=3).

Les résultats ont été éclaircis par le calcul des  $HT_{50}$  (temps de demi-lyse en min) correspondants à la lyse de 50% des globules rouges initiaux. Les valeurs d' $HT_{50}$  (Figure 34 ; A et B) indiquent que tous les extraits testés ESV et ELS, ont entraîné un retardement très significatif de l'hémolyse comparant au témoin. Cependant, la FAc des deux plantes, a montré une activité anti-hémolytique plus puissante par rapport aux autres extraits (EHM, FCh et FAq) et aussi meilleure que celle de la Vit C.

La comparaison des HT<sub>50</sub> des ESV (Figure 34 ; A) montre que la FAc représente la fraction la plus active avec un HT<sub>50</sub> plus élevé que celui enregistré par la Vit C ( $165.1 \pm 0.82$  min et  $143.6 \pm 5.84$  min, respectivement). Les autres extraits ont manifesté des effets antihémolytiques moins importants, et ils viennent dans l'ordre suivant: l'EHM ( $125.17 \pm 0.76$  min), puis la FCh et la FAq avec presque le même HT<sub>50</sub> ;  $111.60 \pm 0.70$  et  $111.43 \pm 0.99$  min, respectivement. En ce qui concerne les ELS (Figure 34 ; B), ils ont été relativement plus actifs que les ESV, à l'exception d'EHM qui paraît moins actif que son analogue dans les ESV. La FAc/LS a présenté une excellente protection des globules rouges en enregistrant un HT<sub>50</sub> supérieur à 3 heures ( $185.47 \pm 5.92$  min), suivi par la FCh (HT<sub>50</sub> =  $145.87 \pm 5.38$ ) puis l'EHM ( $120.00 \pm 5.28$  min) et enfin la FAq ( $116.57 \pm 4.79$  min).

L'activité antihémolytique exercée par les ESV et les ELS est en bonne corrélation avec les teneurs de ces extraits en polyphénols totaux et en flavonoïdes. Donc elle est attribuable sans doute à la présence de ces composés. Ces résultats ont été confirmés par de nombreuses études qui ont montré que les composés phénoliques ont la capacité d'améliorer la résistance des globules rouges sanguins au stress oxydatif *in vitro* et *in vivo* et elles ont accordé cette activité à leurs groupements hydroxyles aromatiques qui piègent activement les radicaux libres et sont responsables de l'activité antioxydante (Nithiyantham *et al.*, 2013 ; Trabsa *et al.*, 2014 ; Ameni *et al.*, 2015 ; Zerargui *et al.*, 2015).

En effet, dans le modèle d'hémolyse *in vitro*, les composés phénoliques présents dans la suspension érythrocytaire et provenant des extraits, vont éteindre la chaîne de propagation des radicaux peroxydes dans la phase aqueuse en piégeant ces radicaux avant qu'ils attaquent les lipides de la membrane érythrocytaire et par ce fait ils vont arrêter la peroxydation des lipides et inhiber ou retarder l'hémolyse (Sowndhararajan *et al.*, 2011).



**Figure 34.** Comparaison des temps de demi-hémolyse (HT<sub>50</sub> min) pour les extraits (A): ESV et (B): ELS. Les comparaisons ont été effectuées par rapport au contrôle négative (Témoin); (\*\*\*) :  $p < 0.001$ ). La Vit C est utilisée comme un contrôle positif. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  SD (n = 3).

Plusieurs études ont suggéré que les flavonoïdes protègent les cellules non seulement par le piégeage des radicaux libres, mais aussi en modifiant les propriétés de la membrane cellulaire (Arora *et al.*, 2000 ; Pawlikowska-Pawlega *et al.*, 2003 ; Chaudhuri *et al.*, 2007 ; Suwalsky *et al.*, 2007 ; Singh et Rajini, 2008). Certains composés flavonoïdes peuvent s'incorporer dans le noyau hydrophobe de la bicouche membranaire et provoquer une diminution de la fluidité de la membrane et augmenter sa stabilité. La diminution de fluidité membranaire peut entraver la

diffusion de radicaux libres et diminuer la cinétique de leurs réactions (Chen et Deuster, 2009 ; Magalhães *et al.*, 2009).

## 4. Etude des Activités *in vivo*

### 4.1. Toxicité aigue des extraits EM/LS et EM/SV

La toxicité aigue est l'étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques rencontrés après l'administration unique de(s) molécule(s) active(s). Cette étude décrit les troubles symptomatiques observés, le taux de mortalité et permet l'indication des paramètres toxicologiques qui sont la dose létale 50% (DL<sub>50</sub>), dose qui tue 50% des animaux et la dose maximale tolérée (DMT) qui représente la dose maximale qui ne tue aucun animal lorsque l'échantillon est administré (Djyh *et al.*, 2010).

Quelques instants après l'administration unique de l'EM/SV en deux doses ; D1 = 2.0 g/kg et D2 = 5.0 g/kg du poids corporel (PC), un cas de mortalité est noté juste après le gavage dans le lot EM/SV/D2 et la somnolence des autres souris dans les deux lots EM/SV/D1 et EM/SV/D2. La somnolence a duré de 05 à 10 min, puis tous les animaux ont repris leur comportement normal. En général, durant les 07 premiers jours de surveillance, aucun effet néfaste n'a été observé chez les souris traitées par EM/SV. Au 9<sup>ème</sup> jour, deux autres cas de mortalité ont été remarqués dans le lot EM/SV/D2 (Tableau 18). Macroscopiquement, une perte du PC et une diminution de l'apport alimentaire ont été également notés dans ce lot (EM/SV/D2).

**Tableau 18.** Taux de mortalité après traitement des souris par l'EM/LS et par l'EM/SV.

Lot	Nombre souris traitées	Nombre de morts	% de mortalité
<b>Témoin</b>	09	00	00
<b>EM/LS/D1</b>	09	00	00
<b>EM/LS/D2</b>	09	00	00
<b>EM/SV/D1</b>	09	00	00
<b>EM/SV/D2</b>	09	03	33.3 %

D1: 2.0 g/kg du PC, D2: 5.0 g/kg du PC.

#### 4.1.1. Effets sur le poids corporel et la masse relative des organes

Le Tableau 19 représente le poids corporel (PC) des souris avant et après le traitement par l'EM des deux plantes, en plus des taux de variation du PC ( $\Delta$  PC %). Les résultats obtenus montrent une évolution pondérale normale de l'ensemble des souris. L'exception est trouvée chez les souris du lot EM/SV/D2, qui ont montré une réduction du PC (Tableau 19).

La réduction du PC dans le lot EM/SV/D2 et l'évolution lente du poids chez les souris EM/SV/D1, peuvent être expliquées par la perte de l'appétit des animaux. Cela pourrait être attribué à la teneur d'EM/SV en flavonoïdes et / ou terpénoïdes qui sont abondants dans les espèces *Salvia* et reconnus par leurs propriétés inhibitrices de la croissance pondérale (Bonnier, 1909).

**Tableau 19.** Effet des extraits EM sur le poids corporel (PC) des souris après 14 jours d'observation exprimé par le pourcentage de variation du poids corporel ( $\Delta$  PC (%)).

Lot	PC avant traitement	PC après 14 jours	$\Delta$ PC (%)
<b>Témoin</b>	27.225 $\pm$ 2.678	32.744 $\pm$ 1.450	21.113 $\pm$ 11.04
<b>EM/LS/D1</b>	26.646 $\pm$ 2.055	31.689 $\pm$ 3.421	19.970 $\pm$ 12.13 <i>ns</i>
<b>EM/LS/D2</b>	26.303 $\pm$ 2.713	32.846 $\pm$ 2.008	25.451 $\pm$ 7.63 <i>ns</i>
<b>EM/SV/D1</b>	29.487 $\pm$ 2.929	33.244 $\pm$ 4.180	12.149 $\pm$ 6.05 <i>ns</i>
<b>EM/SV/D2</b>	28.865 $\pm$ 3.963	27.672 $\pm$ 5.569	- 04.587 $\pm$ 9.034 ***

Valeurs exprimées en moyenne  $\pm$  SEM, (n = 6 à 9), \*\*\*:  $p < 0.001$ , *ns*: non significatif.

PC: poids corporel,  $\Delta$  PC: variation du poids corporel, D1: 2.0 g/kg, D2: 5.0 g/kg.

La masse relative d'organe (ROW) des organes: foie, reins, cerveau, cœur, poumons, estomac et rate, a été calculée. Les ROW des différents organes des souris dans les lots EM/LS/D1, EM/LS/D2 et EM/SV/D1 étaient comparables aux ROW des animaux témoins (Tableau 20). Quelques exceptions mineures ont été notées dans le lot EM/SV/D2 concernant la ROW du cerveau et la ROW de l'estomac qui ont été significativement plus élevées par rapport aux ROW des témoins. Schmidt *et al.* (2007), ont expliqué l'augmentation de ROW chez les animaux traités par la possibilité que l'extrait a provoqué un étranglement cellulaire et / ou inflammation des organes qui aurait entraîné un gonflement et une augmentation de poids. Bailey *et al.* (2004) et Umana *et al.* (2013), ont signalé que le poids de l'organe est l'indicateur le plus sensible dans le test de toxicité, car des différences significatives dans le poids d'organe entre les animaux traités et les animaux non traités (témoins) peuvent se produire en l'absence de changements morphologiques.

**Tableau 20.** Masse relative d'organe (ROW) des organes des souris traitées et non traitées (Témoin).

	<b>Foie</b>	<b>Reins</b>	<b>Cerveau</b>	<b>Cœur</b>	<b>Poumons</b>	<b>Estomac</b>	<b>Rate</b>
<b>Témoin</b>	5.791	1.341	1.161	0.522	0.639	0.715	0.612
	±	±	±	±	±	±	±
	0.51	0.21	0.13	0.07	0.09	0.18	0.12
<b>EM/SV/D1</b>	6.420	1.472	1.228	0.523	0.730	0.900	0.754
	±	±	±	±	±	±	±
	1.99	0.21	0.09	0.08	0.14	0.19	0.14
<b>EM/SV/D2</b>	5.459	1.506	1.444	0.567	0.749	0.934	0.844
	±	±	±	±	±	±	±
	1.00	0.12	0.25 **	0.07	0.07	0.16 *	0.30
<b>EM/LS/D1</b>	6.582	1.328	1.270	0.500	0.709	0.799	0.665
	±	±	±	±	±	±	±
	0.81	0.18	0.11	0.05	0.08	0.14	0.16
<b>EM/LS/D2</b>	5.904	1.290	1.211	0.506	0.681	0.844	0.631
	±	±	±	±	±	±	±
	0.95	0.18	0.12	0.06	0.07	0.14	0.12

Valeurs exprimées en moyenne  $\pm$  SEM, (n = 06 à 09), \* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , *ns* : non significatif. D1 : 2.0 g/kg, D2 : 5.0 g/kg.

#### 4.1.2. Effet sur les paramètres biochimiques

La mesure des enzymes sériques est un outil précieux dans le diagnostic clinique, fournissant des informations sur l'effet et la nature des dommages pathologiques à tout tissu (Wills, 1985). L'alanine aminotransférase (ALT), la phosphatase alcaline (ALP) et l'Aspartate aminotransférase (AST) sont les principaux enzymes utilisés pour déterminer l'état de fonctionnement des tissus hépatiques (Wallace et Meyer, 2010). L'augmentation des activités sériques de ces enzymes peut indiquer un endommagement du tissu hépatique (Al-Habori *et al.*, 2002). Puisque, tout nécrose cellulaire, destruction du parenchyme hépatique ou augmentation de la perméabilité membranaire des hépatocytes peut mener à l'écoulement de ces enzymes dans la circulation sanguine et donc à l'augmentation de leurs taux sériques (Adeneye *et al.*, 2006 ; Jodynis-Liebert *et al.*, 2010).

Dans cette étude les trois enzymes ALT, ALP et AST, ont été dosés (Tableau 21) et sont tous dans la gamme normale chez les souris traitées par l'EM/LS, sauf l'ALP qui a été

significativement plus faible dans le lot EM/LS/D2 ( $p < 0.01$ ). Cependant, l'administration unique de l'EM/SV a augmenté significativement ( $p < 0.05$ ) le taux sérique de l'AST chez les souris (EM/SV/D2) et elle a diminué d'une façon très significative ( $p < 0.001$ ) le taux de l'ALP dans les deux lots traités par l'EM/SV (Tableau 21). Cela peut indiquer que l'extrait méthanolique de *S. verbenaca* (EM/SV) a un effet sur la perméabilité membranaire des hépatocytes (Jodynis-Liebert *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2010).

La créatinine (Créa) représente le marqueur biologique majeur de l'altération rénal (Jodynis-Liebert *et al.*, 2010). Ce produit de la dégradation non-enzymatique de la créatine, est strictement éliminé par les reins à l'état normal. Donc, le changement dans leur niveau sérique est un indicateur fiable des troubles concernant la filtration glomérulaire et le dysfonctionnement rénal (Mukinda et Eagles, 2010). Dans cette étude le traitement aigu des souris par les deux extraits EM/LS et EM/SV n'a pas influencé la concentration sérique en Créa et en Urée (Tableau 21). Ça peut mener à suggérer que les deux extraits EM/LS et EM/SV n'ont aucun effet sur la filtration glomérulaire et sur la fonction rénale.

**Tableau 21.** Paramètres biochimiques sériques des souris après 14 jours d'observation. L'Urée, Créa: La créatinine, AST: Aspartate aminotransferase, ALT: Alanine aminotransferase et ALP: Alcaline phosphatase.

	Urée (g/l)	Créa (mg/l)	AST (UI/l)	ALT (UI/l)	ALP (UI/l)
<b>Témoin</b>	0.44 ± 0.06	2.51 ± 0.15	144.67 ± 8.48	36.57 ± 3.99	159.57 ± 8.62
<b>EM/LS-D1</b>	0.43 ± 0.05	2.46 ± 0.26	133.20 ± 14.1	32.00 ± 6.87	147.25 ± 9.91
<b>EM/LS/D2</b>	0.43 ± 0.09	2.23 ± 0.20	126.67 ± 4.18	32.80 ± 2.59	127.50 ± 11.3 **
<b>EM/SV/D1</b>	0.38 ± 0.07	2.39 ± 0.31	174.20 ± 40.1	32.20 ± 15.9	99.20 ± 8.42 ***
<b>EM/SV/D2</b>	0.43 ± 0.06	2.64 ± 0.38	192.00 ± 52.2 *	36.25 ± 1.71	103.25 ± 13.4 ***

Valeurs exprimées en moyenne ± SEM, (n = 6 à 9), D1: 2.0 g/kg PC, D2: 5.0 g/kg PC. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

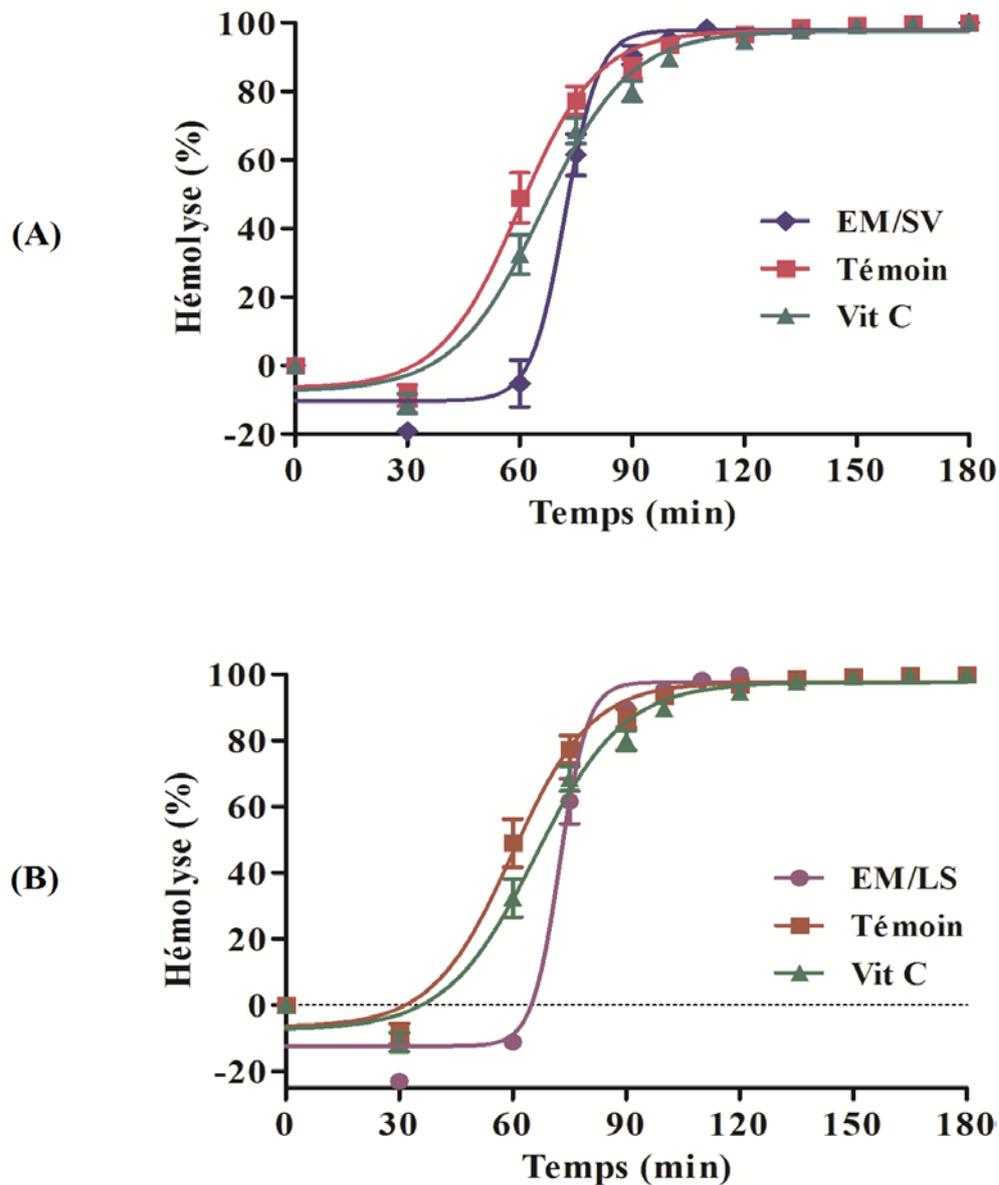
#### 4.1.3. Classement de toxicité des deux extraits EM/LS et EM/SV

Nos résultats concernant l'EM/LS, sont en accord avec ceux obtenus par Al-yahya *et al.* (1994) sur la toxicité aiguë et chronique de l'extrait éthanolique des graines de *L. sativum* chez des souris. Ils ont montré que l'administration unique des doses 0.5, 1 et 3 g/kg de PC n'a induit aucun symptôme de toxicité ou de mortalité sur une période de 24 heures. Egalement, Datta *et al.* (2011) ont réalisé des études sur la toxicité aiguë et sub-chronique de la poudre des graines de *L. sativum* chez des rats Wistar adultes. Ils ont montré que les doses aiguës 0.5 – 5.0 g/kg de PC n'ont induit aucun symptôme de toxicité ou de mortalité chez les rats après 72 h de surveillance. Ainsi, l'alimentation diététique de la poudre avec des doses de 1.0 – 10 % pendant 14 semaines n'a pas produit de mortalité et aucun changement significatif a été observé dans : l'apport alimentaire, le gain de poids corporel, le poids relatif des organes, les paramètres hématologiques, les changements macroscopiques et microscopiques dans les organes vitaux. Donc on peut considérer les graines de *L. sativum* comme non toxiques, selon l'échelle de toxicité d'Emma *et al.* (2015).

En ce qui concerne l'EM/SV, la dose D1 n'a donné aucun cas de mortalité après les 14 jours d'observation, tandis que la dose D2 a causé la mort de 33.3 %. Donc la DL<sub>50</sub> est supérieure à 5.0 g/kg du PC et selon l'échelle de toxicité de Emma *et al.* (2015) on peut dire que l'EM/SV administré par voie orale est presque toxique. En outre, il est trouvé que les huiles essentielles des espèces "*Salvia*" dont *S. verbenaca* contiennent un mono-terpène toxique dit la Thujone en différentes concentrations. Néanmoins, il n'existe pas d'études antérieures concernant la présence de ce monoterpène dans les extraits de solvants de *S. verbenaca*. Kostic *et al.* (2015), ont essayé à chercher la présence de l' $\alpha$  et du  $\beta$ -thujone par HPLC dans 12 extraits de la partie aérienne de *S. verbenaca* préparés par différents solvants. Ils ont trouvé que la thujone est absent dans tous les 12 extraits testés.

## 4.2. Activité antioxydante *in vivo*

### 4.2.1. Effet des extraits sur la capacité antioxydante totale du sang

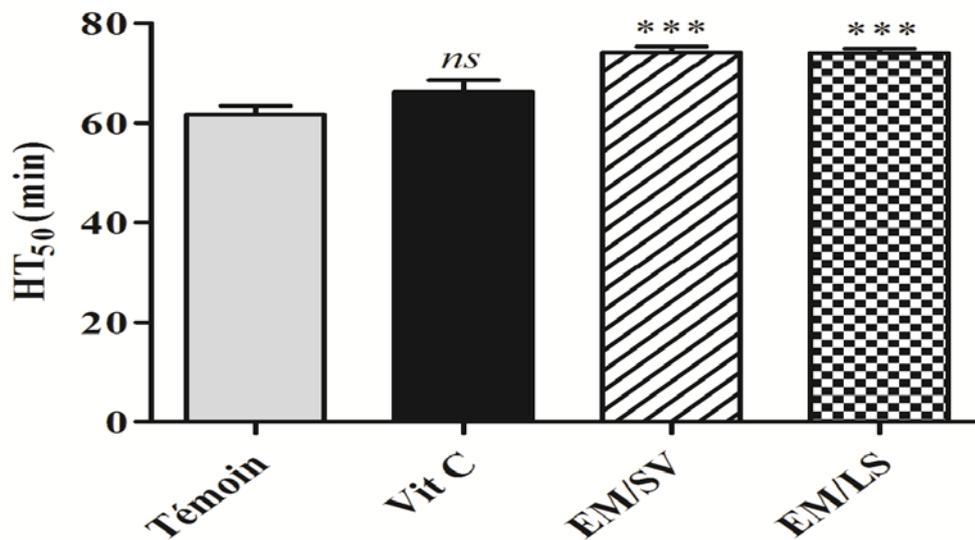


**Figure 35.** Cinétique de la lyse érythrocytaire en présence de t-BHP pour les différents groupes : EM/SV (100 mg/kg), EM/LS (100 mg/kg), Vit C (50 mg/kg Pc) et Témoin (non traité). Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  SEM (n = 09-10).

Les cinétiques d'hémolyse obtenues à l'issue de ce test (Figure 35, A et B), ont montré que le traitement des souris par la Vit C (50 mg/kg), l'EM/SV (100 mg/kg) et par l'EM/LS (100 mg/kg), a entraîné un décalage des courbes sigmoïdales d'hémolyse vers la droite et ça

signifie le retardement de l'hémolyse érythrocytaire. Cependant, les deux extraits EM/SV et EM/LS ont présenté un retardement plus important par rapport à la Vit C.

La comparaison entre les temps nécessaires pour 50 % de l'hémolyse ( $HT_{50}$ ) (Figure 36) révèle que les deux extraits ont induit un prolongement très significatif ( $p < 0.001$ ) du temps de demi-hémolyse avec des différences de 10.32 min et 11.35 min produites par EM/SV et EM/LS, respectivement. Alors que, le prolongement produit par la Vit C (03.45 min) par rapport au témoin est statistiquement insignifiant.



**Figure 36.** Temps de demi-lyse des globules rouges ( $HT_{50}$ ) des groupes: non traité (Témoin), traité avec Vit C, traité avec l'EM/SV et traité avec l'EM/LS. Les valeurs présentent les moyennes  $\pm$  SEM ( $n = 09$  à  $10$ ). Les comparaisons ont été effectuées par rapport au contrôle négatif (Témoin). \*\*\* :  $p < 0.001$ , ns: non significatif.

D'après ces résultats, il paraît qu'il y'a une amélioration très significative de la capacité antioxydante totale du sang des souris traitées par 100 mg/kg des extraits EM/SV et EM/LS. La protection des érythrocytes contre la lyse induite par le t-BHP, est sans doute attribuable à des niveaux élevés d'antioxydants exogènes acquise des deux extraits. Plusieurs métabolites secondaires à base de plantes tels que les flavonoïdes ont été trouvés pour protéger les cellules contre les dommages oxydatifs. Ces composés ont été mis en évidence pour stabiliser la

membrane des globules rouges en piégeant les radicaux libres et en réduisant la peroxydation des lipides (Yu, 2001 ; Chaudhuri *et al.*, 2007 ; Ebrahimzadeh *et al.*, 2010). D'après Chaudhuri *et al.* (2007), les flavonoïdes sont les plus appropriés pour prévenir la peroxydation induite par les radicaux libres et la lyse des érythrocytes. Les flavonoïdes ont la capacité d'interagir avec les composants lipidiques et protéiques des membranes érythrocytaires et par leur incorporation dans la membrane ils peuvent arrêter partiellement l'augmentation de la micro-viscosité des membranes due à la peroxydation et augmentent l'intégrité membranaire des membranes érythrocytaires (Chaudhuri *et al.*, 2007 ; Magalhaes *et al.*, 2009 ; Khalili *et al.*, 2014).

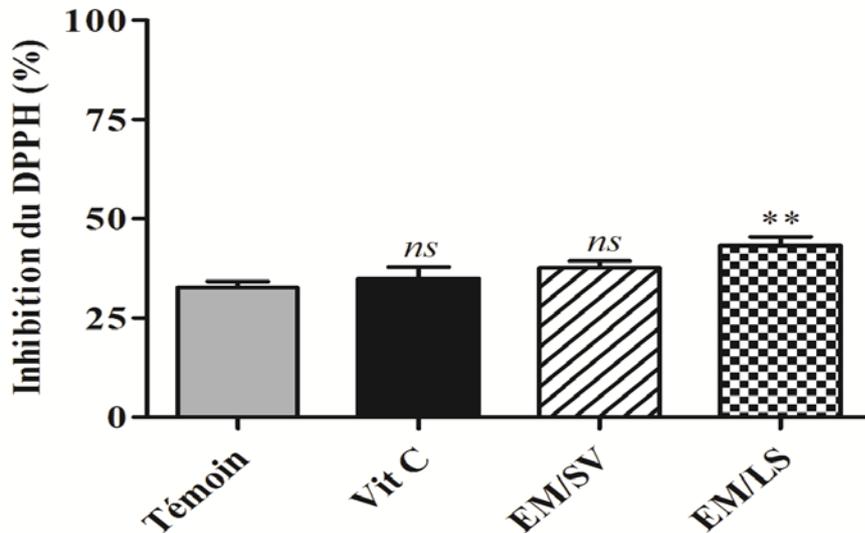
#### **4.2.2. Effet des extraits sur la capacité antioxydante du plasma (CAP)**

Il s'agit d'une méthode de mesure globale qui consiste à évaluer l'effet inhibiteur des antioxydants plasmatiques sur une réaction radicalaire induite *in vitro* (Haleng *et al.*, 2007). Nombreux tests ont été proposés, tels que ABTS ou TEAC (Total equivalent antioxidant capacity), FRAP (Ferric reducing ability of plasma), DPPH (2,2-diphenyl-picrylhydrazyl) et autres (Haleng *et al.*, 2007 ; Pincemail *et al.*, 2014). Parmi ces tests deux ont été entrepris dans cette étude; l'effet scavenger du radical DPPH et le pouvoir réducteur du fer. Ce sont deux méthodes largement utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de plantes *in vitro*.

##### **A) Capacité antioxydante du plasma vis-à-vis le radical DPPH**

Le plasma récupéré à partir des souris traitées et non traitées, a été utilisé pour déterminer la Capacité antioxydante du plasma (CAP) vis-à-vis le radical DPPH, qui a été exprimée en pourcentage de décoloration du mélange réactionnel en présence du plasma par rapport à la solution méthanolique contenant uniquement le DPPH (1%). Les résultats obtenus (Figure 37) révèlent que la dose 50 mg/kg de la Vit C et la dose 100 mg/kg des extraits EM/SV et EM/LS ont amélioré la CAP des souris. L'amélioration de la CAP a été très importante et

significative chez les souris traitées par l'EM/LS ( $p \leq 0.01$ ) avec un I% de  $43.23 \pm 4.92$  % tandis que, l'EM/SV et la Vit C ont provoqué une amélioration non significative de la CAP avec un I% de  $37.66 \pm 4.29$  %,  $34.90 \pm 5.94$  % et  $32.63 \pm 3.82$  %, respectivement (Figure 37).



**Figure 37.** CAP vis-à-vis le radical DPPH chez les souris traitées par la Vit C, par l'EM/SV et par l'EM/LS. Les trois groupes sont comparés au groupe Témoin (non traité). Les valeurs présentent les moyennes  $\pm$  SEM ( $n = 9$  à  $10$ ). \*\*:  $p < 0.01$ , ns: non significatif.

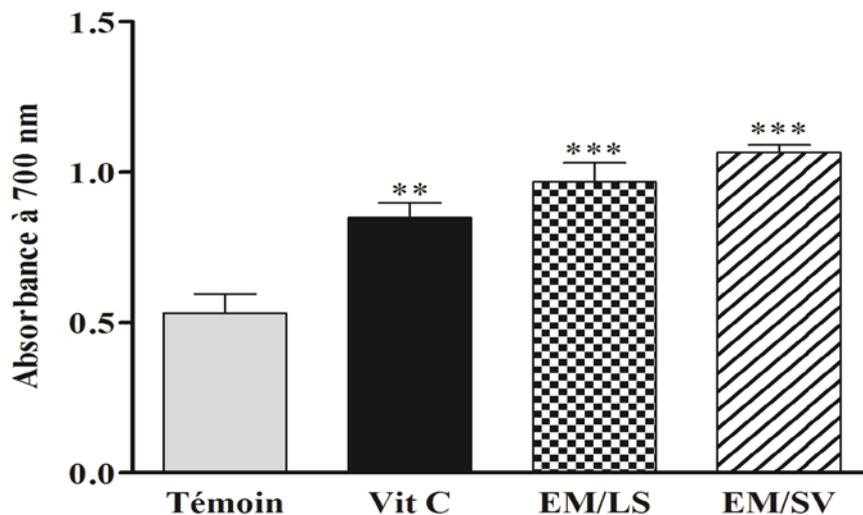
### B) Capacité antioxydante plasmatique exprimée par le pouvoir réducteur

La CAP est exprimée dans ce test par le pouvoir des plasmas des souris à réduire l'ion ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en ion ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Ce pouvoir réducteur du fer est donc mesuré par l'intensité de la solution bleue produite qui absorbe à 700 nm. Les résultats obtenus (Figure 38) montrent que l'EM/SV et l'EM/LS ont été capables d'améliorer d'une façon très significative ( $p < 0.001$ ) le pouvoir réducteur du plasma des souris. L'ordre des groupes traités, selon leur pouvoir réducteur du fer, a été comme suit: EM/SV > l'EM/LS > Vit C avec une absorbance de  $1.065 \pm 0.047$ ,  $0.967 \pm 0.146$ ,  $0.849 \pm 0.111$ , respectivement.

D'après ces résultats, il paraît que la CAP est significativement améliorée par la dose 100 mg/kg de l'EM/LS soit dans l'inhibition du radical DPPH, soit dans la réduction du fer

ferreux en fer ferrique. La même chose est enregistrée par la dose 100 mg/kg d'EM/SV dans la réduction du fer, mais l'amélioration a été insignifiante vis-à-vis le radical DPPH.

Le plasma des souris non traitées (Témoin) a été capable de piéger le radical DPPH et de réduire le fer ferrique en fer ferreux. Ça peut être expliqué par les antioxydants endogènes présents dans le plasma tel que l'acide urique, l'albumine, la bilirubine et le glutathion réduit (GSSH). Donc, l'amélioration de la CAP observée chez les trois groupes traités Vit C, EM/SV et EM/LS, est logiquement attribuable à des niveaux élevés d'antioxydants exogènes à savoir la vitamine C et les polyphénols, flavonoïdes et les oligoéléments provenant des deux extraits (EM/SV et EM/LS). Andallu *et al.*, (2011) ont suggéré que la capacité antioxydante globale du plasma (CAP) résulte de l'action synergique des antioxydants endogènes et de diverses molécules phytochimiques provenant des extraits administrés.



**Figure 38.** Capacité antioxydante globale réductrice du plasma des souris traitées par l'EM/LS, l'EM/SV et par la Vit C comparés au groupe Témoin. Les valeurs présentent les moyennes  $\pm$  SEM (n = 9 à 10).

Plusieurs études ont corrélé la CAP à la biodisponibilité des antioxydants exogènes dans le plasma, qui dépend de : la nature d'antioxydants, leur absorption, leur métabolisme et de leur demi-vie dans le plasma (Erlund *et al.*, 2002 ; Haj Mouhamed *et al.*, 2012). Wang et ses

collaborateurs (2012) ont signalé que l'apport de caroténoïdes et de flavonoïdes dans le régime alimentaire est un bon indicateur de l'état antioxydant plasmatique. Ainsi, Cao *et al.* (2009), ont montré que la consommation accrue de fruits et légumes peut augmenter la capacité antioxydante du plasma (CAP) chez l'homme. Les flavonoïdes et autres composés phénoliques semblent être certains des autres antioxydants qui contribuent à la capacité antioxydante élevée mesurée dans certains fruits et légumes ; il y a plus de 4000 flavonoïdes différents présents dans les plantes, et beaucoup d'entre eux ont des activités antioxydantes plusieurs fois plus fortes que celles des vitamines E et C (Cao *et al.*, 2009).

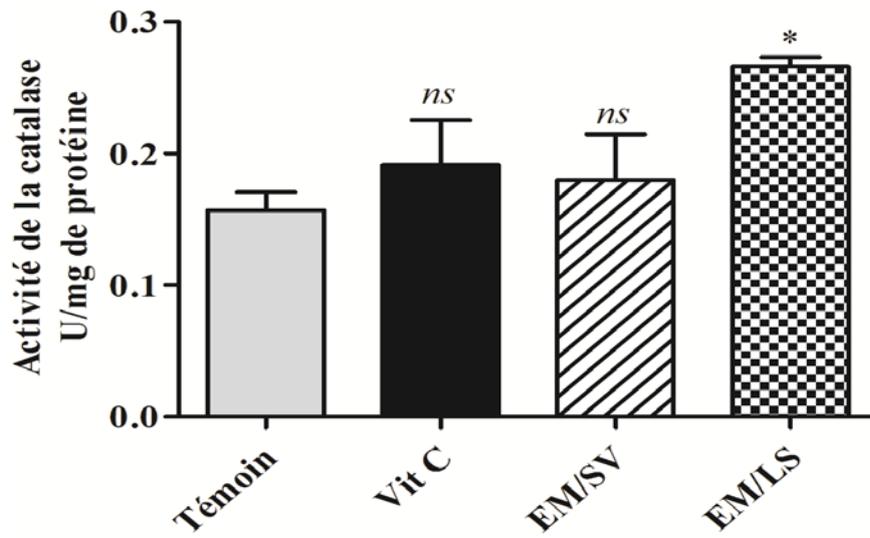
#### **4.2.3. Effet des extraits sur les indicateurs enzymatiques et non enzymatiques d'oxydation au niveau du tissu hépatique**

##### **A) Indicateurs enzymatiques présentés par l'activité de la Catalase**

L'activité de la catalase (CAT) dans l'homogénat hépatique est montrée sur la figure (39). L'activité CAT de l'homogénat hépatique total dans le groupe témoin (non traité) s'est révélée être plus faible que dans les groupes traités par Vit C, EM/SV et EM/LS. En effet, l'administration de 100 mg/kg d'EM/LS a significativement augmenté l'activité CAT par rapport au groupe témoin ( $p < 0.05$ ), il a enregistré une activité de  $0.266 \pm 0.012$  U/mg de protéine, alors que la Vit C (50 mg/kg) et l'EM/SV (100 mg/kg) ont induit une augmentation non significative avec des activités CAT de  $0.191 \pm 0.069$  et  $0.180 \pm 0.069$  U/mg de protéine, respectivement (Figure 39).

La CAT est une enzyme omniprésente qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), une espèce réactive d'oxygène, qui est un produit toxique du métabolisme aérobie normal et de la production de ROS pathogènes. La réduction de ce système de défense antioxydante entraîne une sensibilité accrue aux dommages cellulaires induits par les radicaux libres. Les enzymes antioxydantes peuvent être inactivées par les

peroxydes lipidiques et par les ROS produits (Halliwell et Gutteridge, 1984) ; la SOD est inhibée par le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), tandis que la GPX et la CAT sont inhibées par un excès de radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Pigeolet *et al.*, 1990). Donc, le supplément en antioxydants exogènes (polyphénols, flavonoïdes et autres) peut jouer un rôle préventif de l'accumulation des ROS et par conséquent améliorer l'activité des enzymes antioxydantes.



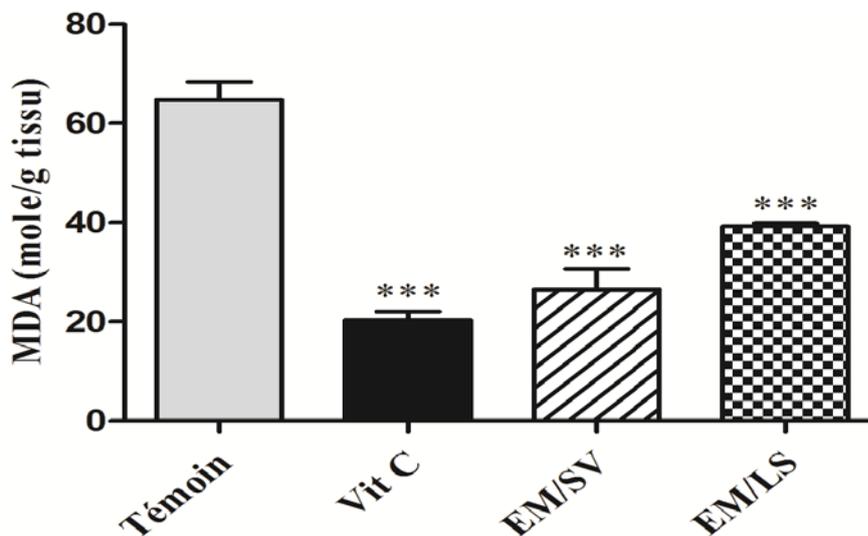
**Figure 39.** Activité de la catalase du tissu hépatique des souris traitées par la Vit C (50 mg/kg), l'EM/SV (100 mg/kg) et par l'EM/LS (100 mg/kg), comparées aux souris non traitées (Témoin). Valeurs sont les moyennes  $\pm$  SEM (n = 6 à 9).

Plusieurs études ont montré que le stress oxydant induit par le  $CCl_4$  (Arief *et al.*, 2010) ou par le Paracétamol (Dash *et al.*, 2007 ; Hamza et Al-Harbi, 2015 ; Okokon *et al.*, 2017), diminuait l'activité de la CAT et des autres enzymes antioxydantes tels que GPX et SOD dans le tissu hépatique. Ces études ont montré également que l'administration des extraits de plantes ou les substances purifiées de plantes aux souris ou aux rats augmente et améliore l'activité de la CAT, GPX et SOD et les protège contre l'accumulation des radicaux libres. Les auteurs ont expliqué cet effet par l'activité antioxydante des polyphénols dont des flavonoïdes et des oligoéléments présents dans ces extraits (Dash *et al.*, 2007 ; Arief *et al.*, 2010 ; Hamza et Al-Harbi, 2015 ; Okokon *et al.*, 2017).

**B) Indicateurs non enzymatiques présentés par le Malondialdéhyde**

Les résultats présentés dans la figure (40), montrent une diminution très significative de la teneur des Malondialdéhyde (MDA) dans le tissu hépatique des souris traitées par la Vit C ( $17.63 \pm 6.07$  moles/g de tissu), par l'EM/SV ( $26.53 \pm 7.07$  moles/g de tissu) et par l'EM/LS ( $39.25 \pm 1.14$  moles/g de tissu) et ça par rapport aux souris non traitées (Témoin) ( $64.78 \pm 7.14$  moles/ g de tissu).

La production de malondialdéhyde (MDA) est un produit d'oxydation bien connu des acides gras polyinsaturés, influençant la fluidité de la membrane cellulaire ainsi que l'intégrité des biomembranes (Ercal *et al.*, 2001 ; Almroth *et al.*, 2005), et peut être utilisé comme indicateur de la peroxydation lipidique (Peixoto *et al.*, 2013 ; Forman *et al.*, 2015). La présente étude a révélé des niveaux bas de MDA chez les groupes traités par nos extraits (EM/SV et EM/LS), suggérant que ces derniers étaient capables de prévenir la peroxydation des lipides hépatiques en augmentant le statut antioxydant.



**Figure 40.** Dose du MDA au niveau du tissu hépatique des souris traitées par la Vit C (50 mg/kg), l'EM/SV (100 mg/kg) et par l'EM/LS (100 mg/kg), comparées aux souris non traitées (Témoin). Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  SEM (n = 6 à 9).

La peroxydation lipidique est supposée causer la destruction et l'endommagement des membranes cellulaires, entraîner des changements dans la perméabilité et la fluidité de la membrane et améliorer la dégradation des protéines chez la souris (El-Megharbel *et al.*, 2014). Des études récentes sur le stress oxydant, ont montré que le traitement des souris ou rats par CCl<sub>4</sub> ou le Paracétamol augmentait les niveaux de peroxydation lipidique désignée par le taux élevé de production du MDA, indiquant ainsi une augmentation de la production de radicaux libres dans le groupe traité par le Paracétamol ou CCl<sub>4</sub> (Dash *et al.*, 2007; Arief *et al.*, 2010 ; Hamza et Al-Harbi, 2015; Okokon *et al.*, 2017). Cependant, dans les groupes qui ont reçu des extraits ou substances purifiées de plantes, ils ont enregistré une diminution des niveaux de MDA ce qui indique le rôle de ces extraits dans l'amélioration du statut antioxydant des cellules hépatiques vis-à-vis la peroxydation lipidique.

#### **4.3. Activité anti-inflammatoire des extraits EM/SV et EM/LS *in vivo***

L'activité anti-inflammatoire des deux extraits EM/SV et EM/LS est évaluée dans cette étude par l'estimation de l'effet anti-œdémateux des extraits c.-à-d. leur pouvoir à réduire ou inhiber l'œdème induit par le PMA à l'oreille des souris. En effet, l'application topique de PMA à la peau d'oreille de souris induit une réponse inflammatoire, il peut activer une grande variété de types de cellules qui peuvent contribuer à une inflammation aiguë, ce qui entraîne une augmentation du gonflement des tissus épidermiques et de l'infiltration de cellules inflammatoires (Joung *et al.*, 2012). Alors que le traitement des souris par un agent anti-inflammatoire va minimiser ou inhiber l'infiltration des cellules et par conséquent il fait la réduction du gonflement de l'œdème.

Dans cette étude l'œdème induit par le PMA a atteint plus de  $15.00 \pm 2.35$  mg de poids et  $0.26 \pm 0.10$  mm d'épaisseur. Le diclofénac (DCF) utilisée comme composé de référence a été capable de réduire le poids à  $08.82 \pm 1.98$  mg et l'épaisseur à  $0.11 \pm 0.03$  mm. Le poids

d'œdème a été également réduit par l'EM/SV et l'EM/LS en  $09.73 \pm 0.39$  et  $10.27 \pm 0.76$  mg, respectivement (Tableau 22). Ainsi, l'épaisseur est réduite en  $0.13 \pm 0.03$  et à  $0.15 \pm 0.02$  mm par EM/SV et EM/LS, respectivement. Ces réductions dans le poids et l'épaisseur d'œdème signifient que l'inflammation induite par le PMA est inhibée par les deux extraits EM/SV et EM/LS lorsqu'ils sont injectés par voie intra-péritonéale, 1 heure avant l'application du PMA d'une manière comparable à celle de DCF. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Shaikh *et al.* (2016) et Garrido *et al.* (2004).

**Tableau 22.** Effet des extraits de plantes sur l'œdème induit par le PMA dans l'oreille de la souris, exprimé par : le poids d'œdème en (mg), l'épaisseur d'œdème en (mm) et le pourcentage d'inhibition par rapport au poids et l'épaisseur.

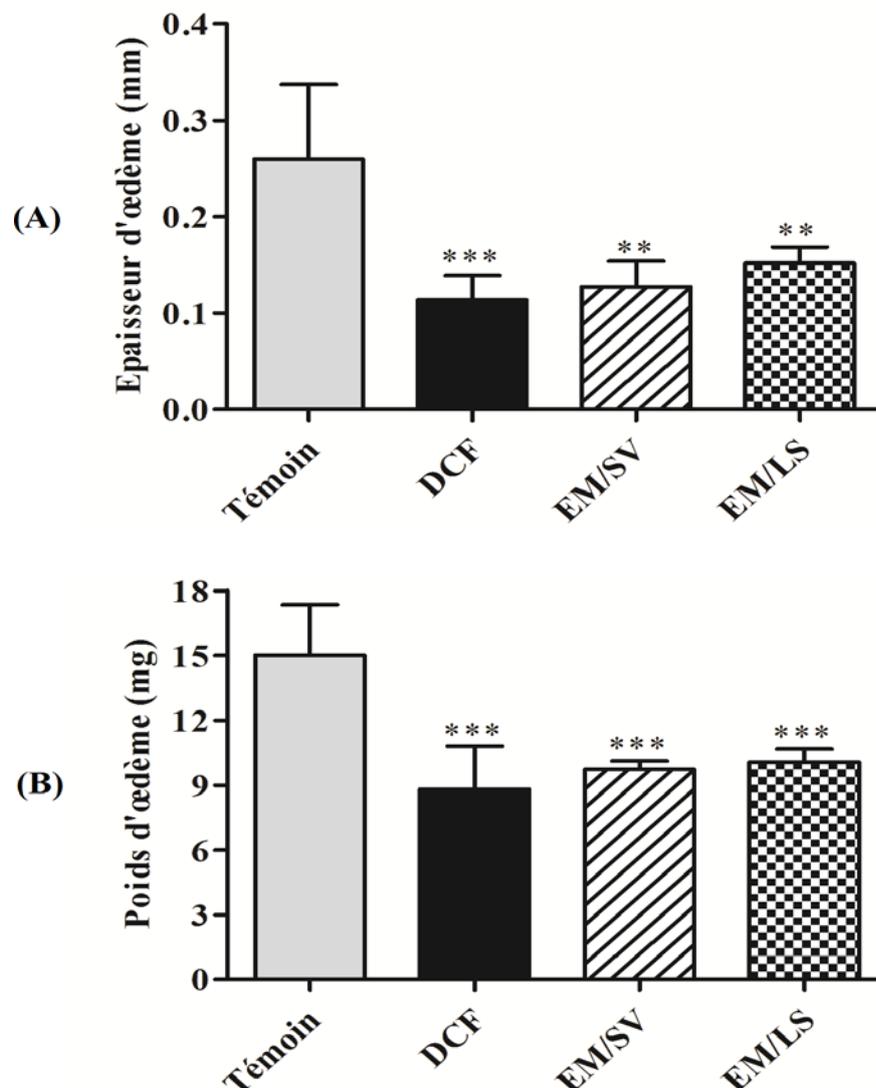
Lot	Dose	Œdème		% d'inhibition	
		Poids	Epaisseur	Poids	Epaisseur
DCF	15 mg/kg	$08.82 \pm 1.98$	$0.11 \pm 0.03$	$36.67 \pm 9.75$	$56.15 \pm 9.65$
EM/SV	100 mg/kg	$09.73 \pm 0.39$	$0.13 \pm 0.03$	$35.17 \pm 2.57$	$50.96 \pm 10.1$
EM/LS	100 mg/kg	$10.07 \pm 0.59$	$0.15 \pm 0.02$	$32.89 \pm 3.93$	$41.54 \pm 6.32$

Les valeurs présentent les moyennes  $\pm$  SEM (n = 6 à 7). Les comparaisons ont été effectuées par rapport au Témoin; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

La comparaison entre l'effet anti-œdémateux de nos extraits et celui de DCF montre que EM/SV et EM/LS présentent une bonne activité anti-œdémateuse, ils ont provoqué des réductions d'épaisseur (Figure 41, A) et de poids (Figure 41, B) très significatives par rapport au témoin ( $p < 0.001$ ).

Il est rapporté par plusieurs auteurs que les espèces de *Salvia* ont des propriétés anti-inflammatoires certifiées par leur utilisation locale pour le traitement des plaies corporelles. Par exemple, Baricevic *et al.* (2001) a étudié l'activité anti-inflammatoire topique des feuilles de *Salvia officinalis* et a constaté que les extraits de solvant inhibaient l'œdème chez les souris

de manière dose-dépendante et l'acide ursolique a été jugé responsable de l'activité anti-inflammatoire après enquête chimique et pharmacologique. Dal-Pra *et al.* (2011) ont montré que l'extrait méthanolique de *Salvia officinalis* a une activité anti-inflammatoire très puissante. Ces chercheurs ont attribué l'activité anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique à leur richesse en composés phénoliques polaires tels que les acides rosmariniques, ursoliques, caféiques et oléanoliques. Ainsi, Piccinelli *et al.* (2014), ont associé l'activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique des feuilles de *Salvia lachnostachys* à la présence d'acide oléanolique et ursolique ; deux tri-terpènes communs en *Salvia*, bien connus comme agents anti-inflammatoires (Topçu, 2006).



**Figure 41.** Comparaison de (A): l'épaisseur et (B): le poids d'œdème d'oreille provoqué par le PMA chez les souris; non traitées (Témoin) et les souris traitées avec le DCF (15 mg/kg),

traitées avec l'EM/SV (100 mg/kg) et traitées avec l'EM/LS (100 mg/kg). Les valeurs présentent les moyennes  $\pm$  SEM (n = 6 à 7). Les comparaisons ont été effectuées par rapport au Témoin; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

Les graines de *L. sativum* possèdent d'importantes activités anti-inflammatoires, anti-pyrétiques, analgésiques et coagulantes (Al-Yahya *et al.*, 1994). Les graines de *L. sativum* contiennent des alcaloïdes, des glycosides cyanogènes (traces), des flavonoïdes, des tanins, des glucosinolates, des stérols et des triterpènes et parmi ces composés il est constaté que l'ensemble des flavonoïdes possèdent une activité anti-inflammatoire (Gabor, 1972, Parmar et Ghosh, 1980).

### 03. Discussion générale

A l'issue de cette étude, l'extrait hydro-méthanolique (EHM) et ses trois fractions (FCh, FAc et FAq) des deux plantes *S. verbenaca* et *L. sativum*, sont trouvés riches en composés phénoliques et en flavonoïdes. Les deux fractions non polaires FAc et FCh des deux plantes, riches en flavonoïdes aglycones et glycosylés, ont montré de puissantes activités antibactériennes vis-à-vis la croissance de 14 souches bactériennes pathogènes Gram-positives et Gram-négatives. Leur activité a été exprimée en termes des diamètres des zones d'inhibition compris entre 09.0 et 27.5 mm et en termes des CMI comprises entre 07.60 et 25.47 mg/ml. Ces deux fractions ont également exhibé une excellente activité inhibitrice sur la croissance de la levure *Candida albicans* avec des diamètres des zones d'inhibition de 24.0 à 26.0 mm.

La FCh/LS et FAc/SV sont les seules ayant présenté une activité contre la croissance des champignons filamenteux testés (*A. flavus*, *A. niger*, *Penicillium sp* et *Fusarium sp*). L'effet de la FCh/LS est considéré fongicide sur les quatre champignons en inhibant la croissance et la sporulation pour plus de 10 jours d'incubation (13.00 à 22.50 mm de diamètre). Alors que, l'effet antifongique présenté par la FAc/SV peut être considéré fongicide sur *Fusarium sp* et fongistatique sur *Penicillium sp*.

Kamatou *et al.* (2007) ont associé la forte activité antibactérienne de la plupart des espèces *Salvia* à la présence de quatre composés dans leurs extraits de solvant nommés: carnosol, 7-O-méthylepirosmanol, acide oleanolique et son isomère l'acide ursolique. Selon Kamatou *et al.* (2008), ces composés actifs ont déjà été détectés dans de nombreuses espèces de Lamiaceae en particulier le carnosol et l'acide ursolique. Kamatou *et al.*, (2006), ont détecté l'acide oleanolique et l'acide ursolique dans l'extrait de *S. verbenaca*. Plus tard, Ben Farhat *et al.* (2013) ont détecté l'acide rosmarinique, l'acide caféique et le carnosol dans l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *S. verbenaca* et en quantités importantes notamment en

acide rosmarinique (0.35 à 2.6 mg/g de poids sec) et en carnosol (0.023 à 0.39 mg/g du poids sec).

Une bonne corrélation est observée dans notre étude, entre la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des fractions FAc et FCh et leur puissance antimicrobienne. Ceci qui indique le grand rôle de ces composés dans le processus d'inhibition de la croissance des bactéries et des champignons testés. Certaines études ont indiqué que les composés phénoliques contribuent de manière significative dans l'activité antibactérienne des extraits de plantes (Cushine et Lamb, 2005, Shan *et al.*, 2007). Cette activité est expliquée par le fait que les composés phénoliques plus oxydés peuvent éventuellement inhiber des enzymes par interaction avec les groupements sulfhydryl ou par interactions plus spécifiques de la protéine (Cushine et Lamb, 2005).

Pour les flavonoïdes, une grande quantité de ces composés est naturellement synthétisée par les plantes pour lutter contre les infections bactériennes, donc il n'est pas surprenant qu'ils présentent une activité antimicrobienne *in vitro* (Tsuchiya *et al.*, 1996; Cushine et Lamb 2005). L'activité antimicrobienne des flavonoïdes a été expliquée par leur capacité de former des complexes avec des protéines extracellulaires solubles et avec la paroi cellulaire bactérienne (Tsuchiya et Inuma, 2000; Cushine et Lamb, 2005). Il est rapporté aussi que les catéchines, peuvent exercer des effets antibactériens par l'inhibition de l'ADN gyrase (Gradisar *et al.*, 2007) et qu'ils sont capables de restaurer la sensibilité de la résistance bactérienne aux antibiotiques tels que pour la tétracycline, les bêta-lactames et pour les inhibiteurs de la bêta-lactamase (Roccaro *et al.*, 2004; Stapleton *et al.*, 2004).

Dans le cas des acides phénoliques, il est signalé que l'acide cinnamique et l'acide caféique sont toxiques pour les microorganismes (Cowan, 1999). Les tanins en tant que phénols polymères hydrosolubles sont généralement présents dans les plantes herbacées et ligneuses supérieures. Les tanins hydrolysables ont un potentiel antibactérien contre l'*Helicobacter*

*pylori* et ils semblent être prometteurs dans l'éradication de la bactérie sans affecter le microbiota intestinal (Funatogawa *et al.*, 2004).

Les modes d'action antifongiques des composés phénoliques sont assez semblables à ceux décrits pour les bactéries, concernant les dommages irréversibles de la membrane cellulaire et la coagulation du contenu cellulaire. De plus, il existe des phénomènes supplémentaires qui sont importants lorsqu'il s'agit de l'activité contre les levures. Le premier est l'établissement d'un gradient de pH à travers la membrane cytoplasmique et le second est le blocage de la production d'énergie des levures qui entraîne une perturbation de la membrane cellulaire (Djilani et Dicko, 2012).

Dans les tests utilisés pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro*, les extraits des deux plantes ont montré un effet scavenger plus puissant *vis-à-vis* le radical DPPH avec des IC<sub>50</sub> de 08.56 à 72.51 µg/ml marquées par les ESV et de 21.51 à 114.11 µg/ml marquées par les ELS. Les extraits des deux plantes ont été également capables d'inhiber l'oxydation du β-carotène durant les 48 d'incubation, notamment les ESV, qui ont enregistré des pourcentages d'inhibition de 78.81 à 84.93 %. Aussi, les extraits des deux plantes ont exhibé de puissant pouvoir réducteur du fer ferreux en fer ferrique marquant ainsi de moindres EC<sub>50</sub> comprises entre 04.7 et 45.5 µg/ml pour les ESV et entre 21.5 et 135.0 pour les ELS. Concernant l'effet chélateur du fer, les extraits polaires (EHM et FAq) des deux plantes ont été plus actifs que les extraits non polaires présentés par la FAc et la FCh. Les extraits des deux plantes ont manifesté d'importante activité protectrice des globules rouges contre la peroxydation lipidique et la lyse induite par l'AAPH, notamment les deux fractions FAc/LS et FAc/SV, qui ont été plus actives que la vitamine c (HT<sub>50</sub>= 185.5 min, 165.1 min et 143.6 min, respectivement).

L'activité antioxydante des extraits peut être attribuée à leur richesse en composés phytochimiques notamment polyphénoliques. Cette contribution est bien certifiée par la

bonne corrélation trouvée entre l'activité antioxydante des différents extraits et leurs teneurs soit en polyphénols totaux soit en flavonoïdes

Les résultats de l'activité antioxydante sont en accord avec plusieurs études ont enregistré une corrélation entre l'efficacité antioxydante et la composition phénolique des espèces *Salvia*. Ces études ont signalé que le carnosol, l'acide rosmarinique et l'acide carnosique avaient les plus grandes activités antioxydantes et que l'acide rosmarinique et ses dérivés sont plus susceptibles d'être responsables de la plupart des activités antioxydantes des composants non-diterpénoïdes dans les espèces de *Salvia* dont *S. verbenaca* (Kamatou *et al.*, 2010; Ben Farhat *et al.*, 2013; Kostic *et al.*, 2015).

Concernant les extraits de *L. sativum*, les résultats sont en accord avec ceux trouvés par Shirwaikar *et al.* (2011), qui ont testé l'activité antioxydante *in vitro* de l'extrait éthanolique en utilisant six tests différents. Ils ont trouvé que l'extrait de *L. sativum* présente un important potentiel antioxydant qu'ils ont associé aux composés polyphénoliques et aux isoflavonoïdes trouvés dans leur extrait.

*In vivo*, les deux extraits EM/SV et EM/LS ont été capables d'améliorer la capacité antioxydante totale du sang des animaux par la dose 100 mg/kg du poids corporel en provoquant un prolongement très significatif du temps de la demi-lyse (HT<sub>50</sub>). Egalement, ces deux extraits ont amélioré la capacité antioxydante du plasma (CAP) déterminée par le test DPPH et le pouvoir réducteur du fer. Au niveau du tissu hépatique les deux extraits ont augmenté l'activité de la catalase et ont diminué le taux sérique de MDA ce qui suggère que les deux extraits EM/SV et EM/LS ont une activité antioxydante *in vivo* et sont capables d'améliorer le statu antioxydant dans le système biologique.

L'étude de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* a montré que l'EM/SL et l'EM/SV ont provoqué des réductions très significatives de l'épaisseur et du poids d'œdèmes, comparées au témoin et au diclofénac (DCF).

### Conclusion et perspectives

En conclusion, on peut considérer les deux plantes étudiées; *S. verbenaca* et *L. sativum*, sont deux sources très riches en molécules bioactives de valeurs thérapeutiques très importantes. Ces composés phytochimiques sont contribués seuls ou en collaboration dans les différentes activités exercées, antimicrobiennes, antioxydantes (*in vitro* et *in vivo*) et anti-inflammatoires *in vivo* des extraits des deux plantes. Donc, toujours il faut prendre en considération l'effet synergique ou antagoniste de la diversité des constituants majeurs et mineurs présents dans les extraits et que la plupart des composés antioxydants et antimicrobiens naturels actent souvent de manière synergique entre eux pour produire un large spectre de propriétés antioxydantes qui créent un système de défense efficace contre les radicaux libres et un large spectre d'activités antimicrobiennes pour tuer ou au moins empêcher la croissance des microbes.

Donc, cette étude est préliminaire surtout en ce qui concerne la plante *S. verbenaca*. Pour cette raison, des études complémentaires approfondies doivent être menées pour les fins suivantes: (1) mieux comprendre les molécules impliquées dans chacune des activités observées et leurs mécanismes d'action, (2) isoler et caractériser les composés actifs dans les extraits des plantes par des méthodes spécifiques, (3) déterminer la sécurité d'utilisation thérapeutique (toxicité aigüe, subaigüe, chronique et sub-chronique). (4) confirmer les différentes propriétés pharmacologiques des plantes *in vivo* en utilisant différentes méthodes d'étude.

### Référence bibliographiques

- Abirami A., Nagarani G., Siddhuraju P. (2014) In vitro antioxidant, anti-diabetic, cholinesterase and tyrosinaseinhibitory potential of fresh juice from Citrus hystrix and C. maxima fruits. *Food Science and Human Wellness*, 3(1): 16-25.
- Abuelgasim A.I., Nuha H.S., Mohammed, A.H. (2008) Hepatoprotective effect of lepidium sativum Against Carbon Tetrachloride Induced Damage in Rats. *Research Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 3: 20-23.
- Acuna-Castroviejo D., Escames G., Leon J., Carazo A., Khaldy H. (2003) Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 527: 549- 557.
- Adam S. I., Salih S. A., Abdelgadir W. S. (2011) "In vitro" Antimicrobial Assessment of "Lepidium sativum" L. Seeds Extracts. *Asian Journal of Medical Sciences*, 3(6): 261-266.
- Adeneye A.A., Ajagbonna O.P., Adeleke T.I., Bello S.O. (2006) Preliminary toxicity and phytochemical studies of the stem bark aqueous extract of Musanga cecropioides in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(3): 374-379.
- Ageel A.M., Tariq M., Mossa J.S., Al-Yahya M.A., Said M.S. (1987) Plants used in Saudi Folk Medicine. Experimental report submitted to the King Abdulaziz City for Science and Technology, King Saud University Press, Riyadh, Saudi Arabia 6: 294.
- Ahmad I., Aqil F. (2007). In vitro efficacy of bioactive extracts of 15 medicinal plants against ES $\beta$ L-producing multidrug-resistant enteric bacteria. *Microbiological Research*, 162(3): 264-275.
- Ahsan S.K., Tariq M., Ageel A.M., Al-Yahya M.A., Shah A.H. (1989) Studies on Some Herbal Drugs Used in Fracture Healing. *International Journal of Crude Drug Research*, 27(4): 235-239.
- Akrayi H. F., Tawfeeq J. D., (2012). Antibacterial activity of Lepidium sativum and Allium porrum extracts and juices against some gram positive and gram negative bacteria. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*, 20(1): 10-16.
- Aleksic V., Knezevic P. (2014). Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of Myrtus communis L. *Microbiological research*, 169(4): 240-254.
- Al-Gubory K. H., Fowler P. A., Garrel C. (2010) The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(10): 1634-1650.
- Al-Gubory K. H. (2014) Environmental pollutants and lifestyle factors induce oxidative stress and poor prenatal development. *Reproductive BioMedicine Online*, 29(1): 17- 31.
- Al-Habori M., Al-Aghbari A.M., Al-Mamary B.M. (2002) Toxicological Evaluation of Catha Edulis Leaves. A Long Term Feeding Experiment in Animals. *Journal of ethnopharmacology*, 83(3): 209-17.
- Almroth B.C., Sturve J., Berglund A. and Forlin L. (2005). Oxidative damage in eelpout (Zoarces viviparus), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 73, 171-180.
- Alvarez-Ortega C., Olivares, J., Martinez J. L. (2013) RND multidrug efflux pumps: what are they good for?. *Frontiers in microbiology*, 4.

## Références bibliographiques

---

- Al-yahya M.A., Mossa J.S., Ageel A.M., Rafatullah S. (1994) Pharmacological and Safety Evaluation Studies on *Lepidium sativum* L, Seeds. *Phytomedicine*, 1(2): 155-159.
- Aly R. (1994) Ecology and epidemiology of dermatophyte infections. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 31(3): 21-25.
- Ameni Dj.; Baghiani A., Boumerfeg S., Dahamna S., Khennouf S., Abu Zarga M.H., Arrar L. (2015) Phytochemical profiles, antioxidant capacity and protective effect against AAPH-induced mouse erythrocyte damage by *Daphne Gnidium* L. Shoots extracts. *International Journal of pharmacy and pharmaceutical Sciences*, 7(11): 148-156.
- Amensour M., Bouhdid S., Fernández-López J., Idaomar M., Senhaji N. S., Abrini J. (2010). Antibacterial activity of extracts of *Myrtus communis* against food-borne pathogenic and spoilage bacteria. *International Journal of Food Properties*, 13(6): 1215-1224.
- Andallu B., Shankaran M., Ullagaddi R., Allagadda V. K. (2011) Efficacy of curry (*Murraya koenigii*) leaves in scavenging free radicals in vitro and controlling oxidative stress in vivo. *Biomedicine and Preventive Nutrition*, 1(4): 263-267.
- Arief N, Arief R.H, Supardjan A. M., Nunung Y. 2010 Evaluation of hepatoprotective and antioxidant activity of hexagamavunon-1 against carbon tetrachloride-induced hepatic injury in rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2(3), 45-48.
- Arikan S., Rex J.H. (2001) Lipid-based antifungal agents: current status. *Current Pharmaceutical Design*, 7(5): 393-415.
- Arnao M.B., Hernandez-Ruiz J. (2006) The physiological function of melatonin in plants. *Plant Signaling Behavior*, 1(3): 89- 95.
- Arora A., Byrem T.M., Nair M.G., Strasburg G.M. (2000) Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373(1): 102-109.
- Aslan A., Güllüce M., Sökmen M., Adigüzel A., Sahin F., Özkan H. (2006) Antioxidant and antimicrobial properties of lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Everinia divaricata*, *Everinia prunastri* and *Neofuscella pulla*. *Pharmacol Biology*, 44(4): 247-252.
- Auberval N. (2010) Prévention du stress oxydant dans le diabète et ses complications par des antioxydants d'origine naturelle. Thèse de doctorat, Ecole doctorales des sciences, université de Strasbourg.
- Baghiani A., Ameni Dj., Boumerfeg S., Adjadj M., Djarmouni M., Charef N., Khennouf S., Arrar L. (2012) Studies of Antioxidants and Xanthine Oxidase Inhibitory Potentials of Root and Aerial Parts of Medicinal Plant *Capparis Spinosa* L. *American Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2(1): 25-32.
- Baghiani A., Boumerfeg S., Belkhiri F., Khennouf S., Charef N., Harzallah D., Arrar L., Abdel-Wahhab M.A. (2010) Antioxidant and radical scavenging properties of *Carthamus caeruleus* L extracts grow wild in Algeria flora. *Comunicata Scientiae*, 1(2): 128-136.
- Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C., Pinkas M., Luycky M., Gazin M. (1996) Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, 46(11): 1086-1089.

## Références bibliographiques

---

- Bailey S.A., Zidell R.H., Perry R.W. (2004) Relationship between organ weight and body/brain weight in the rat: what is the best analytical endpoint?. *Toxicologic Pathology*, 32(4): 448-66.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006) Nutritional and Clinical Methods, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1): 191-203.
- Baricevic D., Sosa S., Della L.R., Tubaro A., Simonovska B., Krasna A., Zupancic A. (2001) Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of ethnopharmacology*, 75(2): 125-132.
- Barriere C., Centeno D., Lebert A., Leroy-Setrin S., Berdague J.L., Talon R. (2001) Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xylosus* in the inhibition of linoleic acid oxidation. *FEMS Microbiology Letters*, 201(2): 181-185.
- Baser K.H.C. (2000) Commercial aspects: production of *Salvia* oil in mediterranean countries. In: Kintzios, S.E. (Ed.), *SAGE—The Genus Salvia*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 263–268.
- Baudry C., Brézellec H. (2006) *Microbiologie, immunologie, Groupe Liaisons* 126 pages.
- Bedard K., Krause K.H., (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 87(1): 245–313.
- Belkhiri F., Baghiani A., (2017) *Plantes Médicinales, Activités Antioxydantes et Antibactériennes, Etude de cas: Tamus communis et Carthamus caeruleus*. Éditions Universitaires Européennes, ISBN: 978-3-330-86516-7.
- Belkhiri F., Baghiani A., Boumerfeg S., Charef N., Khenouf S., Arrar L. (2015) In vitro Antioxidant and Antibacterial Activities of *Tamus communis* L. Root Extracts from Algeria *International Journal of Current Research*, 7(5): 15621-15627.
- Belkhiri F., Baghiani A., Zerroug M. M., Arrar, L. (2017). Investigation of antihemolytic, xanthine oxidase inhibition, antioxidant and antimicrobial properties of *Salvia verbenaca* L. aerial part extracts. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 14(2): 273-281.
- Ben Farhat M.B., Landoulsi A., Hamada R.C., Sotomayor J.A., Jordan M.J. (2013) Phytochemical composition and in vitro antioxidant activity of by-products of *Salvia verbenaca* L. growing wild in different habitats. *Industrial Crops and Products*, 49: 373-379.
- Bevilacqua S. (2011) Évaluation de l'impact d'une équipe opérationnelle en infectiologie sur la consommation et le coût des antibiotiques au CHU de Nancy. (Essai d'intervention contrôlé). Thèse de doctorat, École Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement). Université de Nancy.
- Blumenthal M. (2000). *Herbal medicine, expanded commission E monographs in Integrative Medicine Communications*, Newton.
- Bonnaillie C., Salacs M., Vassiliova E., Saykova I. (2012) Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). *Revue de génie industriel*, 7: 35-45.

## Références bibliographiques

---

- Bonnier G. (1909) La Végétation de la France, Flore Complète. Tome 09, Ed: Suisse et Belgique, Paris. pp. 25-26.
- Borges-Walmsley M. I., Mckeegan K. S., Walmsley A. R. (2003) Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochemical Journal*, 376(2): 313-338.
- Boumerfeg S., Baghiani A., Djarmouni M., Ameni D., Adjadj M., Belkhiri F., Charef N., Khennouf S. and Arrar L. (2012) Inhibitory activity on xanthine oxidase and antioxidant properties of Teucrium polium L. extracts. *Chinese Medicine*, 3(1): 30-41.
- Bouزيد M. A., Hammouda O., Matran R., Robin S., Fabre C. (2014) Changes in oxidative stress markers and biological markers of muscle injury with aging at rest and in response to an exhaustive exercise. *PloS one*, 9(3): 90420.
- Brunke S., Hube B. (2013) Two unlike cousins: Candida albicans and C. Glabrata infection strategies. *Cellular Microbiology*, 15(5): 701-708.
- Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods -a review. *International journal of food microbiology*, 94(3): 223-253.
- Burton G., Jauniaux E. (2011) Oxidative stress. Best practice and research. *Clinical obstetrics and gynaecology*, 25(3): 287-299.
- Cao G., Booth S. L., Sadowski J. A., Prior R. L. (1998) Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *The American journal of clinical nutrition*, 68(5): 1081-1087.
- Carrillo-Munoz A.J., Giusiano G., Ezkurra P.A., Quindós G. (2006) Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 19(2): 130-139.
- Charbon G., Bjorn L., Mendoza-Chamizo B., Frimodt-Moller J., Lobner-Olesen A. (2014) Oxidative DNA damage is instrumental in hyperreplication stress-induced inviability of Escherichia coli. *Nucleic Acids Research*, 42(21): 13228-13241.
- Chatoui K., Talbaoui A., Aneb M., Bakri B., Harhar H., Tabyaoui M. (2016) Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activity of Lepidium sativum seeds from Morocco. *J Mater Environ Sci*, 7: 2938-2946.
- Chaudhuri S., Banerjee A., Basu K., Sengupta B., Sengupta P.K. (2007) Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. *International journal of biological macromolecules*, 41(1): 42-48.
- Chen Y., Deuster P. (2009) Comparison of quercetin and dihydroquercetin: Antioxidant-independent actions on erythrocyte and platelet membrane. *Chemico-Biological Interactions*, 182(1): 7-12.
- Claiborne, A. (1985) Catalase activity. In: Greenwald, R.A., Ed., CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research, CRC Press, Boca Raton, 283-284.
- Codd L.E. (1985) Laminaceae. In: Leistner, O.A. (Ed.), Flora of Southern Africa. Perskor for the Government Printer, Pretoria, pp. 1-247.
- Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J. (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10): 1195-1214.
- Cotticelli M.G., Crabbe A.M., Wilson R.B, Shchepinov M.S. (2013) Insights into the role of oxidative stress in the pathology of Friedreich ataxia using peroxidation resistant polyunsaturated fatty acids. *Redox Biology*, 1(1): 398-404.

## Références bibliographiques

---

- Cox S. D., Mann C. M., Markham J. L. (2001) Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3): 492-497.
- Cowan, M. M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4): 564-582.
- Cushnie T.T., Lamb A.J. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5): 343-356.
- Daglia M. (2012) Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2):174-181.
- Dal Pra V., Bisol L.B., Detoni S., Denti M., Grando J., Pollo C., Pasquali T.R., Hoffmann A.E., Mazutti M.A., Macedo S.M.D. (2011) Anti-inflammatory activity of fractionated extracts of *Salvia officinalis*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 01(07): 67-71.
- Dash D. K., Yeligar V. C., Nayak S. S., Ghosh T., Rajalingam R., Sengupta P., Maity T. K. (2007) Evaluation of hepatoprotective and antioxidant activity of *Ichnocarpus frutescens* (Linn.) R. Br. on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 6(3), 755-765.
- Datta P. K., Diwakar B. K., Viswanatha S., Murthy K. N., Naidu K. A. (2011) Safety evaluation studies on Garden cress (*Lepidium sativum* L.) seeds in Wistar rats. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 4(1): 37-42.
- Davies M.J., Fu S., Wang H., Dean R.T. (1999) Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(11): 1151-1163.
- Decker E.A. and Welch B. (1990) Role of ferritin as lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38(3): 674-677.
- DEEDI, 2016. (Department of Employment, Economic Development and Innovation) Special edition of Environmental Weeds of Australia for Biosecurity Queensland. [www.biosecurity.qld.gov.au](http://www.biosecurity.qld.gov.au)
- Delahousse G., (2003) Les plantes à propriétés antifongiques, Thèse de doctorat en pharmacie, Faculté de pharmacie, université de Nantes, France.
- Delaquis P. J., Stanich K., Girard B., Mazza G. (2002) Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International journal of food microbiology*, 74(1): 101-109.
- Devasagayam T.P.A., Tilak J.C., Boloor K.K., Sane K.S., Ghaskadbi S.S., Lele R.D. (2004) Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal of the Association of Physicians of India*, 52(10): 794-804.
- Develoux M. (2001) Griseofulvin. *Griséofulvine*, 128: 1317-1325.
- Djilani A., Dicko A. (2012). The therapeutic benefits of essential oils. In Nutrition, Well-Being and Health. Dr. Jaouad Bouayed (Ed.), ISBN: 978-953-51-0125-3, InTech.
- Djyh G.b., Adeoti M., Djaman A., Guede G.F., Sess Ed. (2010) Evaluation de la toxicité aiguë de l'extrait total aqueux d'écorces de *Mansonia altissima* (bois bête) chez les souris. *EDUCI. J. sci. pharm. biol.*, 11(2): 13-20.

## Références bibliographiques

---

- Di Pasqua R., Betts G., Hoskins N., Edwards M., Ercolini D., Mauriello G. (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(12), 4863-4870.
- Diwakar B.T., Dutta P.K., Lokesh B.R., Naidu K.A. (2008) Bioavailability and metabolism of n-3 fatty acid rich garden cress (*Lepidium sativum*) seed oil in albino rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 78(2): 123-130.
- Doke S. Guha M. (2014) Garden cress (*Lepidium sativum* L.) Seed - An Important Medicinal Source: A Review. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, 4 (1):69-80.
- Dominguez J. M., Martin J. J. (1998) Identification of elongation factor 2 as the essential protein targeted by sordarins in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(9): 2279-2283.
- Doron S., Gorbach S. L. (2010) Bacterial Infections, Overview. Griffiths J, Maguire JH, Heggenhougen HK, Quah SR. Associate editors. *Public Health and Infectious Diseases*. UK. Elsevier Inc, 3-7.
- Douglas C. M., (2001) Fungal (1,3)-D-glucan synthesis. *Medical Mycology, Supplement*, 39(1): 55-66.
- Du J., Cullen J.J., Buettner G.R. (2012) Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1826(2): 443-457.
- Durackova Z. (2008) Oxidants, antioxidants and oxidative stress. In: Mitochondrial medicine. *Springer Netherlands*, 19-54.
- Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM, Eslami B. (2010) Antihemolytic and antioxidant activities of *Allium paradoxum*. *Central European journal of biology*, 5(3): 338-45.
- Edeas M. (2006) Les antioxydants. PepsiCo France 1 place de la Boule 92024 Nanterre cedex.
- El-Megharbel SM, Hamza RZ, Refat MS. (2014) Preparation, spectroscopic, thermal, antihepatotoxicity, hematological parameters and liver antioxidant capacity characterizations of Cd(II), Hg(II), and Pb(II) mononuclear complexes of paracetamol anti-inflammatory drug. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 131: 534-44.
- Emma A.A., Koffi N., Faustine K.A. (2015) Evaluation de la toxicité aiguë de l'extrait aqueux des feuilles de *Thunbergia atacorensis*, une espèce nouvelle. *European Scientific Journal*, 11(27): 92-100.
- Ercal N., Gurer-Orhan H. Aykin-Burns N. (2001) Toxic metals and oxidative stress Part I: Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1(6): 529-539.
- Erlund I., Silaste M.L., Alfthan G., Rantala M., Kesaniemi Y.A. Aro A. (2002) Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables: Original Communication. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(9): 891-898.
- Falana H., Nofal W., Nakhleh H. (2014) A Review Article *Lepidium Sativum* (Garden cress). *ResearchGate*, 1-8.
- Favier A. (2003) Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-15.

## Références bibliographiques

---

- Ferreira D., Slade D., Marais J.P.J. (2006) Flavans and Proanthocyanidins In: O. M. Anderson and K. R. Markham, Eds., *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 553-616.
- Forman H. J., Augusto O., Brigelius-Flohe R., Dennery P. A., Kalyanaraman B., Ischiropoulos H., Giovanni E.M., Rafael R., Roberts L.J., Vina J., Davies K. J. (2015) Even free radicals should follow some rules: a guide to free radical research terminology and methodology. *Free Radical Biology and Medicine*, 78: 233-235.
- Funatogawa, K., Hayashi, S., Shimomura, H., Yoshida, T., Hatano, T., Ito, H., Hirai, Y. (2004) Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiology and immunology*, 48(4): 251-261.
- Gabor M. (1972) The anti-inflammatory action of flavonoids. Akademia Kiado, Budapest, Hungary.
- Garrido G., González D., Lemus Y., Garcia D., Lodeiro L., Quintero G., Delporte C., Núñez-Sellés A. J., Delgado R. (2004) In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG). *Pharmacological Research*, 50(2): 143-149.
- Garrido J., Borges F. (2013) Wine and grape polyphenols -A chemical perspective. *Food Research International*, 54(2): 1844-1858.
- Georgopapadakou N. H., Walsh T. J. (1996) Antifungal agents: Chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(2): 279-291.
- Gradisar H., Pristovsek P., Plaper A., Jerala R. (2007) Green tea catechins inhibit bacterial DNA gyrase by interaction with its ATP binding site. *Journal of medicinal chemistry*, 50(2): 264-271.
- Gu F., Chauhan V., Chauhan A. (2015) Glutathione redox imbalance in brain disorders. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 18(1): 89-95.
- Guil-Guerrero J.L., Ramos L., Moreno C., Zuniga P.J.C., Carlosama Y.M., Ruales P. (2016) Antimicrobial activity of plant-food by-products: A review focusing on the tropics. *Livestock Science*, 189: 32-49.
- Gulcin I., Beydemir S., Alici H.A., Elmasta M., Buyukokuroglu M.E. (2004) In vitro antioxidant properties of morphine. *Pharmacological Research*, 49(1): 59-66.
- Haj Mouhamed D., Ezzaher A., Neffati F., Douki W., Gaha L., et Najjar M.F. (2012) Etude d'un marqueur du stress oxydant chez les fumeurs: le malondialdéhyde. Immuno-analyse et biologie spécialisée, 27, 153-158.
- Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P. (2007) Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*, 62 (10): 628-638.
- Halliwell B., Gutteridge J. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical journal*, 219(1), 1-14.
- Halliwell B., Gutteridge J.M., (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*, third ed., Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England.
- Halliwell B. (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35: 1147-1150.
- Hammer K. A., Carson C. F., Dunstan J. A., Hale J., Lehmann H., Robinson C. J., Prescott S.L., Riley T.V. (2008). Antimicrobial and anti-inflammatory activity of five *Taxandria fragrans* oils in vitro. *Microbiology and immunology*, 52(11): 522-530.

## Références bibliographiques

---

- Hamza R.Z., Al-Harbi M.S. (2015) Amelioration of paracetamol hepatotoxicity and oxidative stress on mice liver with silymarin and Nigella sativa extract supplements. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(7), 521-531.
- Hardeland R. (2005) Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine*, 27(2): 119-130.
- Hart T., Shears, P. (1999) Atlas de poche de microbiologie, 2ème édition, Traduit de l'anglais par O., Gaillot. Médecine Sciences Flammarion, Paris, pp : 227-247.
- Hartwell J.L. (1982) Plants Used Against Cancer, A Survey. Quarterman Publications, Inc. Massachusetts. 165.
- Hasani P., Yasa N., Vosough-Ghanbari S., Mohammad irad A., Dehghan G. and Abdollahi M. (2007) In vivo antioxidant potential of Teucrium polium, as compared to  $\alpha$ -tocopherol. *Acta Pharmaceutica*, 57(1): 123-127.
- Haslam E. (1993). Polyphenol complexation. In: « Polyphenolic phenomena ». Ed. Scalbert A. INRA (Paris). Chap., 2: 23-31.
- Hauser D., Sigg, H. P. (1971) Isolation and decomposition of sordarin. *Helvetica Chimica Acta*, 54(4): 1178-1190.
- Hay R. J. (2006) Fungal infections. *Clinics in Dermatology*, 24(3): 201-212.
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10): 572-584.
- Heunks L. M., Viña J., van Herwaarden C. L., Folgering H. T., Gimeno A., Dekhuijzen P. R. (1999) Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 277(6): 1697-1704.
- Hu Q., Luo Y. (2016) Polyphenol chitosan conjugates: Synthesis, characterization, and applications. *Carbohydrate Polymers*, 151: 624-639.
- Inoue M., Sato E. F., Nishikawa M., Park A. M., Kira Y., Imada I., Utsumi K. (2003) Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current medicinal chemistry*, 10(23): 2495-2505.
- Jodynis-Liebert J., Nowicki M., Murias M., Adamska T., Ewertowska M., Kujawska M., Piotrowska H., Konwerska A., Ostalska-Nowicka D., Pernak J. (2010) Cytotoxicity, acute and subchronic toxicity of ionic liquid, didecyldimethylammonium saccharinate, in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 57(2): 266-273.
- Joung E.J., Lee M.S., Choi J.W., Kim J.S, Shin T., Yoon N.Y., Lim C.W., Kim J.I., Kim H.R. (2012) Anti-inflammatory effect of B.-M. ethanolic extract from Myagropsis myagroides on murine macrophages and mouse ear edema. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1):171.
- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Steven P. (2002) Botanique systématique: Une perspective phylogénétique. 1ere Ed : Paris et Bruxelles. pp. 369-384.
- Kamatou G. P. P. (2006) Indigenous salvia species – an investigation of Their pharmacological activities and Phytochemistry. Thèse doctorat en philosophie, Faculté des sciences de la santé, Université du Witwatersrand, Johannesburg.

## Références bibliographiques

---

- Kamatou G.P.P., Makunga N.P., Ramogola W.P.N., Viljoen A.M. (2008) South African *Salvia* species: A review of biological activities and phytochemistry. *Journal of ethnopharmacology*, 119(3): 664-672.
- Kamatou G. P. P., Viljoen, A. M., Figueiredo, A. C., Tilney, P. M., Van Zyl, R. L., Barroso, J. G., Van Vuuren, S. F. (2007). Trichomes, essential oil composition and biological activities of *Salvia albicaulis* Benth. and *S. dolomitica* Codd, two species from the Cape region of South Africa. *South African Journal of Botany*, 73(1): 102-108.
- Kamatou G. P., Viljoen A. M., Steenkamp P. (2010). Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. *Food Chemistry*, 119(2): 684-688.
- Karazhiyan H., Razavi S.M.A., Phillips G.O. (2011) Extraction optimization of a hydrocolloid extract from cress seed (*Lepidium sativum*) using response surface methodology. *Food Hydrocolloids*, 25(5): 915- 920.
- Khalil M.Y., Moustafa A.A., Naguib N.Y. (2007) Growth, phenolic compounds and antioxidant activity of some medicinal plants grown under organic farming conditions. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3(4): 451-457.
- Khalili M., Ebrahimzadeh M. A., Safdari Y. (2014) Antihemolytic activity of thirty herbal extracts in mouse red blood cells. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 65(4): 399-406.
- Khlifi S., El Hachimi Y., Khalil A., Es-Safi N., Belahyan A., Tellal R., El Abbouyi A. (2006) In vitro antioxidant properties of *Salvia verbenaca* L. hydromethanolic extract. *Indian journal of pharmacology*, 38(4): 276-280.
- Khosravi Dehaghi N., Ostad S. N., Maafi N., Pedram S., Ajani Y., Hadjiakhoondi A., Khanavi M. (2014) Cytotoxic activity of the essential oil of *Salvia verticillata* L. *Research Journal of Pharmacognosy*, 1(3): 27-33.
- Kloos H. (1976) Preliminary Studies of Medicinal Plants and Plant products in Ethiopian markets. *Journal of Ethiopian Pharmaceutical Association*, 2: 18-28.
- Kohanski M.A., Dwyer D. J., Collins, J. J. (2010) How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature reviews Microbiology*, 8(6): 423-435.
- Kostic M., Zlatkovic, B., Miladinovic, B., Zivanovic S., Mihajilov Krstev T., Pavlovic D., Kitic D. (2015) Rosmarinic acid levels, phenolic contents, antioxidant and antimicrobial activities of the extracts from *Salvia verbenaca* L. obtained with different solvents and procedures. *Journal of Food Biochemistry*, 39(2): 199-208.
- Kumar P., Sharma R., Ray S., Mehariya S., Patel S.K., Lee J.K., Kalia V.C. (2015) Dark fermentative bioconversion of glycerol to hydrogen by *Bacillus thuringiensis*. *Bioresource technology*, 182: 383-388.
- Kumar S., Pandey A.K. (2013) Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Hindawi The Scientific World Journal*, (ID: 162750): 1-16.
- Kumarappan C. T., Thilagam E., Mandal S. C. (2012) Antioxidant activity of polyphenolic extracts of *Ichnocarpus frutescens*. *Saudi journal of biological sciences*, 19(3): 349-355.
- Lahsissene H., Kahouadji A., Tijane M., Hseini S. (2009). Catalogue des plantes medicinales utilisees dans la region de zaër (maroc occidental). Revue de botanique. Les Editions De LEJEUNIA, Institut de Botanique, B22, Sart Tilman, B-4000 Liège (Belgique). Série N°186.

## Références bibliographiques

---

- Le K., Chiu F., Ng K. (2007) Identification and quantification of antioxidants in Fructus lycii. *Food Chemistry*, 105(1), 353-363.
- Lee J.H., Renita M., Fioritto R.J., StMartin S.K., Schwartz S.J., Vodovotz Y. (2004) Isoflavone characterization and antioxidant activity of Ohio soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9): 2647-2651.
- Levinson W. (2006) Review of medical microbiology and immunology, Chapter 48 Cutaneous and subcutaneous mycoses, McGraw-Hill Education, 4th edition, 659.
- Li H., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F. and Jiang Y. (2007) Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*, 102(3): 771-776.
- Li X., Luo Y., Wang L., Li Y., Shi Y., Cui Y., Xue M. (2010) Acute and subacute toxicity of ethanol extracts from *Salvia przewalskii* Maxim in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(1): 110-115.
- Litescu SC., Eremia S., Radu G.L. (2010) Methods for determination of antioxidant capacity in food and raw materials. *Bio-Farms for Nutraceuticals Advances in Experimental Medicine and Biology, US: Springer*, 698(18): 241-9.
- Liyana-Pathirana C.M., Shahidi F. (2006) Antioxydant Propreties of Commercial Soft and Hard Winter Wheats (*Triticum aestivum* L.) and Their Milling Fractions, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(3): 477-485.
- Loizzo M.R., Tundis R., Bonesi M. Menichini F., Mastellone V., Avallone L., Menichini F. (2012) Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona cherimola* Mill. (cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(2): 179-184.
- Lowes D.A., Webster N.R., Murphy M.P., Galley H.F. (2013) Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. *British journal of Anaesthesia*, 110(3): 472-480.
- Lupi O., Tyring S. K., McGinnis M. R. (2005) Tropical dermatology: Fungal tropical diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 53(6): 931-954.
- Lushchak V.I. (2014) Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its Classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224: 164-175.
- Machlin L. J., Bendich A. (1987) Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal*, 1(6): 441-445.
- Maes M., Galecki P., Chang Y. S., Berk M. (2011) A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(3): 676-692.
- Magalhães A.S., Silva B.M., Pereira J.A., Andrade P.B., Valentão P., Carvalho M. (2009) Protective effect of quince (*Cydoniaoblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes. *Food and chemical toxicology*, 47(6): 1372-1377.
- Maghzal G. J., Krause K. H., Stocker R., Jaquet V. (2012) Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(10): 1903-1918.

## Références bibliographiques

---

- Maier U.H, Gundlach, H., Zenk, M.H. (1998) Seven imidazole alkaloids from *Lepidium sativum*. *Phytochemistry*, 49(6): 1791-1795.
- Mali R.G., Mahajan S.G., Mehta A.A. (2007) *Lepidium sativum* (Garden cress): a review of contemporary literature and medicinal properties. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 7(4): 331-335.
- Markham K.R. (1982) Techniques of flavonoid identification. *London: Academic press*, Vol. 31.
- Marnett L.J. (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21(3): 361-370.
- Martins S., Mussatto S.I., Martinez A.G., Montanez S.J., Aguilar C.N., Teixeira J.A. (2011) Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation: A review. *Biotechnology Advances*, 29(3): 365-373.
- Maurya P. K., Noto C., Rizzo L. B., Rios A. C., Nunes S. O.V., Barbosa D. S., Sethi S., Zeni M., Mansur R. B., Maes M., Brietzke E. (2016) The role of oxidative and nitrosative stress in accelerated aging and major depressive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 65: 134-144.
- May J.M. (2012), Vitamin C transport and its role in the central nervous system. *Sub-cellular Biochemistry*, 56: 85-103.
- Meir S., Kanner J., Akiri B., Philosoph-Hadas S. (1995) Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *Journal of agricultural and food chemistry*, 43(7): 1813-1819.
- Michalczyk D., Drozdowicz A., Pintscher S., Plonka P.M. (2011) Mycotoxin bloom in a hydroponic culture of garden cress (*Lepidium sativum* L.). *International Journal of Food Microbiology*, 145(1): 336-341.
- Miwa S., Muller F.L. and Beckman K.B. (2008) The basics of oxidative biochemistry. In: *Oxidative stress in aging. Aging Medicine*, 11-35.
- Monte J., Abreu A.C., Borges A., Simões L.C., Simões M. (2014) Antimicrobial activity of selected phytochemicals against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and their biofilms. *Pathogens*, 3(2): 473-498.
- Molino S., Dossena M., Buonocore D., Ferrari F., Venturini L., Ricevuti G., Verri M. (2016) Polyphenols in dementia: From molecular basis to clinical trials. *Life Sciences*, 161: 69-77.
- Moroh J.L.A. (2013) Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de *Morinda morindoides*. Thèse de doctorat, École Doctorale SICMA, Université de Bretagne Occidentale (France) et Université Felix Houphouët Boigny (Côte d'Ivoire), sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne.
- Mukinda T.J., Eagles F.K.P. (2010) Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Polygala fruticosa* in female mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(1): 236-240.
- Naczek M., Shahidi F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1): 95-111.
- Nayak P.S., Upadhyaya S.D., Upadhyaya A. (2009) A HPTLC Densitometer Determination of Sinapic Acid in Chandrasur (*Lepidium sativum*). *Journal of Scientific Research*, 1(1): 121-127.

## Références bibliographiques

---

- Nett J. E., Andes D. R. (2016) Antifungal agents: spectrum of activity, pharmacology, and clinical indications. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(1): 51-83.
- Newman D.K., Kennedy E.K., Coates J. D., Ahmann D., Ellis D.J., Lovley D.R., Morel F.M. (1997) Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp. nov. *Archives of Microbiology*, 168(5): 380-388.
- Nithiyantham S., Siddhuraju P., Francis G. (2013) A promising approach to enhance the total phenolic content and antioxidant activity of raw and processed *Jatropha curcas* L. kernel meal extracts. *Industrial crops and products*, 43: 261-269.
- Nostro A., Germano M.P., D'Angelo V., Marino A., Cannatelli M.A. (2000) Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letter Applied Microbiology*, 30: 379-384.
- Odds F. C., Brown A. J. P., Gow N. A. R. (2003) Antifungal agents: Mechanisms of action. *Trends in Microbiology*, 11(6): 272-279.
- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. (1979) Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2): 351-358.
- Okokon J. E., Simeon J. O., Umoh E. E. (2017) Hepatoprotective activity of the extract of *Homalium letestui* stem against paracetamol-induced liver injury. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 7(1), 27.
- O'Mahony J.A., Fox P.F., Kelly A.L. (2013) Indigenous enzymes of milk advanced dairy chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects. 4<sup>th</sup> Edition, *Springer Science Business Media New York*, 337-385.
- Onnis V., Logu A.D., Cocco M.T., Fadda R., Meleddu D., Congiu C. (2009) 2-Acylhydrazino-5-arylpyrrole derivatives: synthesis and antifungal activity evaluation. *European journal of medicinal chemistry*, 44(3): 1288-1295.
- Osawa K., Yasuda H., Maruyama T., Morita H., Takeya K., Itokawa H. (1992) Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 40(11): 2970-2974.
- Ostrosky Z.L., Casadevall A., Galgiani J.N., Odds F.C., Rex J.H. (2010) An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nature reviews Drug discovery*, 9(9): 719-727.
- Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-315.
- Parmar N. S., Ghosh M. N. (1980) Current trends flavonoid research. *Indian Journal of Pharmacology*, 12(4): 213-218.
- Pauli A. (2006) Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. *Medicinal research reviews*, 26(2): 223-268.
- Pawlikowska P.B., Gruszecki W.I., Misiak L.E., Gawron A. (2003) The study of the quercetin action on human erythrocyte membranes. *Biochemical pharmacology*, 66(4): 605-612.
- Peixoto F.P., Carrola J., Coimbra A.M., Fernandes C., Teixeira P., Coelho L., Conceição I., Oliveira M.M., Fernande A.F. (2013) Oxidative stress responses and histological hepatic alterations in barbel, *barbus bocagei*, from vizela river, Portugal. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 29(1): 29-38.

## Références bibliographiques

---

- Pfaller M.A., Sutton D.A. (2006) Review of in vitro activity of sertaconazole nitrate in the treatment of superficial fungal infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 56(2): 147-152.
- Piccinelli A.C., Aquino D.F.d.S., Morato P.N., Kuraoka-Oliveira Â.M., Strapasson R.L.B., Santos É.P.d., Stefanello M.É.A., Oliveira R.J., Kassuya C.A.L. (2014) Anti-Inflammatory and Antihyperalgesic Activities of Ethanolic Extract and Fruticulin A from *Salvia lachnostachys* Leaves in Mice. *Hindawi Publishing Corporation: Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume 2014, Article ID 835914, 1-8.
- Pierce C.G., Srinivasan A., Uppuluri P., Ramasubramanian A.K., Lopez R.J.L. (2013) Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. *Current opinion in pharmacology*, 13(5): 726-730.
- Pierce G.E. (2005) *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, and device-related nosocomial infections: implications, trends, and potential approaches for control. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(7): 309-318.
- Pietta P.G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63 (7): 1035-1042.
- Pigeolet E., Corbisier P., Houbion A., Lambert D., Michiels C., Raes M., Remacle J. (1990) Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mechanisms of ageing and development*, 51(3), 283-297.
- Pinto E., Salgueiro L.R., Cavaleiro C., Palmeira A., Gonçalves M. J. (2007) In vitro susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. *Industrial Crops and Products*, 26(2): 135-141.
- Pincemail J., Cillard J., Nève J., Defraigne J.O. (2014) Mesure de la capacité antioxydante globale du plasma : une revue critique. *Annales de biologie clinique*, 72(4): 413-21.
- Pisoschi A. M., Pop A. (2015) The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97: 55-74
- Popovici C., Saykova I., Tylkowski B. (2009) Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4: 25-39.
- Prajapati V. D., Maheriya P.M., Jani G.K., Patil P.D., Patel B.N. (2014) *Lepidium sativum* Linn: A current addition to the family of mucilage and its applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65: 72-80.
- Prasad V.K., Kavita N.Y., Rakesh S.S., Nupura S.N., Ashish S.P., Manohar J.P. (2012) *Lepidium sativum*: an ethnobotany and phytopharmacological. *International Journal of Drug Formulation and Research*, 3: 3.
- Radwan H.M., El-Missiry M.M., Al-Said W.M., Ismail A.S., Abdel Shafeek K.A. (2007) Investigation of the glucosinolates of *Lepidium sativum* growing in Egypt and their biological activity. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2 (2): 127-132.
- Rajendran P., Nandakumar N., Rengarajan T., Palaniswami R., Gnanadhas E.N., Lakshminarasiah U., Gopas J., Nishigaki I. (2014) Antioxidants and human diseases. *Clinical Chemical Acta*, 436: 332-347.
- Rahal K. (2005) Standardisation de L'antibiogramme en Médecine Humaine à l'Echelle Nationale

## Références bibliographiques

---

selon les recommandations de l'OMS, 4ème édition, Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière.

- Rahal A., Kumar A., Singh V., Yadav B., Tiwari R., Chakraborty S. and Dhama K. (2014) Oxidative stress, prooxidants and antioxidants: the interplay. *BioMed Research International*, V2014: 1-14.
- Rao S.P., Kalva S., Yerramilli A., Mamidi S. (2011) Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants. *Free Radicals and Antioxidants*, 1(4): 2-7.
- Rastija V. Medic-Saric M. (2009) QSAR study of antioxidant activity of wine polyphenols. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 44(1): 400-408.
- Raval, N. (2016) A comprehensive review of lepidium sativum linn, a Traditional medicinal plant. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5 (5): 1593-1601.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B. (1995) The Relative Antioxidant Activities Of Plant-Derived Polyphenolic Flavonoids. *Free radical research*, 22(4): 375-383.
- Roccaro A. S., Blanco A. R., Giuliano F., Rusciano D., Enea V. (2004) Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(6): 1968-1973.
- Schmidt B.M., Ilic N., Poulev A., Raskin I. (2007) Toxicological evaluation of a chicory root extract. *Food and chemical toxicology*, 45(7): 1131-1139.
- Schultz E., Gmelin R. (1952) Isolation of glycoside of *Lepidium sativum* in the pure state by column chromatography. *Arzneimittelforschung*, 2: 568-569.
- Scorzoni L., Sangalli-Leite F., de Lacorte Singulani J., Costa-Orlandi C. B., Fusco-Almeida A.M., Mendes-Giannini M.J.S. (2016) Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. *Journal of microbiological methods*, 123: 68-78.
- Seeram N. P., Nair M. G. (2002) Inhibition of lipid peroxidation and structure–activity related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(19): 5308-5312.
- Senguttuvan J., Paulsamy S., Karthika K. (2014) Phytochemical analysis and evaluation of leaf and root parts of the medicinal herb, *Hypochoeris radicata* L. for in vitro antioxidant activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(1): S359-S367
- Shaikh R.U., Pund M.M., Gacche R.N. (2016) Evaluation of anti-inflammatory activity of selected medicinal plants used in Indian traditional medication system in vitro as well as in vivo. *Journal of traditional and complementary medicine*, 6(4): 355-361.
- Shan B., Cai Y. Z., Brooks J. D., Corke H. (2007) The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of food microbiology*, 117(1): 112-119.
- Shen H., Witowski S. R., Boyd B. W., Kennedy R. T. (1999) Detection of peptides by precolumn derivatization with biuret reagent and preconcentration on capillary liquid chromatography columns with electrochemical detection. *Analytical chemistry*, 71(5): 987-994.
- Shirwaikar A., Patel B., Kamariya Y., Parmar V., Khan S. (2011) In vitro Free Radical Scavenging Potential of Defatted Ethanolic Extract of the Seeds of *Lepidium sativum* Linn. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 9(6): 0435-0440.

## Références bibliographiques

---

- Singh N., Rajini P.S. (2008) Antioxidant-mediated protective effect of potato peel extract in erythrocytes against oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions*, 173(2): 97-104.
- Singh S.B. (2012) Antibiotic Discovery and Development. Editors: Dougherty, Thomas J., Pucci, Michael J: Springer, 821-841.
- Singh U., Devaraj S., Jialal I. (2005) Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annual Review of Nutrition*, 25: 151-175.
- Siti H.N., Kamisah Y., Kamsiah J. (2015) The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease: a review. *Vascular Pharmacology*, 71: 40-56.
- Sokmen A., Gulluce M., Akpulat H. A., Daferera D., Tepe B., Polissiou M., Sahin F. (2004) The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food control*, 15(8): 627-634.
- Song Y.Y., Barlow P.J. (2004) Antioxidant capacity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88(3): 411-417.
- Sowndhararajan K., Siddhuraju P., Manian S. (2011) Antioxidant and free radical scavenging capacity of the underutilized legume, *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(2): 160-165.
- Spector R., Johanson C.E. (2014) The nexus of vitamin, homeostasis and DNA synthesis and modification in mammalian brain. *Molecular Brain*, 7(3): 1-9.
- Sung C.C., Hsu Y.C, Chen C.C, Lin Y.F., Wu C.C. (2013) Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Hindawi Publishing Corporation, Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2013, Article ID 301982, 15 pages
- Stapleton P. D., Shah S., Anderson J. C., Hara Y., Hamilton-Miller J. M., Taylor, P. W. (2004) Modulation of  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. *International journal of antimicrobial agents*, 23(5): 462-467.
- Suwalsky M., Orellana P., Avello M., Villena F. (2007) Protective effect of *Ugni molinae* Turcz against oxidative damage of human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 45(1): 130-135.
- Sylvie C., Pharm B.M.S. (2003) Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel*, 36(1): 25-40.
- Taarit M. B., Msaada K., Hosni K., Amor N. B., Marzouk B., Kchouk M. E. (2010) Chemical composition of the essential oils obtained from the leaves, fruits and stems of *Salvia verbenaca* L. from the northeast region of Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, 22(5): 449-453.
- Takebayashi J. and Chen J. and Tai A. (2010) A method for evaluation of antioxidant activity based on inhibition of free radical-induced erythrocyte hemolysis. *Advanced protocols in oxidative stress II*, 594: 287-296.
- Tawfeeq J.D., Akrayi H.F. (2012) Antibacterial activity of *Lepidium sativum* and *Allium porrum* extracts and juices against some gram positive and gram negative bacteria. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*, 20(1): 10-16.
- Tepe B. (2008) Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Benth) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. *Bioresource Technology*, 99(6): 1584-1588.

## Références bibliographiques

---

- Thembo K. M., Vismer H.F., Nyazema N.Z., Gelderblom W.C.A., Katerere D.R. (2010) Antifungal activity of four weedy plant extracts against selected mycotoxigenic fungi. *Journal of applied microbiology*, 109(4): 1479-1486.
- Topçu G. (2006) Bioactive triterpenoids from *Salvia* species. *Journal of Natural Products*, 69(3): 482-487.
- Topçu G., Ay M., Bilici A., Sarıkurkcu C., Ozturk M. and Ulubelen A. (2007) A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103(3): 816-822.
- Trabsa H., Boumarfegue S., Baghiani A., Boussoualim N., Krache I., Khennouf S., Arrar L. (2014) Anti-Haemolytic, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory effect of *Sedum Sediforme* shoot extracts, *International journal of indigenous medicinal plants*. 47(1): 1502-1510.
- Tsai P.W., Chen Y.T., Hsu P.C., Lan, C.Y. (2013) Study of *Candida albicans* and its interactions with the host: a mini review. *Biomedicine*, 3(1): 51-64.
- Tsang A.H.K., Chung, K.K.K. (2009) Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1792(7): 643-650.
- Tsuchiya H., Sato M., Miyazaki T., Fujiwara S., Tanigaki S., Ohyama M., Tanaka T., Iinuma M. (1996) Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ethnopharmacol*, 50(1): 27-34.
- Tsuchiya H., Iinuma M. (2000) Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine*, 7(2): 161-165.
- Umana U. E., Timbuak J. A., Musa S. A., Asala S., Hambolu J., Anuka A. J. (2013) Acute and chronic hepatotoxicity and nephrotoxicity: study of orally administered chloroform extract of *Carica papaya* seeds in adult Wistar rats. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 3(4): 1-8.
- Uys J.D., Mulholland P.J., Townsend D.M. (2014) Glutathione and redox signaling in substance abuse, *biomed. Pharmacother*, S0753-3322.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemical Cell Biology*, 39(1): 44-84.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1): 1-40.
- Vecht-Lifshitz S.E., Sasson Y., Braun S. (1992) Nikkomycin production in pellets of *Streptomyces tendae*. *Journal of Applied Bacteriology*, 72(3): 195-200.
- Vermes A., Guchelaar H. J., Dankert J., (2000) Flucytosine: A review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(2): 171-179.
- Vielma J. R., Bonilla E., Chacin-Bonilla L., Mora M., Medina-Leendertz S., Bravo Y. (2014) Effects of melatonin on oxidative stress, and resistance to bacterial, parasitic, and viral infections: a review. *Acta tropica*, 137: 31-38.
- Wadhwa, S., Panwar, M. S., Agrawal, A., Saini, N., Patidar, L.N. (2012) A Review On Pharmacognostical Study Of *Lepidium Sativum*. *Advance Research in Pharmaceuticals and Biologicals*, 2 (4): 316-323.

## Références bibliographiques

---

- Wallace A.D., Meyer S.A. (2010) Hepatotoxicity. In: A Textbook of Modern Toxicology. 4 th ed. John Wiley & Sons. Inc (Hoboken, New Jersey), 277-290.
- Wang Y., Chun O.K., Song W.O., (2013) Plasma and dietary antioxidant status as cardiovascular disease risk factors: a review of human studies. *Nutrients*, 5(8): 2969-3004.
- Wang Y., Yang M., Lee S. G., Davis C. G., Koo S. I., Chun O.K. (2012) Dietary total antioxidant capacity is associated with diet and plasma antioxidant status in healthy young adults. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 112(10), 1626-1635.
- White T. C., Marr K. A., Bowden R. A., (1998) Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2): 382-402.
- Wiederhold N.P., Patterson T.F. (2015) What's new in antifungals: an update on the in-vitro activity and in-vivo efficacy of new and investigational antifungal agents. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 28(6): 539-45.
- Wills D.E. (1985) Biochemical Basis of medicine. 3rd Edn., John Wright and sons Ltd., Bristol, England, pp. 267-268.
- Winkel-Shirley B. (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3): 218-223.
- Winterbourn C.C. (2015) Are free radicals involved in thiol based redox signaling?, *Free Radical Biology and Medicine*, 80: 164-170
- Wu J. Q., Kosten T. R., Zhang X.Y., (2013), Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 46: 200-206.
- Yamaguchi F., Ariga T., Yoshimira Y., Nakazawa H. (2000) Antioxidant and anti-glycation of carcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2): 180-185.
- Yamaguchi M.U., Garcia F.P., Cortez D.A., Ueda-Nakamura T., Filho B.P., Nakamura C.V. (2011) Antifungal effects of ellagitannin isolated from leaves of *Ocotea odorifera* (Lauraceae). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99(3): 507-514.
- Yu L. (2001) Free radical scavenging properties of conjugated linoleic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7): 3452-6.
- Zangar R. C., Davydov D. R., Verma S. (2004) Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and applied pharmacology*, 199(3): 316-331.
- Zerargui F., Boumerfeg S., Charef N., Baghiani A., Djarmouni M., Khennouf S., Arrar L., Abu Zarga M., Mohammad S. (2015) Antioxidant potentials and Xanthine Oxidase Inhibitory effect of two furanocoumarins isolated from *Tamus communis* L. *Medicinal chemistry*, 11: 506-513.
- Zhao H.X., Zhang H.S., Yang S.F. (2014) Phenolic compounds and its antioxidant activities in ethanolic extracts from seven cultivars of Chinese jujube. *Food Science and Human Wellness*, 3(3): 183-190.
- Zia-Ul-Haq, M., Ahmad, S., Calani, L., Mazzeo, T., Rio, D.D., Pellegrini N., Feo V.D. (2012). Compositional Study and Antioxidant Potential of *Ipomoea hederacea* Jacq. And *Lepidium sativum* L. Seeds. *Molecules*, 17(9): 10306-10321.

أجريت الدراسة الحالية لتقييم الخصائص المضادة للميكروبات و المضادة للأكسدة وكذا الخصائص المضادة للالتهابات لمستخلصات الجزء الهوائي ل نبتة *Salvia verbenaca* (ESV) ومستخلصات بذور نبتة *Lepidium sativum* (ELS). أعطى التقدير الكمي لعديدات الفينول والفلافونويدات في ESV و ELS مستويات عالية جدا، وخاصة في الـ FAc/SV. تميزت المستخلصات FAc و FCh للنبتين بنشاطية ضد مكروبية قوية تجاه 14 سلالة بكتيرية ممرضة غرام + وغرام - إما من حيث أقطار مناطق التثبيط (09.0 إلى 27.5 ملم) أو من حيث قيم CMI التي تراوحت بين 07.38 و 27.12 ملغ/م. كما أظهرت هذه المستخلصات نشاط مثبط ممتاز ضد خميرة *C. albicans* بقطر تثبيط تراوحت بين 24.0 و 26.0 ملم. كان FAc/SV و FCh/LS المستخلصين النشيطين الوحيدين ضد نمو الفطريات الخيطية التي تم اختبارها. حيث أظهر FCh/LS تأثير قاتل على جميع الفطريات بتثبيطه النمو والتبوغ لأكثر من 10 أيام من الحضن. بينت اختبارات النشاطية المضادة للأكسدة مخبريا، أن مختلف المستخلصات ESV و ELS كان لها تأثير قوي في إزاحة جذر DPPH، حيث كانت قيم الـ IC<sub>50</sub> من 08.56 إلى 72.51 ميكروغرام/م. للـ ESV ومن 21.51 إلى 114.11 للـ ELS. كما تمكنت هذه المستخلصات من تثبيط أكسدة β-كاروتين، وخاصة مستخلصات ESV، التي سجلت I% من 78.81 إلى 84.93%. أيضا أظهرت ESV و ELS قدرة كبيرة في إرجاع الحديد حيث سجلت قيم منخفضة في EC<sub>50</sub> بين 04.7 و 45.5 ميكروغرام/م. للـ ESV وبين 21.5 و 135.0 ميكروغرام/م. للـ ELS. في المقابل، عند اسخلاب الحديد، كان المستخلص القطبي EHM و FAq لكلا النبتتين أكثر نشاطا من الأجزاء غير القطبية (FAc و FCh). من جهة أخرى، أظهرت ESV و ELS نشاطا كبيرا ضد انحلال كريات الدم الحمراء الذي يسببه AAPH، خصوصا FAc/LS و FAc/SV، حيث كانت قيم (HT<sub>50</sub>): 185.5، 165.1 دقيقة، على التوالي. بالنسبة للدراسة في الحي، لم ينتج عن المعالجة بـ EM/LS (2 و 5 غ/كغ من وزن الجسم) أي آثار ضارة أو وفيات في الفئران، في حين أن EM/SV كان تقريبا سام بالجرعة 5 غ/كغ من وزن الجسم. ساهم استعمال الجرعة 100 ملغ/كغ من وزن الجسم من المستخلصين في تحسن كبير في القدرة المضادة للأكسدة الكلية لدم ولبلازما الحيوانات. كما أدت هذه الجرعة إلى تحسن نشاطية إنزيم الكاتالاز (CAT) والتقليل من كمية MDA في أنسجة الكبد. وأخيرا فيما يتعلق بالنشاط المضاد للالتهابات، أظهر EM/LS و EM/SV بجرعة 100 ملغ/كغ نشاطا جيدا مضادا للوذمة (œdème)، حيث أديا إلى انخفاض كبير في سمك ووزن الوذمة مقارنة مع الشاهد.

## Résumé

La présente étude a été réalisée pour évaluer les propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et anti-inflammatoires des extraits de la partie aérienne de *Salvia verbenaca* (ESV) et des graines de *Lepidium sativum* (ELS). La quantification des polyphénols et des flavonoïdes dans les ESV et ELS a donné des teneurs très importantes notamment dans la FAc/SV. Les deux fractions FAc et FCh des deux plantes ont montré une activité antibactérienne puissante contre 14 souches bactériennes pathogènes, Gram+ et Gram-, soit en termes des DI (09.0 à 27.5 mm) soit en termes des CMI (07.60 et 25.47 mg/ml). Ces deux fractions ont également exhibé une excellente activité contre la levure *C. albicans* avec des DI compris entre 24.0 et 26.0 mm. La FCh/LS et FAc/SV ont été les seules actives contre la croissance des champignons filamenteux testés. Cependant, la FCh/LS a présenté un effet fongicide exprimé par l'inhibition de la germination des champignons pour 10 jours d'incubation. A l'issue des tests d'activité antioxydante *in vitro*, les ESV et ELS ont montré un effet scavenger très puissant du radical DPPH avec des IC<sub>50</sub> de 08.56 à 72.51 µg/ml pour les ESV et de 21.51 à 114.11 µg/ml pour les ELS. Ils ont également inhibé l'oxydation du β-carotène, notamment les ESV, qui ont marqué des I% de 78.81 à 84.93 %. Aussi, les ESV et ELS ont exhibé de puissant pouvoir réducteur du fer marquant ainsi de moindres EC<sub>50</sub>, 04.7 à 45.5 µg/ml pour les ESV et 21.5 à 135.0 µg/ml pour les ELS. Pour la chélation du fer, l'EHM et la FAq (polaires), ont été plus actifs que les fractions non polaires. D'autre part, les ESV et ELS ont manifesté d'importante activité contre la lyse induite par l'AAPH, notamment la FAc/LS et la FAc/SV (HT<sub>50</sub>= 185.5 et 165.1 min, respectivement). *In vivo*, l'administration aigüe d'EM/LS en deux doses, 2 et 5 g/kg du PC n'a produit aucun effet néfaste ou cas de mortalité chez les souris, tandis que, l'EM/SV était presque toxique avec la dose 5 g/kg. La dose 100 mg/kg d'EM/SV et d'EM/LS, a induit une amélioration significative de la CA totale du sang et du plasma des souris. Cette dose a significativement amélioré l'activité CAT et réduit le taux du MDA dans le tissu hépatique. Enfin, en ce qui concerne l'activité anti-inflammatoire, l'EM/SV et l'EM/LS ont présenté un bon effet anti-œdémateux, ils ont provoqué des réductions très significatives d'épaisseur et de poids d'œdèmes par apport au témoin.