



**DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE**

**Thèse**

Présentée par

**SAFFIDINE KARIMA**

Pour l'obtention du diplôme de

**Doctorat en Sciences**

**Filière: Biologie**

**Spécialité: microbiologie**

Thème

**Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de  
*Carthamus caeruleus L.* et de *Plantago major L.***

Soutenue publiquement le **10/12/2015**

Devant le Jury

Président  
Directeur  
Co-directeur  
Examineurs

**HARZALLAH Daoud**  
**SAHLI Farida**  
**ZERROUG Mohamed Mihoub**  
**ZELLAGUI Amar**  
**HOUALI Karim**  
**IDOUI Tayeb**

**Pr. UFA Sétif 1**  
**MCA CHU Sétif 1**  
**Pr. UFA Sétif 1**  
**Pr. U. Oum El Bouaghi**  
**Pr. U. Tizi-Ouzou**  
**MCA U. Jijel.**

*Laboratoire de Microbiologie Appliquée*

## ملخص

أنجزت هذه الدراسة طبقا لمحورين: المحور الأول يخص دراسة النشاطية المضادة للأكسدة و النشاطية ضد مكروبية للمستخلصات العضوية والمائية لنبتي *Plantago major L.* و *Carthamus caeruleus L.* أما المحور الثاني فتم فيه محاولة تحديد البنية الكيميائية للجزيئات الفلافونويدية التي أظهرت نشاطية ضد تأكسدية وضد مكروبية كبيرة. أظهرت نتائج التقدير الكمي الإجمالي لعديدات الفينول الكلية بطريقة Folin-Ciocalteu و الفلافونويدات بطريقة trichlorure d'aluminium أن مستخلصات المذيب العضوي Acétate d'éthyle لكل من جذور وأوراق نبات وأوراق نبات غنية بالمركبات الفينولية، حيث بلغت  $5.53 \pm 99$ ،  $4.46 \pm 316$  و  $2.42 \pm 114$  ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك/مغ مستخلص على التوالي. أما بالنسبة للفلافونويدات فكانت  $0.16 \pm 8.71$ ،  $0.83 \pm 13$  و  $0.06 \pm 5.48$  ميكروغرام مكافئ كارستين/مغ مستخلص على التوالي.

بينت النتائج المتحصل عليها بكميات جغرافية الطبقة الرقيقة أن بعض هذه المركبات لديها نشاطية ضد تأكسدية وضد ميكروبية عالية. من جهة أخرى أظهرت هذه المستخلصات نشاطية إزاحية عالية لجذر DPPH أكبر من نشاطية، حيث قدر التركيز الممارس للفعل التمخلي بـ  $0.05 \pm 18$  مكر وغرام/مل،  $0.26 \pm 9.6$  مكر وغرام/مل و  $0.27 \pm 12.87$  ميكروغرام/مل على التوالي.

كما تثبط هذه المستخلصات أكسدة  $\beta$ -carotène وحمض oléique بقيم 87.28%، 82.24% و 70.48%. على العكس من ذلك أبدى المستخلص المائي قدرة تمخلب كبيرة تجاه أيونات الحديد. في هذه الدراسة أيضا تم تقييم النشاطية ضد بكتيرية. أظهرت النتائج المتحصل عليها نشاطية مختلفة حسب المستخلصات وتراوحت أقطار التثبيط بين 8 ملم و 27 ملم، وكانت مستخلصات Acétate d'éthyle ذات نشاطية قاتلة تجاه كل من *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli*، *Bacillus cereus*، *Acinetobacter baumannii* المستخلصات المائية ذات نشاطية مثبطة تجاه *Staphylococcus aureus* و *Acinetobacter baumannii*. بالإضافة إلى ذلك تمت دراسة التأثير التآزري لمستخلصات النبتتين مع المضاد الحيوي gentamicine تراوحت أقطار التثبيط بين 13.5 ملم و 26 ملم للمستخلصين معا وبين 26 ملم و 40 ملم مع المضاد الحيوي. أظهر أيضا بعض المركبات النقية حسب المظهر بكميات جغرافية الطبقة الرقيقة قدرات ضد بكتيرية وضد تأكسدية واعدة.

**الكلمات المفاتيح:** *Plantago major L.*، *Carthamus caeruleus L.*، مضادات الأكسدة، مضادات البكتريا، مضادات فطرية، عديدات الفينول.

## Résumé :

Notre étude s'articule autour de deux axes dont le premier est consacré à l'étude des activités antioxydantes et antimicrobienne des extraits organiques et aqueux issus de *Carthamus caeruleus L.* et *Plantago major L.*; le second, concerne l'élucidation structurale des molécules flavoniques isolées des deux genres botaniques et ayant montré une activité significative. Les résultats de l'estimation quantitative des polyphénols totaux obtenus par la méthode de Folin-Ciocalteu et des flavonoïdes totaux par la méthode au trichlorure d'aluminium, ont montré que les fractions organiques acétate d'éthyle sont riches en ces composés par rapport aux extraits aqueux. Les taux en polyphénols correspondaient à  $99.94 \pm 3.53$ ,  $316.11 \pm 4.46$  et  $114.45 \pm 2.42$  mg EAG/g d'extrait pour les fractions Ac1, AcF et AcP; et ceux des flavonoïdes étaient de  $8.71 \pm 0.16$ ,  $28.13 \pm 0.38$  et  $5.48 \pm 0.06$   $\mu\text{g EQ/mg}$  d'extrait. Ces fractions ont la capacité de piéger le radical DPPH avec une  $\text{IC}_{50}$  de  $6.18 \pm 0.05$ ,  $9.6 \pm 0.26$  et  $12.87 \pm 0.27$   $\mu\text{g/ml}$  pour les fractions AcF, AqF et AcP, une activité supérieure à celle du standard de référence (BHT), et d'inhiber également l'oxydation couplée de l'acide oléique et du  $\beta$ -carotène avec une AAR de 87.28%, 82.24% et 70.48 % pour les fractions AcF, Ac1 et AcP. De plus, ormis tous les extraits testés, seuls les extraits aqueux ont une activité chélatrice du fer avec l' $\text{IC}_{50}$  de  $0.164 \pm 0.002$ ,  $0.173 \pm 0.003$  et  $1.02 \pm 0.02$  mg/ml pour les fractions Aq1, AqF et AqP. Par ailleurs, les tests antimicrobiens ont montré des effets variables des extraits testés vis-à-vis des souches bactériennes et les zones d'inhibition variaient de 8 à 27 mm ; et de 13.3 à 25 mm pour les souches fongiques (*Fusarium Var coeruleum*, *Fusarium oxysporum albidinis*, *Aschochyta rabiei* et *Candida albicans*). Les fractions acétate d'éthyle sont bactéricides vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* et *Bacillus cereus*. Par contre, les fractions aqueuses sont bactériostatiques vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Acinetobacter baumannii*. Des effets synergiques ont été aussi mis en évidence non seulement entre les extraits des deux plantes vis-à-vis des souches bactériennes testées (zones d'inhibition de 13.5 à 26 mm), mais également, avec un antibiotique standard : la gentamicine (Zones d'inhibition de 26 à 40 mm). L'évaluation du contenu phénolique de différents extraits des deux plantes étudiées par chromatographie sur couches minces a permis de montrer que les extraits acétate d'éthyle (Ac1) des racines et (AcF) feuilles de *Carthamus caeruleus L.*, et (AcP) des feuilles de *Plantago major L.* sont riches en composés phénoliques. Certaines molécules pures isolées des deux plantes présentent un potentiel antibactérien et antioxydant très significatif.

## **REMERCIEMENTS**

*A Monsieur le Professeur Harzallah Daoud*

*Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté d'être président de ce jury de thèse. Sensible à l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail, je vous prie de croire en mon respect*

*A Madame Sahli Farida et Monsieur Zerroug Mohamed Mihoub*

*Je tiens à vous adresser mes plus vifs remerciements pour avoir accepté de codiriger ce travail. Que ce travail soit le témoignage de mon estime pour la confiance, les encouragements que vous avez manifestés à mon égard tout au long des années de préparation de cette thèse.*

*A Messieurs les professeurs Houali Karim et Idoui Tayeb et Zellagui Amar*

*Je suis honorée que vous ayez accepté d'être juges de ma thèse. Vos compétences scientifiques seront d'une valeur inestimable pour enrichir ce travail. Je vous en remercie très chaleureusement.*

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements :*

*A toute l'équipe du Laboratoire de Biochimie Appliquée de l'université de Sétif, pour m'avoir accueilli à bras ouverts dans votre laboratoire lorsque je me suis trouvée en panne. J'exprime ici toute ma reconnaissance, en particulier à messieurs les professeurs Baghiani Abderrahmane, Arrar Lekhemissi et Khennouf Seddik pour la confiance placée en moi pour réaliser mes expériences.*

*A monsieur le professeur Touabti Abderrazek, médecin chef du Laboratoire Central au CHU de Sétif: votre simplicité, vos qualités humaines et d'homme de sciences ont permis l'aboutissement de ce travail. Grand merci !*

*A Monsieur le professeur Hamada Boudjemaa et son équipe de la Faculté des Hydrocarbures et de Chimie de l'Université de Boumerdes. Je vous remercie très chaleureusement pour votre aide, vos compétences scientifiques m'ont été précieuses.*

*Mes sincères remerciements à mes amies : Madame Khebbat Fatima et Madame Silini Hafsa pour leur soutien et leur aide.*

*Un grand merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail.*

# ***DEDICACES***

## **A la mémoire de :**

**mon père**

**mon inoubliable neveu Nassim**

## **En hommage :**

à ma mère, tu m'as tant donné, parfois un mot  
suffisait pour me donner du courage, de suivre  
ma voie, merci pour ta présence.

à mon époux Nacer, pour tes encouragements  
et ton aide, mon fils Zakaria, ma fille Insaf,  
merci d'avoir été patients en m'accompagnant  
tout au long de ces années.

à ma famille, grâce vous j'en suis là aujourd'hui,  
parce que vous avez toujours cru en moi et  
m'avez soutenue. Vous avez tous contribué à  
votre manière à cette réussite

## **Un grand Merci**

au chef de service et toute l'équipe du laboratoire de  
Microbiologie et de Biochimie du CHU de Sétif  
à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail

# Sommaire

<b>Résumé en arabe</b>	
<b>Résumé en français</b>	
<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Introduction</b> .....	1
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b>	
<b>I- Les polyphénols : Généralités</b> .....	4
I.1- Les flavonoïdes .....	4
I.1.1- Les flavonols .....	5
I.1.2- Les flavones .....	5
I.1.3- Les flavanones .....	5
I.1.4- Les isoflavones .....	6
I.1.5- Les flavanols .....	6
I.1.6- Les anthocyanes .....	6
I.2- Les acides phénoliques .....	8
I.3- Les stilbènes .....	8
I.4- Les lignages .....	9
<b>II- Biosynthèse des flavonoïdes</b> .....	9
<b>III- Caractéristiques physico-chimique des flavonoïdes</b> .....	11
III.1- Caractéristiques chromatographiques .....	11
III.2- Caractéristiques spectrophotométriques .....	12
III.2.1- Spectre en présence de soude (NaOH) .....	13
III.2.3- Spectre en présence d'AlCl <sub>3</sub> et AlCl <sub>3</sub> +HCl .....	13
III.2.2- Spectre en présence de NaOAc et NaOAc+ H <sub>3</sub> BO .....	13
<b>IV- Propriétés physiologiques des flavonoïdes</b> .....	15
IV.1- Rôle attracteur chez les plantes .....	15
IV.1- Rôle protecteur chez les plantes .....	15
<b>V- Activités biologiques des flavonoïdes</b> .....	16
V.1- Activité antioxydante .....	17
V.2- Activités toxique et pro-oxydante .....	18
V.3- Activité antimicrobienne .....	18
V.4- Activité anti-inflammatoire .....	19
V.5- Activité anti-ulcère .....	20
V.6- Effet sur le système cardiovasculaire .....	21
V.7- Activité anti-tumorale .....	22
<b>VI- Le stress oxydant</b> .....	22
VI.1- Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA) .....	22
VI.2- Action des ERO sur les biomolécules .....	24
VI.3- Système de défenses antioxydants .....	26

<b>VII- Maladies infectieuses</b> .....	26
VII.1- Les agents antibactériens et antifongiques .....	27
VII.2- Résistance bactérienne aux antibiotiques .....	28
VII.3- Mécanismes de résistances bactériennes .....	29
<b>VIII. Description et Classification des plantes</b> .....	30
VIII.1- <i>Carthamus caeruleus L.</i> .....	30
VIII.1.1- Classification phylogénique .....	30
VIII.1.2- Description de <i>Carthamus caeruleus L.</i> .....	30
VIII.1.3- Utilisation de <i>Carthamus caeruleus</i> en Pharmacopée traditionnelle ..	31
VIII.2- <i>Plantago major L.</i> .....	32
VIII.2.1- Classification phylogénique .....	32
VIII.2.2- Description de <i>Plantago major L.</i> .....	32
VIII.2.3- Utilisation de <i>Plantago major L.</i> en pharmacopée traditionnelle .....	33
<b>Chapitre II : Matériel et Méthodes</b>	
<b>I- Matériel végétal</b> .....	35
<b>II- Préparation des extraits</b> .....	35
II.1- Extraits de racines .....	35
II.2- Extraits de feuilles .....	38
<b>III- Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes</b> .....	40
III.1- Dosage des polyphénols totaux .....	40
III.2- Dosage des Flavonoïdes .....	41
<b>IV- Activité antioxydante</b> .....	42
IV.1- Activité anti-radicalaire au DPPH .....	42
IV.2- Test du blanchiment du $\beta$ -carotène .....	44
IV.3- Chélation du fer ferreux .....	44
<b>V- Tests microbiologiques</b> .....	45
V.1- Matériel biologique .....	45
V.1.1- Souches bactériennes .....	45
V.1.2- Souches fongiques .....	47
V.2- Evaluation de l'activité antibactérienne .....	47
V.3- Evaluation de l'activité antifongique .....	48
V.4- Détermination de la concentration minimale d'inhibition (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB) .....	49
V.4.1- Détermination de la CMI par la méthode de diffusion sur gélose .....	49
V.4.2- Détermination de la CMI et de la CMB par la méthode de micro-dilution .....	49
V.5- Synergie entre les extraits des deux plantes, et les extraits combinés à un antibiotique standard .....	50
<b>VI- Techniques de fractionnement et de purification des extraits</b> .....	51
VI.1- Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	51
VI.2- Chromatographie préparative sur colonne .....	52
VI.3- Etude des spectres UV-visible dans le méthanol et en présence de réactifs ...	52
<b>VII- Analyse statistique</b> .....	54

## Chapitre III : Résultats et discussion

<b>I- Rendement des extraits</b> .....	55
<b>II- Teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes</b> .....	55
II.1- Extraits de <i>Carthamus caeruleus L.</i> .....	55
II.2- Extraits de <i>Plantago major L.</i> .....	57
<b>III- Activités biologiques</b> .....	58
III.1- Activité antioxydante .....	58
III.1.1- Activité anti-radicalaire au DPPH .....	58
III.1.1.1- Extraits des racines et feuilles de <i>Carthamus caeruleus L.</i> .....	58
III.1.1.2- Extraits des feuilles de <i>Plantago major L.</i> .....	61
III.1.2- Test de blanchiment du $\beta$ -carotène. Activité antioxydante relative .....	63
III.1.2.1- Extraits de racines et feuilles de <i>Carthamus caeruleus L.</i> .....	63
III.1.2.2- Extraits de feuilles de <i>Plantago major L.</i> .....	64
III.1.3- Chélation du fer ferreux .....	65
III.2- Activité antimicrobienne .....	67
III.2.1- Activité antibactérienne des extraits des racines et feuilles <i>Carthamus caeruleus L.</i> .....	67
III.2.2- Activité antibactérienne des extraits de feuilles de <i>Plantago major L.</i> .....	69
III.2.3- Activité antifongique des extraits de <i>Carthamus caeruleus L.</i> et <i>Plantago major L.</i> .....	71
III.2.4- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB) .....	72
III.2.5- Synergie entre les extraits de <i>Carthamus caeruleus L.</i> et <i>Plantago major</i> .....	76
III.2.6- Synergie entre les extraits des deux plantes étudiées et un antibiotique standard .....	78
<b>IV- Fragmentation et séparation des extraits de <i>Carthamus caeruleus L.</i> et <i>Plantago major L.</i></b> .....	80
IV.1- Chromatographie sur couche mince .....	80
IV.2- Résultat de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction acétate d'éthyle Ac des racines de <i>carthamus caeruleus L.</i> .....	81
IV.3- Résultat de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction Acétate d'éthyle AcF des feuilles de <i>Carthamus caeruleus L.</i> .....	82
IV.4- Résultat de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction acétate d'éthyle AcP de <i>Plantago major L.</i> .....	83
IV.5- Corrélation entre l'activité antibactérienne et les fractions isolées .....	84
IV.6- Identification partielle des composés purifiés .....	85
<b>Discussion générale</b> .....	86
<b>Conclusion</b> .....	88
<b>Perspectives</b> .....	89
<b>Références Bibliographiques</b> .....	92
<b>Annexe</b>	

# Liste des abréviations et symboles

**AcOEt**: acétate d'éthyle

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**AlCl<sub>3</sub>** : chlorure d'aluminium

**Al<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>** : alumine

**SiO<sub>2</sub>** : Silice

**CCM** : chromatographie sur couche mince

**CHI** : Chalcone Isomérase

**CHS** : Chalcone synthase

**CMI** : concentration minimale inhibitrice

**CMB** : concentration minimale bactéricide

**DO** : densité optique

**DPPH**: 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

**EDTA**: ethylene diamine tetra acetic Acid

**EP** : éther de pétrole

**ERA** : espèces réactives de l'oxygène

**ERO** : espèces réactives de l'azote

**Fe<sup>2+</sup>** : fer ferreux

**FeCl<sub>2</sub>** : chlorure de fer

**FHT** : Flavanone-3-Hydroxylase

**FLS** : Flavonol Synthase

**FS** : Flavone Synthase

**HCl** : acide chlorhydrique

**H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>** : acide borique

**IC<sub>50</sub>** : concentration inhibitrice de 50% de la population cellulaire

**MeOH** : méthanol

**Mg** : milligramme

**µg** : microgramme

**MH** : Mueller Hinton agar ou bouillon

**NaOAc** : acétate de sodium

**NaOH** : soude

**NCCLS** : National Committee for Clinical Laboratory

**Nm** : nanomètre

**UFC** : unité formant colonie

**UV** : ultraviolet

**Rf** : rétention frontale

# Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Structure de base des flavonoïdes .....	5
<b>Figure 2 :</b> Structure des acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques .....	8
<b>Figure 3 :</b> Structure des stilbènes .....	8
<b>Figure 4 :</b> Principales étapes de biosynthèse des différentes classes de flavonoïde .....	10
<b>Figure 5 :</b> Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique .....	12
<b>Figure 6 :</b> Les processus de formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA) .....	24
<b>Figure 7 :</b> Photo de <i>Carthamus caeruleus L</i> .....	31
<b>Figure 8 :</b> Photo de <i>Plantago major L</i> .....	33
<b>Figure 9 :</b> Schéma du protocole d'extraction des racines de <i>Carthamus caeruleus L</i> .....	37
<b>Figure 10 :</b> Courbe d'étalonnage de l'acide gallique .....	41
<b>Figure 11 :</b> Courbe d'étalonnage de la quercétine .....	42
<b>Figure 12 :</b> Activité anti-radicalaire au DPPH des extraits de racines de <i>Carthamus caeruleus L</i> .....	59
<b>Figure 13 :</b> Activité anti-radicalaire au DPPH des extraits de feuilles de <i>Carthamus caeruleus L</i> .....	59
<b>Figure 14 :</b> IC <sub>50</sub> en µg/ml des extraits des racines et feuilles de <i>Carthamus caeruleus L</i> et des standards (BHA et BHT) .....	60
<b>Figure 15 :</b> Activité anti-radicalaire au DPPH des extraits de feuilles de <i>Plantago major L</i> .....	62
<b>Figure 16 :</b> IC <sub>50</sub> en µg/ml des extraits des feuilles de <i>Plantago major L</i> et des standards (BHA et BHT) .....	62
<b>Figure 17 :</b> Test de blanchiment du β-carotène des extraits de racines de <i>Carthamus caeruleus L</i> .....	64
<b>Figure 18 :</b> Test de blanchiment du β-carotène des extraits de feuilles de <i>Carthamus caeruleus L</i> .....	64
<b>Figure 19 :</b> Activité antioxydante relative (AAR) des extraits de racines et feuilles de <i>carthamus L</i> .....	64
<b>Figure 20 :</b> Test de blanchiment du b-carotène des extraits de feuilles de <i>Plantago major L</i> .....	65
<b>Figure 21 :</b> Activité antioxydante relative (AAR) des extraits de feuilles de <i>Plantago</i>	

<i>major L.</i> .....	65
<b>Figure 22</b> : Activité chélatrice du fer par les extraits de <i>Carthamus caeruleus L.</i> et de <i>Plantago major L.</i> .....	66
<b>Figure 27</b> : Exemple de CMB de l'extrait acétate d'éthyle (AcP) de <i>Plantago major L.</i> testé sur <i>Staphylococcus aureus</i> .....	72
<b>Figure 30</b> : Chromatogrammes des différents extraits de <i>Carthamus caeruleus L.</i> et <i>Plantago major L.</i> dans le système Toluène/Acétone/Acide formique (6 :1 :1) ....	81
<b>Figure 31</b> : Profil Chromatographique des fractions de l'extrait acétate d'éthyle (Ac1) des racines de <i>Carthamus caeruleus L.</i> .....	82
<b>Figure 32</b> : Profil Chromatographique des fractions de l'extrait acétate d'éthyle (AcF) des feuilles de <i>Carthamus caeruleus L.</i> .....	83
<b>Figure 33</b> : Profil chromatographique des fractions de l'extrait acétate d'éthyle (AcP) des feuilles de <i>Plantago major L.</i> .....	83

# Liste des Tableaux

<b>Tableau I :</b> Différentes classes de flavonoïdes .....	7
<b>Tableau II :</b> Fluorescence des structures flavoniques sous lumière ultra-violette .....	11
<b>Tableau III :</b> Maximum d'absorption UV des flavonoïdes. Action des réactifs sur l'allure du spectre UV-visible .....	14
<b>Tableau IV :</b> Classification de <i>Carthamus caeruleus L.</i> .....	30
<b>Tableau V :</b> Classification de <i>Plantago major L.</i> .....	32
<b>Tableau VI :</b> Quelques caractéristiques des souches bactériennes et fongiques testés .....	46
<b>Tableau VII :</b> Teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes des extraits de <i>Carthamus caeruleus L.</i> .....	56
<b>Tableau VIII :</b> Teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes des extraits de <i>Plantago major L.</i> .....	58
<b>Tableau IX :</b> Diamètre (mm) des zones d'inhibition des différents extraits des racines et feuilles de <i>Carthamus caeruleus L.</i> .....	68
<b>Tableau X :</b> Diamètre (mm) des zones d'inhibition des différents extraits de feuilles de <i>Plantago major L.</i> .....	69
<b>Tableau XI :</b> Activité antifongique (zones d'inhibition en mm) des différents extraits des racines de <i>Carthamus caeruleus L.</i> .....	71
<b>Tableau XII :</b> CMI et CMB des différents extraits de <i>Carthamus caeruleus L.</i> et <i>Plantago major L.</i> .....	75
<b>Tableau XIII :</b> Diamètre (mm) des zones d'inhibition des différentes combinaisons des extraits de <i>Carthamus caeruleus L.</i> et <i>Plantago major L.</i> .....	77
<b>Tableau XIV :</b> Diamètre (mm) des zones d'inhibition des différentes combinaisons entre les extraits des deux plantes et un antibiotique standard (gentamicine) .....	79
<b>Tableau XV :</b> Diamètre (mm) des zones d'inhibition des Diamètre (mm) des zones d'inhibition de quelques fractions des extraits des deux plantes .....	84
<b>Tableau XVI.</b> Caractéristiques chromatographiques et spectrophotométriques des composés purs .....	85

## Introduction

L'usage des remèdes à base de plantes utilisés au sein des pharmacopées traditionnelles pour le traitement des maladies de l'homme et de l'animal est très ancien. Il a évolué avec l'histoire de l'humanité. La grande majorité des populations rurales se soigne exclusivement avec des plantes médicinales en dépit de la toxicité des produits chimiques, ceci est dû au coût élevé des médicaments prescrits par la médecine moderne et à l'éloignement et/ou l'insuffisance des centres de santé. De nos jours, les vertus thérapeutiques des plantes présentent un regain d'intérêt grâce à l'amélioration des techniques extractives et aux progrès des méthodes d'analyses structurales pour la découverte de nouveaux principes actifs. On estime que deux tiers des médicaments actuels ont une origine naturelle obtenus par hémisynthèse ou par modification d'un produit naturel (Newman *et al.*, 2007).

Les plantes constituent une source immense de molécules chimiques complexes (métabolites secondaires), largement exploités dans les industries cosmétologiques, agroalimentaires et pharmaceutiques. Parmi ces métabolites, on distingue les terpénoïdes, les alcaloïdes et les polyphénols. Ces derniers et principalement les flavonoïdes sont essentiellement connus pour leurs nombreuses activités biologiques, parmi lesquelles : leur actions antioxydantes, anti-inflammatoires, anticancéreuses et antimicrobienne.

Ils participent à combattre les radicaux libres issues de l'oxygène et de l'azote. Les radicaux libres étant naturellement produits dans la cellule durant la respiration et le métabolisme, leur accumulation excessive peut endommager la cellule par altération de ses biomolécules. Ces dommages souvent irréversibles sont à l'origine de nombreuses maladies dégénératives.

L'oxydation, en particulier des lipides induit non seulement une diminution de leur valeur nutritive, mais aussi des effets reconnus nuisibles pour le consommateur et qui peuvent être associés à des risques de cancer chez l'homme. Aussi, est-il nécessaire un complément en

antioxydants naturels qui représentent une source de nouvelles molécules pour la prévention et le traitement des maladies inflammatoires, neurologiques, cardiovasculaires et du cancer. Ceci pour éviter les antioxydants synthétiques tels que l'hydroxyanisole butylé (BHA) et l'hydroxytoluène butylé (BHT) entre autres, qui se sont avérés très nocifs tant au niveau de leur métabolisme que de leur accumulation dans les tissus de l'organisme humain (Linderschmidt *et al.*, 1986). L'objectif de nombreux industriels et scientifiques est la recherche de nouveaux antioxydants naturels afin de pallier à ce problème de toxicité par produits synthétiques.

Par ailleurs, actuellement, la maîtrise des infections bactériennes et fongiques devient complexe à cause d'une utilisation anarchique, inadéquate et abusive des antibiotiques en santé humaine et animale. L'émergence de bactéries et de champignons résistants à de nombreux antibiotiques conventionnels pose un grave problème de santé publique. Ces agents infectieux multirésistants sont néfastes surtout chez les sujets vulnérables tels que les enfants, les vieillards et les personnes immunodéprimées. La problématique de la résistance aux antibiotiques interpelle les communautés scientifiques car il est important de trouver de nouveaux agents antimicrobiens naturels en se référant aux plantes utilisées dans le traitement de maladies infectieuses en médecine traditionnelle.

Dans ce contexte, les objectifs de notre thèse sont :

✓ une évaluation de propriétés biologiques, antioxydantes et antimicrobiennes, d'extraits flavoniques de plantes choisies sur la base de leur utilisation en pharmacopée traditionnelle dans la région de Sétif en Algérie. Le choix a porté sur *Carthamus caeruleus L.* et *Plantago major L.*

✓ Le second volet de notre étude concerne la caractérisation des composés flavoniques

isolés à partir des extraits des deux plantes en se basant sur les techniques d'analyses chromatographiques et spectrophotométriques.

Notre thèse est structurée de façon classique en un chapitre portant sur une synthèse bibliographique de l'ensemble de notre thématique. La seconde partie décrit les démarches méthodologiques en abordant les analyses quantitatives et qualitatives des extraits de nos plantes, et l'évaluation de leurs activités biologiques.

Dans la dernière partie, sont rapportés et discutés nos résultats. Les perspectives de travail concluent notre manuscrit.

# Chapitre I : Synthèse bibliographique

## I- Les polyphénols : Généralités

Les polyphénols constituent un groupe important de substances naturelles largement répandues dans le règne végétal. Les scientifiques en ont identifié plus de 8000, allant de molécules simples à des composés hautement complexes (Urquiaga, 2000). Leur accumulation dans les plantes, varie quantitativement et qualitativement non seulement dans les différentes parties de la plante, mais aussi d'une espèce végétale à l'autre. On peut distinguer les différentes classes de polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure du squelette de base (Harborne, 2000):

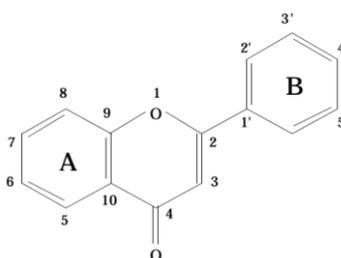
- les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques),
- les flavonoïdes qui représentent la classe la plus abondante et la plus étudiée
- les tanins et lignines
- et plus rares, les coumarines et les stilbènes.

Les flavonoïdes, les acides phénoliques, les stilbènes, les tanins et les lignanes sont majoritairement présents dans les feuilles, les fleurs et l'écorce de bois. Ces molécules jouent un rôle majeur au niveau de la croissance des végétaux et dans la lutte contre des agents pathogènes et des infections.

### I.1- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le principal groupe de polyphénols, avec plus de 9000 composés différents (Hernández, 2009) et distribués de manière générale, dans toutes les plantes vasculaires. Leur squelette chimique commun possède 15 atomes de carbones, constitué de deux noyaux benzéniques A et B reliés par un cycle pyranique central C (figure 1). Ils diffèrent les uns des autres par la position des substitutions sur les noyaux A et

B, et la nature de C. Les flavonoïdes sont répartis en différentes catégories dont les plus importantes sont les flavonols, les flavones, les flavanols, les isoflavones, les flavanones, et les anthocyanes (Tableau I) (Bruneton, 2009). Ces molécules se rencontrent à la fois sous forme libre, mais sont très souvent liés avec des sucres, on parle alors d'hétérosides constitués d'une partie phénolique aglycone ou génine associée à un sucre. Ils sont localisés dans divers organe : fleurs, fruits, feuilles, tiges et racine. Les aglycones sont plutôt présents sous forme de cire dans les feuilles, les écorces et les bourgeons (Iwashina, 2000). La couleur des fruits, des fleurs et des feuilles est une caractéristiques des flavonoïdes (El Gharras, 2009).



**Figure 1.** Structure de base des flavonoïdes

### **I. 1.1- Les flavonols**

Les flavonols sont les constituants flavoniques les plus abondants des aliments. Les composés les plus représentatifs de cette famille sont le kaempferol et la quercétine. Ces dernières possèdent un très fort pouvoir antioxydant en raison de leur structure chimique favorable au piégeage des radicaux libres (Liu *et al.*, 2012).

### **I.1.2- Les flavones**

Les flavones sont abondantes chez les plantes supérieures sous les deux formes aglycones ou glycosylées. Certaines sont responsables de l'aspect blanc ou ivoire de certaines fleurs, comme les roses et les œillets. Ils ont des activités physiologiques remarquables, notamment des propriétés antimicrobiennes et antivirales (Stafford 1990).

### **I.1.3- Les flavanones**

Les Flavanones ont une structure similaire à celle des flavones mais ne possèdent pas d'insaturation au niveau de l'hétérocycle. Les flavanones sont fréquemment rencontrés chez les Myrtacées (Wollenweber *et al.*, 2000). Dans l'alimentation, les flavanones se retrouvent dans les tomates, certaines plantes comme la menthe, et sont présents en grandes quantités dans les agrumes. Les principaux aglycones sont la naringénine dans le pamplemousse, l'hespéridine dans l'orange et l'ériodictyol dans le citron.

#### **I.1.4- Les isoflavones**

Les produits dérivés du soja sont la principale source d'isoflavones dans l'alimentation, glycosylées ou non. On les rencontre aussi dans les légumineuses (Iwashina, 2000).

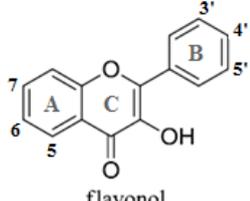
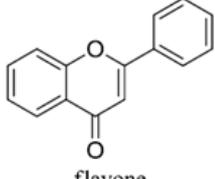
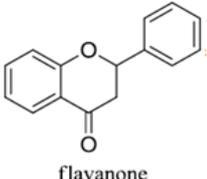
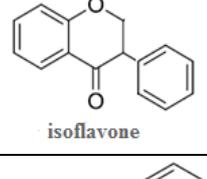
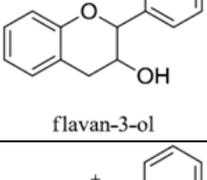
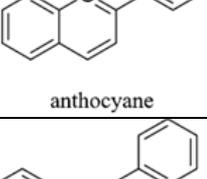
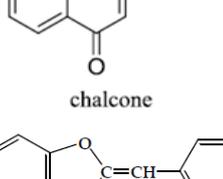
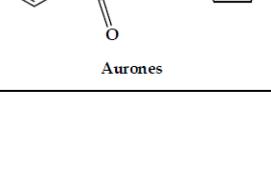
#### **I.1.5- Les flavanols**

Les flavanols existent sous forme de monomères : l'unité la plus simple est la catéchine, ou polymérique appelés proanthocyanidines. La catéchine est présente dans de nombreux fruits comme la pomme, le chocolat et le thé restent les principales sources de ce composé.

#### **I.1.6- Les anthocyanes**

Les anthocyanes sont des pigments naturels qui donnent les couleurs à de nombreuses plantes. Leur aptitude à se solubiliser facilement dans les milieux aqueux offre des possibilités très larges dans le domaine industriel. Ils sont responsables de la coloration (orange, rose, rouge, violet et bleue) de certaines fleurs (tulipe, rose, orchidée) et fruits (pomme, baies, raisin). Leurs génines (anthocyanidols) sont des dérivés du cation 2-phénylbenzopyrylium (cation flavylum). Une propriété importante de ces composés réside dans leur aptitude antioxydante, et de nombreuses études sur leurs activités biologiques en témoignent (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009).

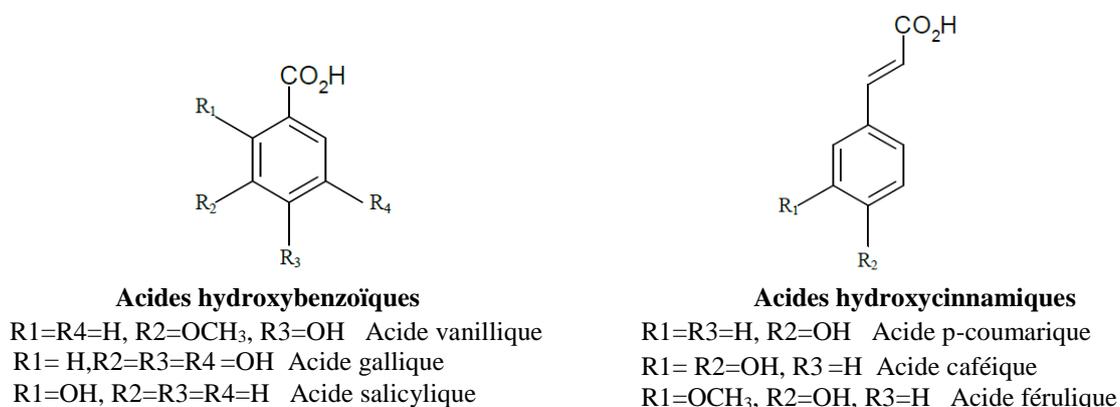
**Tableau I.** Différentes classes de flavonoïdes d'après Bruneton (2009)

Structure des différentes classes de flavonoïdes	Exemples	Substitutions					
		5	6	7	3'	4'	5'
 <p>flavonol</p>	Kaempférol Quercétine Myricétine	OH	H	OH	H	OH	H
 <p>flavone</p>	Apigénine Chrysin Lutéoline	OH	H	OH	H	OH	H
 <p>flavanone</p>	Hespéridine Naringénine	OH	H	OH	OH	OMe	H
 <p>isoflavone</p>	Daidézéine Génistéine	OH	H	OH	OH	OH	H
 <p>flavan-3-ol</p>	Catéchine Gallocatéchine	H	H	OH	H	OH	H
 <p>anthocyane</p>	Pélargonidine Cyanidine Delphinidine	OH	H	OH	H	OH	H
 <p>chalcone</p>							
 <p>Aurones</p>							

## 1.2- Acides phénoliques

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts que sont les acides hydroxybenzoïques (C6-C1) et les acides hydroxycinnamiques (C6-C3) :

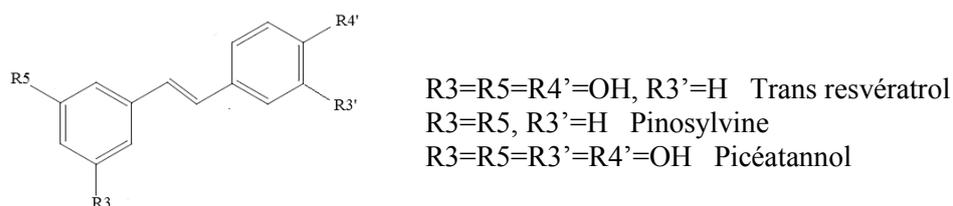
- les acides hydroxybenzoïques, dont les plus répandus sont l'acide cinnamique, l'acide salicylique, l'acide gallique et l'acide vanillique (figure 2), base de médicaments connus.
- les acides hydroxycinnamiques, dont les plus abondants sont l'acide  $\rho$ -coumarique, l'acide caféique et l'acide férulique (figure 2) (Macheix *et al.*, 2005).



**Figure 2.** Structure des acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques (Macheix *et al.*, 2005)

## 1.3- Les stilbènes

Ces composés sont en très petite quantité dans notre alimentation. Le plus connu d'entre eux est le resvératrol (figure 3), qui a été largement étudié pour ses propriétés anticancéreuses mises en évidence lors de l'étude des activités biologiques de plantes médicinales (Kundu, 2008).



**Figure 3.** Structure des stilbènes (Parage, 2013)

#### **I.4- Les lignines**

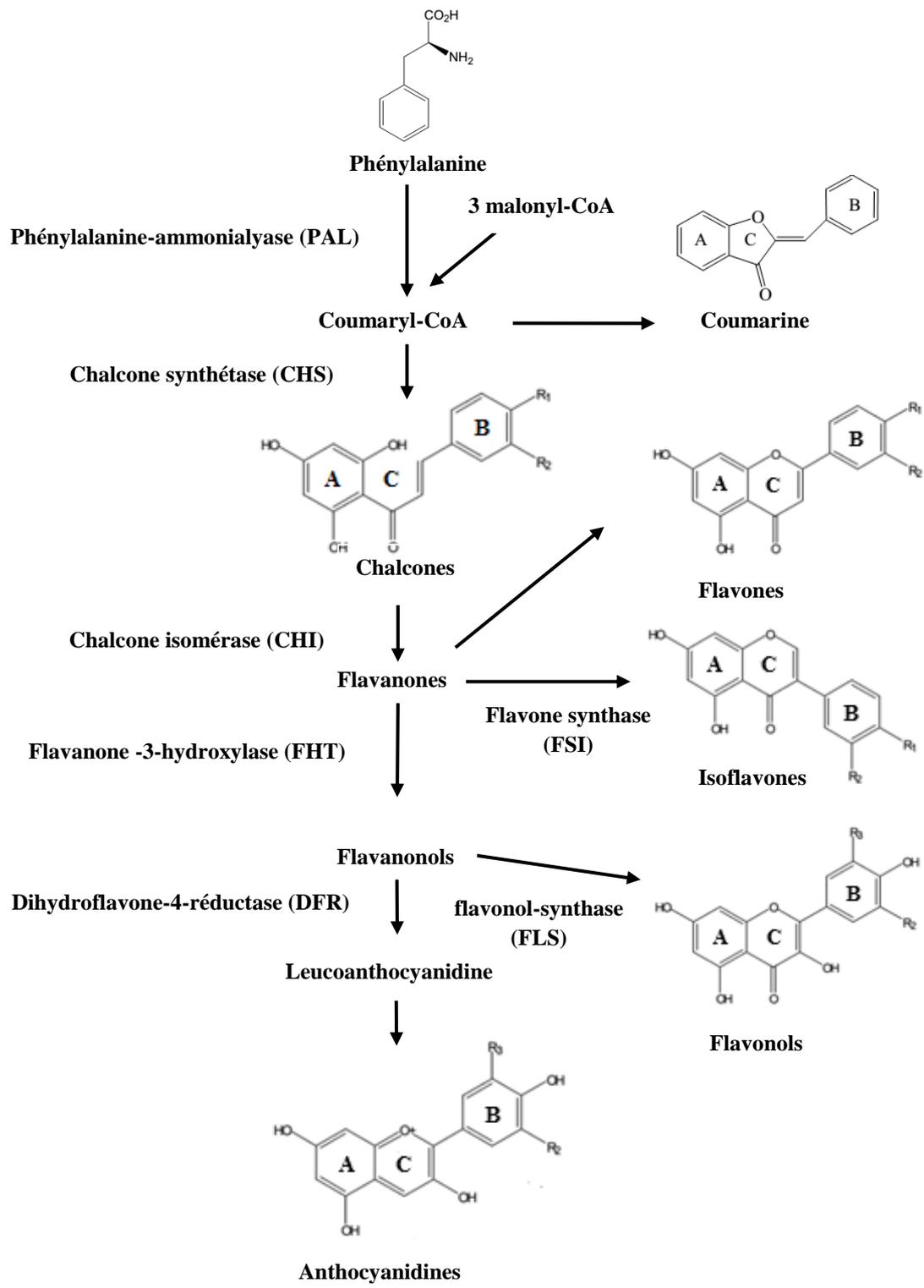
Les lignines sont des polymères principaux composants du bois avec la cellulose et l'hémicellulose, leurs principales fonctions sont d'apporter de la rigidité, une imperméabilité à l'eau et une grande résistance à la décomposition (Martone *et al.*, 2009). Ils sont constitués de deux unités de phénylpropane et entrent dans la composition de certaines graines, céréales, fruits et autres légumes, fortement plus concentrés dans les graines de lins (El Gharras, 2009).

## **II- Biosynthèse des flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont largement distribués chez les angiospermes dont le métabolisme phénolique aboutit à un grand nombre d'édifices moléculaire caractérisant ainsi une diversité phénotypique. Malgré leur variabilité structurale, ces molécules dérivent toutes de la même voie de biosynthèse dont les étapes sont les mieux connues tant du point de vue biochimique que moléculaire. La structure d'un flavonoïde s'organise toujours autour d'un squelette 1,3-diphénylpropane C6-C3-C6 (Figure 2), décrit par une nomenclature spécifique.

La biosynthèse des flavonoïdes fait intervenir des voies communes : la voie shikimique grâce à la phénylalanine ammonialyase (PAL) (Vogt, 2009), et la voie acétate grâce à la chalcone synthase (CHS) (Dixon *et al.*, 1999). La PAL permet la synthèse d'acide p-coumarique et d'acide cinnamique. L'élaboration des composés phénoliques réside dans la condensation de trois unités de malonyl-CoA avec l'acide para-coumarique, conduisant aux deux noyaux aromatiques A et B reliés par l'hétérocycle C.

Ces condensations sont catalysées par la chalcone synthase (CHS), enzyme clé dans la formation des flavonoïdes qui conduit à un précurseur, une chalcone (Figure 4). La chalcone néoformée donne une flavanone (la naringénine), une transformation catalysée par une chalcone-isomérase (CHI) (Van Tunen AJ, 1990 ; Fowler *et al.*, 2009).



**Figure 4.** Principales étapes de biosynthèse des différentes classes des flavonoïdes

La naringénine est au centre de la synthèse de différentes classes de flavonoïdes par action enzymatique : la flavone-synthétases (FSI) introduit une double liaison en 2,3 pour donner une flavone ; la flavanone-3-hydroxylase (FHT) catalyse l'hydroxylation en position 3 d'une flavanone pour donner un dihydroflavonol qui est transformé en flavonol par la flavonol-synthase (FLS). Ces molécules peuvent subir deux types de substitutions : les O-substitution et les C-substitutions qui sont soit de nature hydroxylique, méthoxylique ou osidique.

### III- Caractéristiques physico-chimiques des flavonoïdes

#### III.1- Caractéristiques chromatographiques

Des indications significatives sur la structure chimiques des flavonoïdes peuvent être fournies par les valeurs des Rf dans un système de solvant donné. La couleur da la fluorescence sous lumière ultra- violette peut également orienter quant à la structure de la famille flavonique (tableau II).

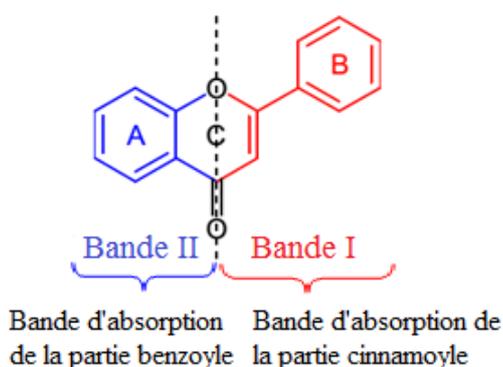
**Tableau II.** Fluorescence des structures flavoniques sous lumière UV  
(Markham, 1982)

<b>Couleur des spots</b>	<b>Structures flavoniques</b>
Noir- violette	Flavones -5, 6,7 Flavonol substitué en 3
Bleu	Flavone ou flavonol sans OH en 5 Flavanone avec OH en 3 ou flavanol Flavonol avec 3-OH substitué ou sans 5- OH
Jaune ou jaune terne	Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH
Orange	Isoflavones
Jaune verte	Aurones
Verte	Chalcones
Bleu verte	Flavanone sans 5-OH

### III.2- Caractéristiques spectrophotométriques

Les végétaux flavonoïdes pigments chromophores capables d'absorber sélectivement une partie de la lumière. Les fonctions chimiques responsables de cette absorption sont constituées de liaisons riches en électrons délocalisés ou de la conjugaison de celles-ci. L'étude de ces propriétés chromatiques se fait par le biais de la spectrophotométrie UV-visible. Cette méthode physique simple et rapide très utilisée dans la détermination du squelette flavonique, ainsi que la position des substituants. L'identification des flavonoïdes grâce aux spectres UV dans le méthanol et en présence de réactifs s'appuie sur les données de la littérature décrites par Mabry *et al.* (1970), Markham (1982) et Voirin (1983). En effet, le spectre d'absorption d'une structure flavonique présente deux bandes d'absorptions essentielles (figure 5) :

- La bande I située à entre 300 et 400 caractérise la forme cinnamoyle de la molécule.
- La bande II située à 240-285 nm est attribuée à sa forme benzoyle.



**Figure 5.** Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique

L'augmentation du nombre d'hydroxyle sur le noyau B se traduit par un effet bathochrome de la bande I ; il en est de même pour la bande I en relation avec le noyau A. De plus, la bande II apparaît sous forme d'un pic unique ou un pic accompagné d'un épaulement, selon que le noyau B est hydroxylé en position 3' ou dihydroxylé en position 3' et 4'. L'emploi de réactifs

tels que la soude, l'acétate de sodium, l'acide borique, le chlorure d'aluminium et l'acide chlorhydrique ; permet de localiser les groupements hydroxyles libres ou substitués sur une molécule flavonique (tableau III).

### **III.2.1- Spectre en présence de soude (NaOH)**

La soude est une base forte qui permet de localiser les hydroxyles libres en position 7 et 4' en provoquant leur ionisation, ce qui provoque un déplacement bathochrome de la bande I et II. Le déplacement de la bande I accompagné de la stabilité de la densité optique, confirme la présence d'un OH libre en position 4'. L'apparition d'une troisième bande entre les bandes I et II, confirme la présence d'un OH libre en position 7 (Bacon *et al.*, 1976).

### **III.2.2- Spectre en présence d'AlCl<sub>3</sub> et AlCl<sub>3</sub>+HCl**

La présence du chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) dans la solution méthanolique mène à la formation de complexes entre les hydroxyles ortho du flavonoïde d'une part et les hydroxyles des positions 3 et 5 et la fonction carbonyle d'autre part. La formation de ces complexes se traduit par un effet bathochrome de la bande I par rapport au spectre pris dans le MeOH. Les complexes formés entre AlCl<sub>3</sub> et les groupes ortho di-hydroxyles des noyaux aromatiques A et B sont instables et se décomposent en présence de HCl, par contre, ceux formés entre AlCl<sub>3</sub> et les hydroxyles 5-OH ou 3-OH et la fonction carbonyle sont stables. Ces effets se manifestent par un déplacement hypsochrome de la bande I sur le spectre UV en présence d'AlCl<sub>3</sub> + HCl par rapport au spectre après addition d'AlCl<sub>3</sub> et un déplacement bathochrome de la bande I du spectre en présence d'AlCl<sub>3</sub> moins important par rapport au spectre dans le MeOH en cas d'oxygénation de la position (tableau III).

### **III.2.3- Spectre en présence de NaOAc et NaOAc+ H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>**

L'acétate de sodium (NaOAc) est un sel très basique qui ionise les hydroxyles en position 3',4' et 7 (tableau III). Un effet bathochrome de 5 à 20nm confirme la présence d'un OH libre en position 7. En présence d'acétate de sodium, l'acide borique chélate les ortho dihydroxyle sur le cycle B (3',4') ou sur le cycle A (6,7 ou 7,8), et provoque un déplacement bathochrome de la bande I par rapport au spectre méthanolique.

**Tableau III.** Maximum d'absorption UV des flavonoïdes.

Action des réactifs sur l'allure du spectre UV-visible

Spectre UV	Bande I	Bande II	Types de flavonoïdes	Références
MeOH neutre	320-350	250-270	Flavones	Markham, 1982
	352-385	250-280	Flavonols	
	300-330	245-275	Flavanones	
	300-330	245-275	Isoflavones	
	348-390	230-270	Chalcones	
	380-430	230-270	Aurones	
Spectres UV en présence de réactifs	Bande II	Bande I	Substitutions	Références
NaOH/MeOH		+40 à 60 nm +50 à 60 nm	OH en 4' OH en 3 et 4'OR	Markham, 1982
		Bande III entre les bandes I et II	OH en 7	Bacon, 1976
NaOAc/MeOH	+ 5 à 20 nm		OH en 7	Markham, 1982
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> /MeOH		+12 à 36 nm +5 à 10 nm	Ortho di-OH 3',4' 6,7 ou 7,8 di OH	Markham, 1982
AlCl <sub>3</sub> /MeOH		+60 nm +35 à 55 nm	OH en 3 OH en 5	Mabry, 1970
AlCl <sub>3</sub> +HCl/MeOH		-30 à -40 -20 à -25	Ortho di OH sur le noyau B Ortho di OH sur le noyau A (en plus ortho di OH sur le noyau B)	Jurd, 1956
		+35 à 55 +17 à 20 +50 à 60	5-OH 5-OH 3-OH ou 3-OH et 5- OH	Mabry, 1970

## **IV- Propriétés physiologiques des flavonoïdes**

Les flavonoïdes comptent parmi les plus représentatifs des substances élaborées par les plantes à travers leurs métabolismes secondaires, ces substances possèdent des propriétés colorantes, aromatique, médicinales et cosmétologiques et confèrent à la plante des avantages adaptatifs. De nombreux principes actifs sont bénéfiques à l'homme et à l'animal.

### **IV.1- Rôle attracteur chez les plantes**

Les flavonoïdes sont à l'origine des propriétés chromatiques des différents pigments qui sont accumulés dans la plupart des organes des végétaux. Les pigments responsables des couleurs vives et variées des fleurs, ont non seulement un effet esthétique, mais sont aussi responsables de l'attraction des pollinisateurs (oiseaux et insectes). Un tel constat a été mis en évidence par Harborne *et al.* (1978), confirmant le rôle des anthocyanes dans le processus de pollinisation. D'autres auteurs soulignent l'importance des flavonoïdes dans la fertilité des plantes, il sont indispensables dans le développement des gamétophytes mâles (Peggy E Pollak *et al.*, 1992). Des mutations affectant l'enzyme clé chalcone synthétase qui catalyse la biosynthèse des composés phénoliques entraîne l'absence de pigments dans les anthères et une stérilité mâle.

### **IV.2- Rôle protecteur chez les plantes**

Les flavonoïdes jouent un rôle important dans la défense des plantes contre les agressions parasitaires ou abiotiques. Les plantes étant immobiles, elles ont dû mettre en place un système de résistance pour combattre les effets de l'environnement comme le gel et la sécheresse. Les flavonoïdes pourraient également permettre aux plantes de survivre sur les sols riches en métaux toxiques comme l'aluminium (Morel, 2011). Les flavonoïdes de défense peuvent être divisés en deux groupes : ceux préformés, et ceux dont la synthèse va

être induite par un phénomène physique, une infection ou un stress. Ils peuvent être présents de manière constitutive, mais leur synthèse va être augmentée par un facteur déclenchant, dans ce cas on parle de phytoalexines (Figen Mert-Türk, 2002 ; Jeandet *et al.*, 2014).

Vanetten *et al.* (1994) définissent les phytoalexines comme les composés synthétisés en réponse à une attaque et les phytoanticipines comme les composés présents avant toute attaque. Les flavonoïdes préformés sont des composés synthétisés durant le développement normal de la plante. Ils sont souvent accumulés à des endroits stratégiques de la plante pour sa défense. Ce qui explique que certains de ces composés possèdent un potentiel thérapeutique contre les microorganismes (bactéries, virus, champignons), et les insectes. Les flavonoïdes pourraient entraîner des changements dans la différenciation tissulaire et promouvoir la formation de thylle et de cal, empêchant ainsi l'agression par des agents invasifs.

En raison de leur structure, les flavonoïdes présentent une zone d'absorption dans l'ultraviolet et leur synthèse est fortement stimulée chez certaines espèces par la lumière ultraviolette (Schmelzer *et al.*, 1988 ; Shirley, 1996). Ces composés s'accumulent en grandes quantité dans les tissus périphériques, ils font écran aux UV qui endommagent l'ADN (Stapleton, 1992) et protègent ainsi les tissus internes des tiges et des feuilles.

#### **V- Activités biologiques des flavonoïdes**

Comme cela a été démontré par de nombreux travaux, les flavonoïdes sont des molécules de défense contre les organismes pathogènes, leurs propriétés ont été exploitées pour leur un potentiel en thérapeutique contre les microorganismes. On leur reconnaît des activités antivirales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques et anticancéreuses. Ils ont également des actions positives sur le diabète, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson.

## V.1- Activité antioxydante

Les flavonoïdes sont considérés comme des agents antioxydants très puissants en raison de leur structure, se rapportant en particulier à la position des groupements hydroxyles sur les noyaux aromatiques, et la capacité des composés aromatiques à supporter une délocalisation électronique. Ces dernières années, un intérêt particulier a été accordée aux propriétés antioxydantes des flavonoïdes (Liyana-Pathirana *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2010 ; Soo Cheon *et al.*, 2013), qui seraient attribuées à:

- leur capacité à piéger directement les radicaux libres.
- leur pouvoir de chélater les ions métalliques impliqués dans la production des espèces oxygénées réactives (EOR).
- leur capacité d'inhiber quelques enzymes en particulier les oxydases et d'inhiber les enzymes pro-oxydantes.

Les flavonoïdes sont capables d'inhiber la peroxydation lipidique causée par les ERO dans la bicouche phospholipidique. Du fait de leur caractère hydrophile, les flavonoïdes peuvent interférer avec les réactions en chaîne à l'interface des membranes et prévenir ainsi la propagation de ces réactions en chaîne (Cillard, 2006). Certains flavonoïdes peuvent chélater des ions métalliques de transition responsables de la formation de ERO (Pietra *et al.*, 2000 ; Halbwirth, 2010) et ainsi, inhiber la réaction de la lipooxygénase.

Ils exercent leur capacité antioxydante au travers de la stimulation ou de la protection des systèmes antioxydants endogènes (Ross, 2002). En effet, ils sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps. Cette même activité antioxydante leurs permet de réguler les radicaux comme l'oxyde nitrique qui favorise une bonne circulation sanguine, coordonne l'activité du système immunitaire avec celle du cerveau et module la communication entre les cellules de ce dernier.

Les flavonoïdes jouent un rôle dans l'inhibition des lipo-oxygénases (LOXs), soit directement, soit indirectement par la chélation d'ions métalliques. Les lipo-oxygénases catalysent l'oxydation d'acide arachidonique en acides gras polyinsaturés (Mladinka *et al.*, 2010). Certains sont des inhibiteurs compétitifs de la xanthine oxydase, la double liaison C2-C3 est indispensable à cette activité. Les composés dont la liaison C2-C3 est saturée sont les plus actifs, de plus, une hydroxylation placée en position méta d'une méthylation sur le cycle B augmente l'activité inhibitrice sur la NADPH oxydase, enzyme clé du stress oxydatif (Mladinka *et al.*, 2010).

### **V.2- Activités toxique et pro-oxydante**

Bien que les bienfaits des flavonoïdes sur la santé humaine soient reconnus actuellement, une revue critique des effets toxiques potentiels des flavonoïdes est nécessaire. Plusieurs études indiquent un effet mutagène et génotoxiques dans certains systèmes expérimentaux bactériens ou mammifères, effet lié à une activité pro-oxydante. De nombreuses études montrent à l'évidence que les activités biologiques des flavonoïdes sont doubles. Ils peuvent agir en tant qu'antimutagène/pro-mutagène, antioxydant/pro-oxydant. Tout dépend largement des quantités consommées et des conditions physiologiques de l'organisme. Un surdosage peut entraîner des dommages allant jusqu'à des mutations dans l'ADN. Certaines études récentes d'intervention chez l'homme montrent que les flavonoïdes, comme la quercétine semblent être antimutagènes *in vivo* (Skibola et al., 2000). Les flavonoïdes semblent donc être toxiques vis-à-vis des cellules tumorales mais plus ou moins toxiques vis-à-vis des cellules normales à des concentrations très élevées (Matsuo, 2005)

### **V.3- Activité antimicrobienne**

De nombreux flavonoïdes possèdent des propriétés antimicrobiennes (Divya *et al.*, 2014;

Flávia *et al.*, 2014), des synergies ont été mises en évidence pour certaines de ces molécules. Des études *in vivo* sur animaux se sont révélées encourageantes après injection de la sophora-isoflavone par voie intra-péritonéale chez des souris infectées par *Salmonella thyphimurium* (Cushnie *et al.*, 2005a). De nombreux ptéocarpanes sont connus comme bactéricides ou bactériostatiques, en particulier vis-à-vis des bactéries Gram+ (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008), pour ces composés, il semble que la présence de 2 groupements hydroxyles libres soit essentielle à l'activité. Il a été démontré que les 5-hydroxyflavanones et les 5 hydroxy-isoflavanones avec un, deux ou trois groupements hydroxyles en position 7, 2' et 4' inhiberaient la croissance de *Streptococcus sp.*, l'hydroxylation la plus importante pour l'activité étant celle en position 2'. Par contre, les méthyloxylation diminuent considérablement les effets antibactériens (Chen *et al.*, 2012).

Les flavonoïdes agiraient à plusieurs niveaux : le cycle B jouerait un rôle important dans l'intercalation avec les acides nucléiques inhibant ainsi la synthèse d'ADN et d'ARN des microorganismes, ils peuvent également inhiber l'ADN gyrase d'*Escherichia coli* (Wu *et al.*, 2013). Certaines catéchines (flavan-3-ols), la 2,4,2'-trihydroxy-5'-méthylchalcone, la naringénine et la quercétine possèdent un effet antibactérien en provoquant un changement de perméabilité membranaire. Les licochalcones interféreraient avec le métabolisme énergétique en inhibant la NADH cytochrome c réductase (Cushnie *et al.*, 2005a).

Les flavonols issus de fractions de propolis ont montré des effets significatifs dans la lutte contre l'herpès simplex virus de type 2 ou HSV-2, sexuellement transmissible, et qui est considéré comme un facteur à haut risque pour la transmission du VIH (Khan *et al.*, 2005).

#### **V.4- Activité anti-inflammatoire**

Bien que l'inflammation soit un phénomène normal d'autodéfense de l'organisme contre des

blessures, elle est parfois incontrôlée dans les maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde) ou lorsqu'elle est liée aux réponses allergiques (asthme) (Benavente-Garcia, 2008; Conforti *et al.*, 2008). Les mastocytes sont des cellules qui participent aux réactions allergiques et à l'inflammation en sécrétant des médiateurs inflammatoires comme l'histamine et les cytokines pro-inflammatoires. L'action pharmacologique des flavonoïdes suggère qu'ils pourraient présenter un intérêt dans le traitement des allergies en régulant ces mastocytes. De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (De Medina *et al.*, 2009 ; Soro *et al.*, 2015).

Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes. La quercétine a un effet anti-inflammatoire en inhibant quelques enzymes de synthèse tel que la cyclooxygénase (Gonzalez *et al.*, 2007). Une étude portant sur l'astragaline, la fisetine, le kaempferol, la myricétine, la quercétine et la rutine, sur les réactions inflammatoires allergiques induites par les mastocytes a permis de constater que toutes ces molécules, hormis l'astragaline, inhibaient la sécrétion de l'histamine (Park *et al.*, 2008).

De même, dans la famille des stilbènes, le resvératrol a montré des propriétés anti-inflammatoires *in vivo* et *in vitro* (Renaud, 2011).

### **V.5- Activité anti-ulcère**

Dans des expériences réalisées sur des rats, la quercétine et la naringénine ont montré un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production de mucus, le piégeage des radicaux libres et également l'inhibition de la production de leucotriènes (Di Carlo *et al.*, 1999). D'autres études ont permis d'établir une relation étroite

entre les propriétés anti-ulcère de la quercétine, la naringénine, la rutine et le kaempférol, et la production de PAF (*Platelet Activating Factor*) qui est un agent ulcérogène potentiel. En effet, il s'est avéré que la réduction des dommages gastro-intestinaux est due probablement à l'inhibition du PAF par ces flavonoïdes (Izzo, 1996). Une activité antibactérienne ciblant spécifiquement *Helicobacter pylori* a été observée (Ramadan, 2009).

#### **V.6- Effet sur le système cardiovasculaire**

Les flavonoïdes sont réputés pour leur effet protecteur sur la santé cardiovasculaire en modifiant plusieurs processus pathologiques qui interviennent dans l'apparition des maladies cardiovasculaires. Certains flavonoïdes auraient un effet positif dans l'athérosclérose et les formes stables de maladies cardio-vasculaires en diminuant l'oxydation de LDL par inhibition de LOX, une atténuation du stress oxydatif et une diminution de l'inflammation (Duchnowicz *et al.*, 2012). Les flavonoïdes auraient également un intérêt dans le traitement des arythmies et de l'hypertension artérielle, en particulier grâce à une diminution du stress oxydatif. Dans la prévention des infarctus myocardiques, les flavonoïdes agiraient par inhibition de l'agrégation plaquettaire et une diminution des ROS (Mladinka *et al.*, 2010, Liu *et al.*, 2012). Les flavonoïdes inhiberaient l'agrégation plaquettaire par interaction avec les récepteurs aux thromboxanes et posséderaient une action vasodilatatrice, néanmoins, les mécanismes d'action qui interviennent sont encore flous (Mladinka *et al.*, 2010). Des pyrano-isoflavones possèdent une activité vaso-relaxante, (Botta *et al.*, 2009).

#### **V.7- Activité anti-tumorale**

Les substances polyphénoliques sont capables d'activer les mécanismes naturels de la défense anticancéreuse (Gonzalez-Paramas *et al.*, 2011; Galleano *et al.*, 2012). En effet, les premiers stades de la phase d'initiation cancéreuse peuvent être bloqués par la capacité des tissus cibles

à intercepter et à métaboliser les agents mutagènes. Par exemple, les hépatocytes synthétisent des enzymes dites de phase I (notamment des monooxygénases, telle que les cytochromes P-450) qui peuvent oxyder les substances mutagènes hydrophobes en produits constituant le substrat des enzymes de phase II (glucoronyl transférases, sulfo transférases...). Ces enzymes convertissent leurs substrats en espèces hydrolysables facilement excrétées hors des cellules. Ces enzymes sont stimulées sous l'action des substances polyphénoliques trouvées dans les légumes, et aussi sous l'action des isothiocyanates (dérivés des glucosinolates) (Ames *et al.* 1995).

Les isoflavonoïdes peuvent prévenir les cancers hormonaux dépendants en agissant sur les récepteurs ER. Le soja est l'aliment le plus riche en isoflavones avec 1-3 mg/g de poids sec, le composé majoritaire parmi ces isoflavonoïdes étant la génistéine. Il semble qu'un régime riche en génistéine inhibe la croissance des tumeurs de la prostate, en réduisant à la fois le nombre de tumeurs et la taille de ces tumeurs. Néanmoins, les métabolites de la génistéine (composés halogénés) apparaissent prépondérants dans cette activité (Boersma *et al.*, 2001).

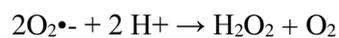
## **VI- Le stress oxydant**

Dans les systèmes biologiques, lorsque l'équilibre dynamique entre la production des oxydants et leur neutralisation par les systèmes de protection subit une défaillance, l'organisme se trouve alors dans un état de «stress oxydant » conduisant à de nombreuses pathologies (Knasmüller *et al.*, 2008).

### **VI.1- Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA)**

Les organismes aérobies puisent leur énergie en oxydant de la matière organique via la chaîne respiratoire. L'oxygène est indispensable comme substrat majeur, mais peut être également une source d'agression pour ces organismes. Des dérivés hautement

réactifs de l'oxygène (ERO) de nature radicalaire ou non, peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons UV, des radiations ionisantes et de métaux de transition. Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) possédant un électron célibataire qui le rend instable et se stabilise au détriment de la molécule voisine qui devient à son tour un radical libre et ainsi de suite (Morelle, 2003). Les ERO sont soit des radicaux libres comme l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ), le peroxyde  $ROO^{\bullet}$  et alkyle  $RO^{\bullet}$ ; soit des molécules comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ). Le radical superoxyde, un radical modérément réactif, est le substrat d'enzymes essentielles, les superoxydes dismutases (SOD), qui le transforment en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).



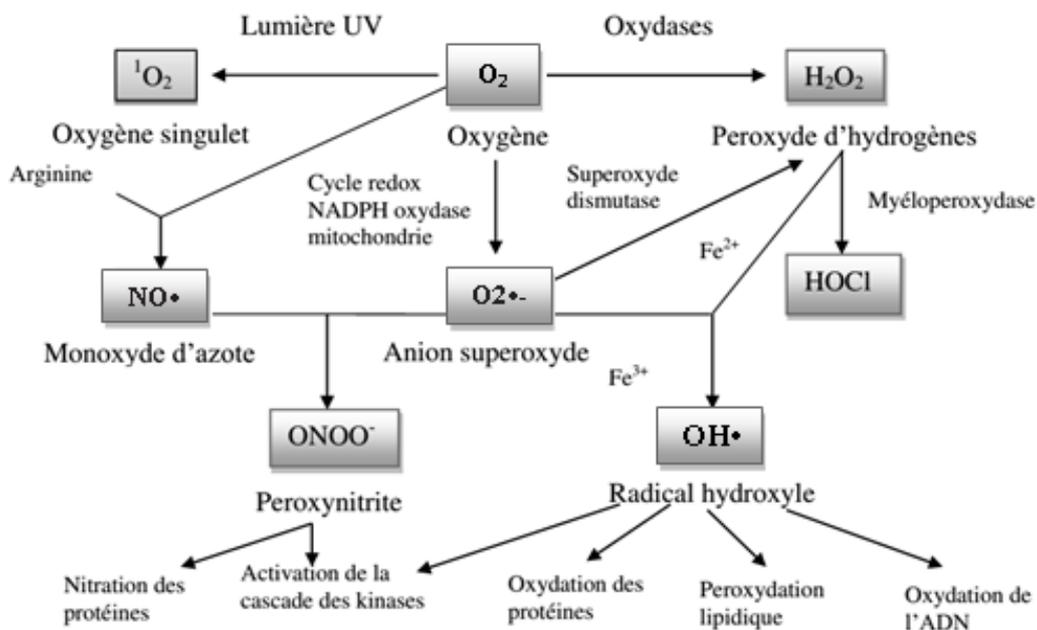
Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) réagit avec le fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) et produit du fer oxydé ferrique ( $Fe^{3+}$ ) et le radical hydroxyle. C'est la réaction de Fenton :



Le radical hydroxyle ainsi formé est extrêmement réactif et va oxyder très rapidement les molécules voisines, formant parfois d'autres radicaux libres (Gardès-Albert, 2005).

Il existe également d'autres oxydants très puissants, qu'ils soient des radicaux libres ou non. Par exemple, l'acide hypochloreux ( $HOCl$ ) est produit par les globules blancs grâce aux myéloperoxydases (MPO) et a une activité bactéricide importante lors de la phagocytose (Beaudeau, 2005). Le monoxyde d'azote radicalaire ou  $NO^{\bullet}$  est synthétisé par les cellules endothéliales via l'action de NO synthétases sur la L-arginine. C'est un composé important dont les effets régulateurs s'exercent sur la plupart des fonctions physiologiques de l'organisme (maintien du tonus vasculaire, neurotransmission, fonctionnement rénal,...). Toutefois, le  $NO^{\bullet}$  peut former avec l'anion superoxyde le peroxynitrite ( $HOONO$ ), un

oxydant puissant et toxique, capable d'endommager de nombreuses molécules organiques (figure 6)



**Figure 6.** Les processus de formation des ERO et ERA (Favier 2003)

## VI.2- Action des ERO sur les biomolécules

Les ERO sont naturellement produits dans les cellules. L'équilibre entre les systèmes de production et d'élimination étant maintenu, leur concentration faible les rend inoffensifs voire même utiles dans des phénomènes comme le renouvellement cellulaire ou la lutte contre certains agents pathogènes (destruction de bactéries au sein des macrophages par exemple). Cependant, formés en trop grande quantité, les ERO peuvent provoquer un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défenses antioxydants et la production des ERO : c'est le stress oxydant. Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, tels que la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (Favier, 1997). Les ERO

sont impliquées dans l'apparition de plusieurs pathologies car ils sont capables d'induire des dégradations oxydatives irréversibles au niveau des macromolécules biologiques :

- **les lipides** sont la cible privilégiée des ERO : le radical hydroxyle instable réagit avec les lipides constitués d'acides gras polyinsaturés pour former un radical peroxy ( $\text{ROO}\cdot$ ), suffisamment réactif pour déclencher une réaction en chaîne sur les acides gras voisins : c'est la lipo-péroxydation des membranes cellulaires. Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire. Cette réaction provoque aussi la dissociation des lipoprotéines à faible densité du sang et provoque un dépôt de lipides oxydés dans les vaisseaux sanguins ou athérosclérose (Stomper *et al.*, 1993, Tsimikas *et al.*, 2005).

- **l'acide désoxyribonucléique (ADN)** est très sensible à l'attaque des ERO. La guanine peut réagir avec le  $\cdot\text{OH}$  pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8OH-dG), entraînant des mutations au sein de l'ADN impliquées dans le déclenchement du cancer (Palmer, 1997, Cadenas *et al.*, 2000, Valko *et al.* 2006) et le vieillissement.

- **les protéines** : les acides aminés : l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine sont particulièrement visées par les radicaux libres. leurs oxydation ont pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes, ce qui entraîne des modifications fonctionnelles importantes telles que la non reconnaissance d'un récepteur par un ligand et la perte d'activité enzymatique (Delattre *et al.*, 2005). Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire comme dans le cas de la maladie de Parkinson ou Alzheimer (Beal, 1995).

- **Les glucides** : peuvent subir des anomalies de glycation et induire un diabète (Selvaraj N *et al.*, 2006 ; Chugh *et al.*, 1999).

### **VI.3- Systèmes de défenses antioxydants**

Pour lutter contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) nocives, notre organisme possède des systèmes de défense antioxydants propres mais d'autres sont fournis par l'alimentation. Ces molécules sont aptes à ralentir, retarder ou prévenir les processus d'oxydation. Le système de défense antioxydant consiste en un réseau enzymatique et non enzymatique aussi bien endogène qu'exogène (Gilgun-Sherki, 2004; Masella *et al.*, 2005). Des facteurs enzymatiques, par exemple, la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase neutralisent les résidus oxydants, tandis que des protéines comme l'albumine, la ceruloplasmine et la transferrine participent à la défense antioxydante par la fixation des ions de cuivre et de fer.

Notre organisme a aussi besoin d'un apport externe d'antioxydants provenant d'une alimentation saine et équilibrée, riche en antioxydants, parmi ces molécules antioxydantes exogènes, on trouve les vitamines C, E et A ainsi que des polyphénols, le glutathion, les caroténoïdes. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc, cofacteurs d'enzymes antioxydantes (Tato Rocha *et al.*, 1994).

### **VII- Maladies infectieuses**

Malgré les progrès scientifiques et technologiques qui laissaient croire à une possible éradication de nombreuses pathologies grâce à la généralisation des mesures d'hygiène et à l'utilisation des antibiotiques et des vaccins, la résurgence des maladies infectieuses et des parasitoses, et l'émergence régulière de nouveaux agents infectieux ont démenti ce pronostic optimiste posant également d'énormes problèmes de santé publique (Iwu, 1999).

Ceci est dû à l'explosion des voyages intercontinentaux et à la globalisation du commerce, la résistance des microbes aux antibiotiques et antiparasitaires, le sida et les hépatites B et C, les

toxi-infections d'origine alimentaire et les infections acquises en milieu hospitalier. Les maladies infectieuses sont responsables de 26,3 % des décès causés par l'ensemble des maladies (OMS, 2002).

### **VII.1- Les agents antibactériens et antifongiques**

Les agents bactériostatiques et fongostatiques inhibent respectivement la croissance des bactéries et des champignons. Par contre, les agents germicides (bactéricides et fongicides) tuent les germes pathogènes mais pas nécessairement les endospores. Il existe différentes classes d'agents antimicrobiens : chimiques (oxydants, alcools, aldéhydes et gaz), physiques (température et rayonnement) et chimiothérapeutiques (antibiotiques).

Les antibiotiques sont des molécules qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des microbes (bactéries, champignons, protozoaires) à très faibles doses, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieures. Cette propriété les distingue des antiseptiques. Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des microorganismes (moisissures : *Penicillium* et *Aspergillus* ou bactéries : des genres *Streptomyces* et *Bacillus*), mais sont inclus généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et entièrement synthétiques (Nauciel, 2000). L'activité des antibiotiques *in vitro* peut être mesurée en déterminant leur capacité à inhiber, et arrêter la croissance microbienne : microbiostatique, ou de les tuer : microbicide. Ces deux termes s'appliquent aussi aux bactéries (bactériostatique, bactéricide).

Chacun des antibiotiques a son spectre d'action propre : certains à spectre restreint ne sont efficaces que contre un groupe limité de microorganismes, d'autres n'attaquent que les bactéries gram-négatives, ou les gram-positives. Par contre ceux à large spectre sont efficaces contre un très grand nombre de microorganismes différents. L'action des antibiotiques est

influencée par de nombreux facteurs : concentration microbienne, milieu, interaction avec un autre antibiotique, ...etc. En outre, l'activité *in vivo* est influencée par des données pharmacologiques et des conditions locales particulières (Nauciel, 2009). La plupart des antibiotiques inhibent des voies métaboliques ciblent des agents infectieux, certains agissent comme antagonistes métaboliques ou antimétabolites, ou inhibiteurs compétitifs, d'autres substances agissent en endommageant ou en entravant les fonctionnements normaux des microorganismes. Chaque famille d'antibiotiques possède son propre mode d'action.

## VII.2- Résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance microbienne est considérée comme le principal obstacle à la réussite d'un traitement contre les maladies infectieuses. L'émergence de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques est un phénomène inquiétant. La multirésistance est décrite comme la résistance ou la diminution de la sensibilité à au moins trois classes d'antibiotiques actifs sur les souches sauvages: (1)  $\beta$ -lactamines, pénicillines, céphalosporines et monobactames; (2) carbapénèmes; (3) fluoroquinolones et (4) aminosides (Shorr, 2009).

Pour pallier chaque émergence de résistance l'industrie pharmaceutique met au point de molécules nouvelles. Cet arsenal thérapeutique aboutit à l'apparition de bactéries «super résistante» contre lesquelles pratiquement toutes les classes antibiotiques à disposition du praticien sont inefficaces comme les entérobactéries BLSE ( $\beta$ -lactamases Spectre Etendue).

Nous rapportons quelques exemples de bactéries résistantes aux ATB : ainsi, *Staphylococcus aureus* est devenu résistant à la benzylpénicilline et à la méthicilline, par contre, il reste sensible à la **gentamicine** ( Bobba *et al.*, 2011).

Il existe au moins trois autres espèces de bactéries capables de provoquer des maladies infectieuses pouvant être mortelles (*Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Pseudomonas aeruginosa*) qui sont devenues résistantes à un grand nombre d'antibiotiques à

l'exception de la **vancomycine** (Iwu, 1999). A la résistance à la pénicilline certaines espèces étaient associée la résistance à la streptomycine, à l'érythromycine, à la tétracycline, au chloramphénicol ainsi qu'aux sulfamides. La prévalence de la résistance aux carbapénèmes croît dans le monde entier dans toutes les espèces de bacilles à Gram négatif cliniquement importantes, elle reste très majoritairement le fait de souches nosocomiales à fort potentiel épidémique. Les échanges internationaux et les circulations de population expliquent, mais seulement en partie, la dissémination à grande échelle de ces résistances.

### **VII.3- Les mécanismes de résistances bactériennes**

Outre les résistances naturelles des bactéries, il existe un nombre important de mécanismes de résistance développés par les bactéries en réponse à la pression de sélection ATB. Ces résistances relèvent d'un mécanisme biochimique dont le support est génétique et elles peuvent être transmissibles à d'autres bactéries (Courvalin, 2007 ; Martinez, 2010).

Les modes de résistance connus actuellement qui résultent de la pression de sélection exercée par les ATB sont au nombre de quatre : l'inactivation enzymatique par la sécrétion d'une enzyme, l'efflux actif, la modification de la cible, la diminution de la perméabilité (porines) à l'antibiotique Yamashita *et al.* (2000), Pitout *et al.* (2004) et Pagès (2004). . Une même bactérie peut présenter plusieurs de ces mécanismes de résistance.

Il faut également comprendre que la résistance microbienne dont font état les rapports de laboratoire est fonction de la concentration sérique que peut atteindre un antibiotique. Par conséquent, la notion de souche sensible ou résistante est toujours en relation avec la concentration sanguine que peut atteindre l'antibiotique prescrit.

En résumé : dans une optique de renouvellement de l'arsenal thérapeutique, l'objet de notre travail est de rechercher parmi les extraits flavoniques de plantes médicinales, des agents

antioxydants et antimicrobiens potentiels. Nos plantes sont *Carthamus caeruleus L.* et *Plantago major L.*

## VIII. Description et Classification des plantes

Les deux plantes sélectionnées ont fait l'objet d'enquêtes auprès des guérisseurs et des herboristes de la région de Sétif. Il s'agit de *Carthamus caeruleus L.* et *Plantago major L.*

### VIII.1- *Carthamus caeruleus L.*

#### VIII.1.1- Classification phylogénique

**Tableau IV.** Classification de *Carthamus caeruleus L.*

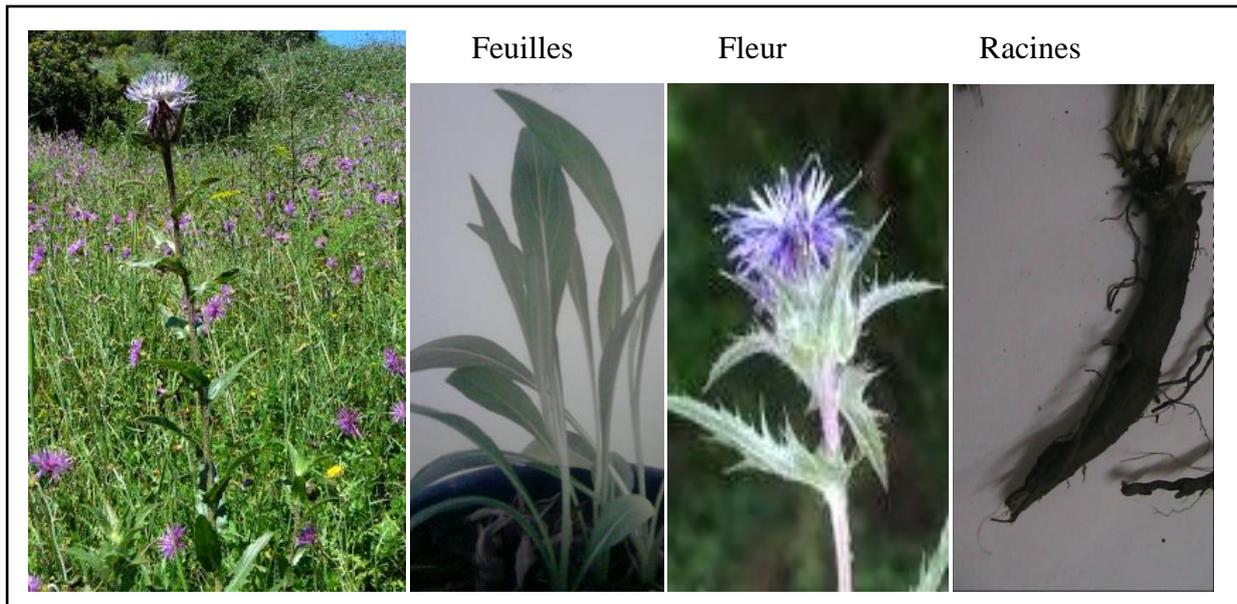
Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Genre	Carthamus
Espèce	<i>Carthamus caeruleus L.</i>

#### VII.1.2- Description de *Carthamus caeruleus L.*

Le genre botanique *Carthamus* regroupe des plantes présentes dans presque toutes les régions méditerranéennes, en Algérie elle est retrouvée en particulier dans le Tell oranais et dans les piémonts Sud Babors.

L'espèce *Carthamus caeruleus L.* qui fait l'objet de notre étude est connue également sous le nom de cardoncelle bleue appartient à la famille des *Asteraceae* (Tableau VI) (Bowles, 2010). C'est une espèce peu commune rencontrée en Méditerranée dans les clairières humides des forêts, les plaines, les bords des ruisseaux, surtout dans les terrains argileux et

argilo-siliceux. La hauteur de cette plante vivace varie de 30 à 150 cm. La tige est dressée et velue. Les feuilles sont coriaces et luisantes, les supérieures sont fortement dentées et piquantes. L'inflorescence se présente sous forme d'un capitule dont les fleurs sont bleues (Figure 7). Les bractées de l'involucre sont aranéeuses et très piquantes. Sa période de floraison s'étale de mai à juillet.



**Figure 7.** Photo de *Carthamus caeruleus L.*

A titre indicatif, d'autres espèces ont été également décrites dérivent d'hybridations naturelles interspécifiques : *C. daumasianus* : *C. helenoïdes* x *C. caeruleus*, *C. fauvei* : *C. calvus* x *C. multifidus* et *C. doumerguei* : *C. multifidus* x *C. calvus* (INRA, 2006).

### **VII.1.3- Utilisation de *Carthamus caeruleus L.* en Pharmacopée traditionnelle**

Les racines de cette espèce sont très utilisées dans le traitement des brûlures dans la région de Sétif, sous forme de pommade. Cette dernière est préparée à partir des racines préalablement lavées et épluchées, puis bouillies dans du lait ou de l'eau. Ces racines sont ensuite écrasées, réduites en pommade, appliquée sur les brûlures.

## VII.2- *Plantago major L.*

### VII.2.1- Classification phylogénique

**Tableau V.** Classification de *Plantago major L.*

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Plantaginales
Famille	Plantaginaceae
Genre	Plantago
Espèce	<i>Plantago major L.</i>

### VII.2.2- Description de *Plantago major L.*

Le Grand plantain (*Plantago major*) ou plantain majeur des oiseaux est une plante herbacée vivace de la famille des Plantaginaceae (tableau V), originaire d'Europe est bien connue pour être une des premières à s'être répandue dans les colonies. Plante herbacée vivace à rhizome court et racelles pouvant dépasser 20 cm (Figure 8). Les feuilles basales sont disposées en rosette. La hampe est dépourvue de feuilles, portant l'inflorescence au sommet. Les feuilles vertes et larges sont ovales à limbe continuant sur les côtés du pétiole, à nervures parallèles, lisses ou légèrement pubescentes. Les inflorescences se présentent en épis à fleurs nombreuses ayant un calice à quatre lobes aigus. Le fruit est une capsule contenant des graines de couleur foncée.



**Figure 8.** Photo de *Plantago major* L.

### VII.2.3- Utilisation de *Plantago major* L. en pharmacopée traditionnelle

Les feuilles de ce genre botanique, sont considérées comme hémostatique à action rapide sur les blessures, depuis l'Antiquité. Les propriétés anti-inflammatoires sont mises à profit en gargarisme et en bain oculaire. Cette plante possède également des propriétés bronchodilatatrices. On a démontré l'intérêt de l'extrait aqueux en cas de bronchites chroniques (Marjorie, 2003).

En Algérie, dans la région de Sétif, les feuilles fraîches écrasées sont utilisées comme cicatrisant, pour calmer les désagréments causés par les piqûres d'insectes grâce à leurs propriétés antiprurigineuses, et les effets allergisant des orties. Les feuilles sont également appliquées sur les abcès donnant souvent un résultat spectaculaire. Les racines du plantain, broyées, servaient aussi pour préparer des cataplasmes anti-infectieux. Par contre, les graines sont laxatives, effet probablement dû au mucilage qu'elles contiennent.

En Afrique du Nord, le plantain est utilisé pour le traitement des inflammations, des hémorroïdes et la fièvre (Veale *et al.*, 1992). Cette plante est également indiquée en cas de

diarrhée (Conway *et al.*, 1979), de bronchite (Matev M *et al.*, 1982 ; Markov, 1992), pour soigner la cataracte et les conjonctivites (Gurib-Fakim *et al.*, 1994; Seaforth, 1998). Des études réalisées sur cette plante ont pu déterminer des activités antidiabétique (Noor, 2000) et anticancéreuse (Yaremenko, 1990; Lithander, 1992 ; Samuelson, 2000).

## Chapitre II : Matériel et méthodes

### I- Matériel végétal

Une étude ethnobotanique des plantes médicinales a été réalisée en première instance auprès des herboristes établis et de guérisseurs connus de la région de Sétif. Deux plantes ont été retenues : *Carthamus caeruleus* L. récoltés au niveau de Meouane, région de Sétif, et *Plantago major* L. provenant de Kherata. Notre étude a porté sur les feuilles et les racines de l'une et les feuilles de l'autre. La première plante a été authentifiée par le Professeur Laouer Hocine de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université Ferhat Abbas, Sétif 1. Quant à la deuxième plante, son identification a été réalisée par le Docteur Boulacheb Nacera de la Faculté de Pharmacie à l'Université Ferhat Abbas, Sétif 1. Les organes de ces plantes ont été récoltés au printemps, en Mars 2008 et 2011. Ils sont ensuite nettoyés à l'eau et laissés sécher à l'obscurité pendant 2 semaines, dans un endroit sec et aéré. Le matériel végétal, une fois séché est réduit en poudre dans un mixeur, puis stocké dans des bocaux en verre à l'abri de la lumière.

### II- Préparation des extraits

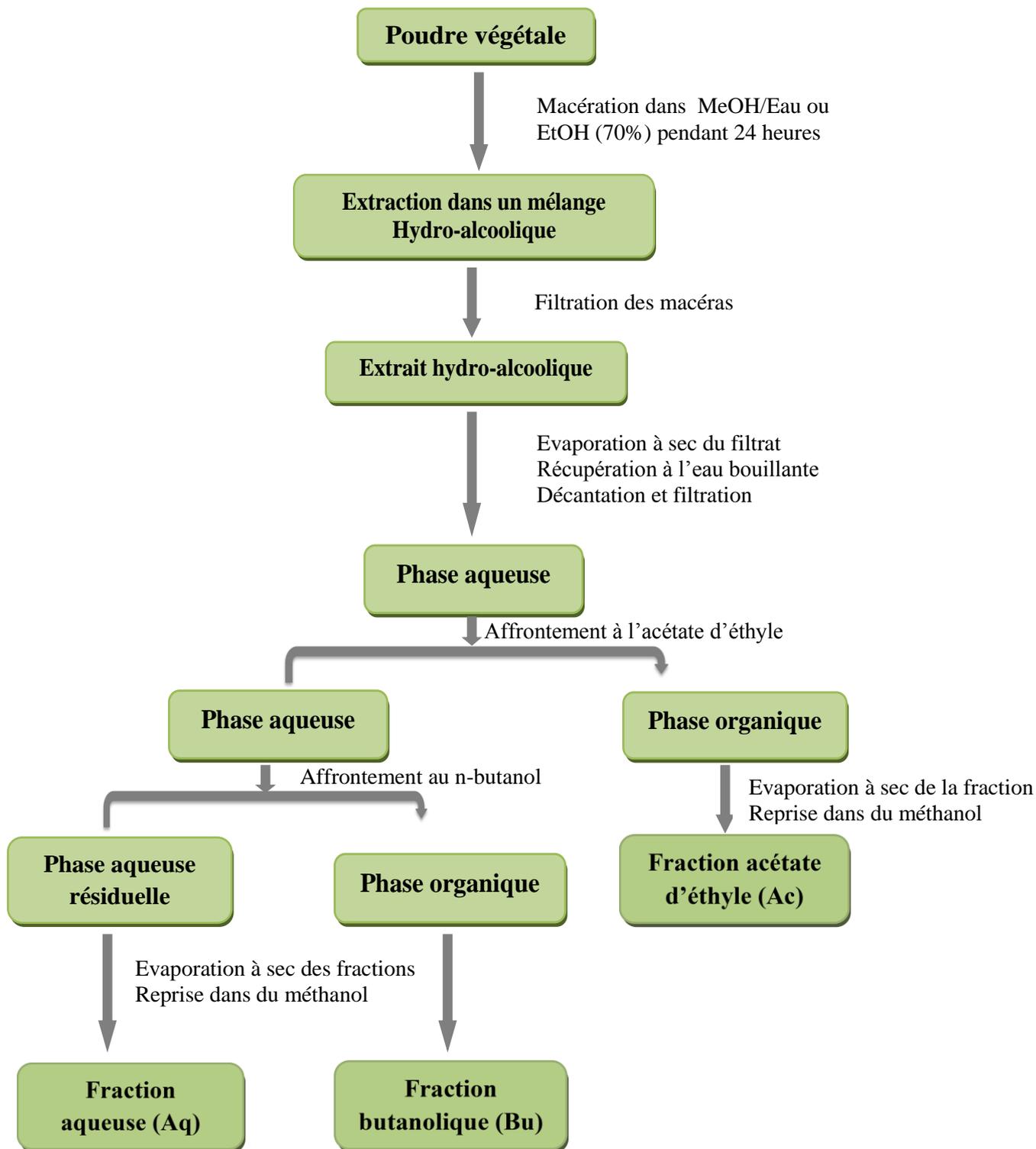
#### II.1- Extraits de racines

Le protocole extractif a été effectué selon la méthode d'Upson *et al.* (2000) et comporte les étapes suivantes :

- pour les racines, le méthanol et l'éthanol ont été utilisés dans le protocole extractif pour vérifier quel solvant donnera un meilleur rendement. L'extraction a été réalisée par macération à chaud de 50 g de matériel végétal dans 500 ml d'un mélange hydro-alcoolique : méthanol pur (Bio-Chem)-eau ou éthanol 95°-eau (7:3; v/v), sous agitation magnétique à 80°C pendant 30 mn. Ce procédé empêche l'oxydation ou l'hydrolyse enzymatique. Le

mélange est laissé ensuite à macérer durant 24 heures au réfrigérateur puis filtré sur tissu et papier filtre Whatman n°3. La macération est renouvelée deux fois sur le résidu récupéré avec renouvellement du solvant pour permettre la solubilisation des composés lipophiles et hydrophiles. Les 3 macéras filtrés sont réunis et on obtient donc l'extrait hydro-alcoolique brut (figure 9).

- l'extrait hydro-alcoolique est évaporé à sec sous pression réduite à 40°C au Rotavapeur Buchi R215 et pesé pour déterminer son rendement.
- le résidu sec de couleur marron est repris dans l'eau distillée bouillante (100 ml) qui solubilise proportionnellement les flavonoïdes. La solution obtenue est laissée décanter pendant 24 heures au réfrigérateur puis filtrée sur tissu et papier filtre n° 3, afin d'éliminer les substances non phénoliques (impuretés, graisses, cires etc.).
- la solution aqueuse ainsi obtenue, est soumise à une extraction liquide- liquide avec des solvants organiques suivants: l'acétate d'éthyle (100ml) puis le butanol (100 ml). Cette extraction est réalisée pendant 20 minutes et l'opération est répétée trois fois. Les trois phases organiques ont été réunies et évaporées à sec sous pression réduite à 45° C, puis pesées. La phase aqueuse est également concentrée. Chaque fraction évaporée est pesée, puis reprise dans un volume minimal de 10 ml de méthanol et conservée à 4°C.
- A la fin de toutes ces opérations, plusieurs fractions ont été obtenues :
  - dans le cas de l'extrait hydro-méthanolique :
    - 2 phases organiques : acétate d'éthyle (Ac1) et butanolique (Bu1).
    - une phase aqueuse (Aq1).
  - dans le cas de l'extrait hydro-éthanolique :
    - 2 phases organiques : acétate d'éthyle (Ac2) et butanolique (Bu2)
    - une phase aqueuse (Aq2).



**Figure 9.** Schéma du protocole d'extraction des racines de *Carthamus caeruleus L.*  
(Upson *et al.*, 2000)

Les différentes fractions organiques et aqueuses ainsi obtenues ont été soumises à différents tests afin d'évaluer leur teneur en polyphénols et en flavonoïdes, et leurs activités antimicrobienne et antioxydante sont ensuite expérimentées.

Par ailleurs, le screening phytochimique a été réalisé sur un extrait préparé à partir de 450 g de poudre de racines suivant le protocole précédent en introduisant quelques modifications :

- La poudre végétale est macérée 3 fois pendant 24 heures dans un mélange méthanol pure (Bio-Med)-eau (7:3), puis filtré sur tissu et papier filtre Whatman n° 3.
- Le filtrat est évaporé sous pression réduite à 45° C au rotavapeur Buchi R215 pour éliminer le méthanol et réduire le volume de la solution aqueuse à 400ml.
- Cet extrait aqueux est laissé décanter pendant 24 heures puis filtré. Le filtrat ainsi obtenu subi une extraction à l'éther de pétrole (200ml) qui permet d'entraîner les graisses ainsi que les substances lipophiles. Une deuxième extraction a été réalisée avec l'acétate d'éthyle (400 ml) qui permet la solubilisation des flavonoïdes. Cette extraction est réalisée pendant 20 minutes et l'opération est répétée trois fois.

Trois phases sont à la fin récupérées : phase éther de pétrole (EPC), phase acétate d'éthyle (Ac) et phase aqueuse (Aq). La phase EPC est laissée sous la hotte pour évaporer le solvant. Par contre, les deux phases Ac et Aq sont concentrées sous pression réduite à sec et pesées. Chaque fraction est reprise par 10ml de méthanol et conservé à 4°C.

## **II.2- Extraits de feuilles**

Le protocole appliqué pour préparer l'extrait des feuilles de *Carthamus caeruleus* et de *Plantago major*, diffère de celui réalisé précédemment pour les racines par l'utilisation de l'éther de pétrole. L'extraction est réalisée comme suit :

- L'extrait est obtenu par 3 macérations successives de poudre végétale : 50 grammes

pour la première plante et 200 grammes pour la seconde, dans un mélange méthanol/eau (7 :3).

- Les macéras réunies, sont filtrés sur tissu et papier filtre n° 3, puis évaporés à sec sous pression réduite à 45° C au rotavapor Buchi R215. Le résidu sec de couleur noire est ensuite récupéré à l'eau bouillante (100 ml) et laissé décanter au réfrigérateur 24 heures puis filtré.

- Le filtrat ainsi obtenu subi une extraction à l'éther de pétrole (2x50ml) qui permet d'entraîner les graisses ainsi que la chlorophylle, puis à l'acétate d'éthyle (3 x 100 ml) pendant 20mn pour chaque opération.

A l'issu de ce traitement, on obtient plusieurs fractions:

- 2 fractions organiques : éther de pétrole (EPF) et acétate d'éthyle (AcF), et une fraction aqueuse (AqF) dans le cas de l'extrait hydro-méthanolique des feuilles de *Carthamus caeruleus L.*

- 2 phases organiques : éther de pétrole (EPP) et acétate d'éthyle (AcP), et une fraction aqueuse (AqP) dans le cas de l'extrait hydro-méthanolique des feuilles de *Plantago major L.*

Les fractions éther de pétrole sont laissées sous la hotte pour évaporer le solvant, les autres fractions sont évaporées à sec sous pression réduite à 45° C et reprises chacune par un volume minimal de 10 ml de méthanol puis conservées à 4°C. Ces fractions sont soumises aux mêmes tests utilisés dans le cas des fractions issues des racines.

#### **Rendement de l'extrait :**

Le rendement d'extraction est calculé par la formule suivante (Falleh *et al.*, 2008):

$$\mathbf{R (\%) = (M \text{ ext}/M \text{ éch}) x 100}$$

R est le rendement en %

M ext est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en mg

M éch est la masse sèche de l'échantillon végétal en mg

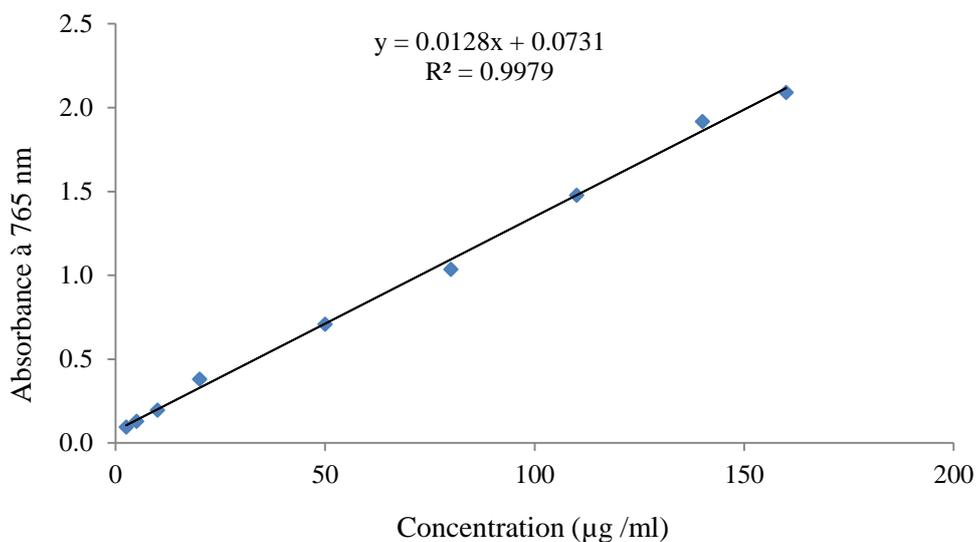
### **III- Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes**

#### **III.1- Dosage des polyphénols totaux**

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits de feuilles et racines des deux plantes étudiées, est effectué selon la méthode de Folin Ciocalteu (Boizot *et al.*, 2006). Le réactif utilisé est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_4$ ) de couleur jaune. Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif, qui entraîne la formation d'un nouveau complexe d'oxydes métalliques de tungstène et de molybdène de couleur bleu. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Ribéreau-Gayon, 1968).

Le protocole du dosage est effectué comme suit : 200µl de chaque extrait dissous dans l'eau distillée ou de point de gamme, est ajouté à 1 ml du réactif de Folin Ciocalteu (dilué 10 fois dans de l'eau distillée). Après 4 min d'incubation à température ambiante, 800µl de  $Na_2CO_3$  (7.5%) dilué également dans l'eau distillée, sont additionnés au mélange. L'ensemble préalablement agité est incubé à l'abri de la lumière pendant 2 heures. L'absorbance est ensuite lue à 765 nm par un spectrophotomètre UV/visible.

La concentration des polyphénols totaux pour chaque échantillon est calculée à partir de l'équation de régression d'une gamme d'étalonnage en milieu aqueux (0 à 200 µg/ml), établie avec l'acide gallique dans les mêmes conditions opératoires que les extraits (figure 10). Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

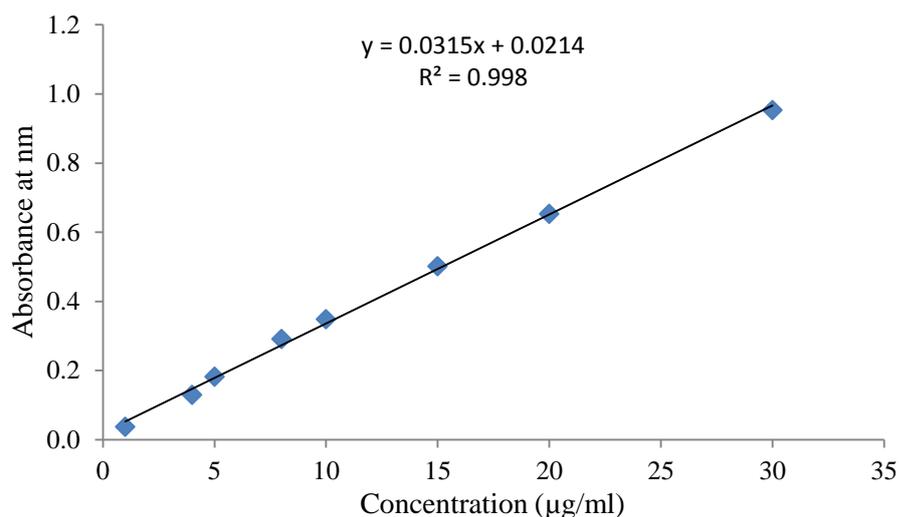


**Figure 10.** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

### III.2- Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun *et al.*, 1996) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les différents extraits. 1ml de chaque échantillon ou du standard (quercétine), dilués dans le méthanol, est ajouté à 1ml de la solution d' $\text{AlCl}_3$  (2% dans le méthanol). Après 10 min d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm par un spectrophotomètre UV-visible.

Les concentrations des flavonoïdes des différents extraits sont déduites à partir de la gamme d'étalonnage (0-40 µg/ml), établie avec la quercétine (figure 11), et sont exprimées en microgrammes équivalents de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait).



**Figure 11.** Courbe d'étalonnage de la quercétine

#### **IV- Activité antioxydante**

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante in vitro des différents extraits issus des deux plantes étudiées est réalisée par la méthode du piégeage du radical libre DPPH, le test de blanchiment de  $\beta$ -carotène et la chélation des ions métalliques comme le fer.

##### **IV.1- Activité anti-radicalaire au DPPH**

L'évaluation du pouvoir antioxydant des différents extraits est réalisée par le test DPPH qui est considéré comme un radical libre relativement stable. Le principe de cette méthode est basé sur la mesure du piégeage des radicaux libres de DPPH (1,1-Diphényle-2-picryl-hydrazyl de couleur violette). En présence de molécules dites antioxydants, le DPPH est transformé en sa forme réduite (diphényle picryl-hydrazine : de couleur jaune), ce qui conduit à une diminution de l'absorbance (Mansouri *et al.*, 2005). La décoloration du DPPH est directement proportionnelle à la capacité des molécules bioactives à le réduire.

Selon le protocole décrit par Sanchez-Moreno (1998) et Agrawal (2011). La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 4 mg de ce produit dans 100 ml de méthanol. 50  $\mu$ l

de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations sont ajoutés à 1,95 ml de solution DPPH. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la lecture de l'absorbance est faite contre un blanc à 517 nm. Le contrôle positif est représenté par un antioxydant standard : butyle hydroxytoluène (BHT) et butyle hydroxyanisole (BHA) dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons, à des concentrations de (0-1.9 mg/ml) et (0-2.5 mg/ml). Les résultats de l'activité anti-radicalaire ou l'inhibition des radicaux libres sont exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\text{I\% d'inhibition} = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs test}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

I %: Pourcentage de l'activité anti-radicalaire

Abs Contrôle : Absorbance de la solution du DPPH au temps 0

Abs test : Absorbance de l'extrait

Les différents extraits issus des deux plantes sont testés à des concentrations de l'ordre de (0-30 mg/ml), (0-10 mg/ml), (0-10 mg/ml), (0-20 mg/ml), (0-20 mg/ml), (0-10 mg/ml), (0-20 mg/ml), (0-0.5 mg/ml), (0-1 mg/ml), (0- 40 mg/ml), (0-2.5 mg/ml), (0-12.5mg/ml) respectivement pour les fractions EPC, Ac1, Ac2, Bu1, Bu2, Aq1, Aq2, AcF, AqF, EPP, AcP et AqP.

#### **Calcul des IC<sub>50</sub>:**

L'IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice de 50 %) appelée aussi EC<sub>50</sub> (Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH. Les IC<sub>50</sub> sont calculées graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des extraits testés (Molyneux, 2004). Pour chaque extrait ou standard de référence, une courbe de régression linéaire ( $y = ax + b$ ) est établie afin de calculer l'IC<sub>50</sub> qui permettra la caractérisation du pouvoir antioxydant des extraits. L'IC<sub>50</sub>

étant la concentration de l'extrait ou du standard qui permet la réduction de 50% de DPPH. Une faible valeur de l'IC<sub>50</sub> indique une forte activité antioxydante. Une différence est statistiquement significative à P<0.05.

#### **IV.2- Test de blanchiment du β-carotène**

Le test de blanchiment du β-carotène permet d'évaluer l'activité antioxydante des extraits de plantes, qui consiste à suivre la cinétique de décoloration du β-carotène par les produits d'oxydation de l'acide linoléique en présence d'un antioxydant.

Le protocole est réalisé suivant la méthode de Tepe *et al.* (2006). Une émulsion de β-carotène/acide linoléique est d'abord préparée dans un ballon en mélangeant 0,5 mg de β-carotène dans 1 ml de chloroforme, 25 µl d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Le chloroforme est complètement évaporé au rotavapeur. 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène pendant 30 minutes, sont ensuite ajoutés à cette émulsion qui est agitée vigoureusement. 350 µl d'extraits ou d'antioxydant de référence (BHT) solubilisés dans du méthanol (2 mg/ml), sont additionnés à 2,5 ml de l'émulsion précédente.

L'absorbance est lue à 490 nm pendant 24 heures à différents intervalles de temps : 0, 1, 2, 4, 6 et 24 heures. L'activité antioxydante relative (AAR %) est calculée selon la formule :

$$\text{AAR \%} = (\text{Abs test} / \text{Abs contrôle}) \times 100$$

AAR %: Pourcentage de l'activité antioxydante relative

Abs Contrôle : Absorbance du contrôle positif (BHT)

Abs test : Absorbance de l'extrait

#### **IV.3- Chélation du fer ferreux**

L'activité de chélation de fer ferreux par les extraits est déterminée par la méthode décrite par (Kartal *et al.*, 2007), qui consiste à suivre l'inhibition de la formation du complexe fer (II)

ferrozine. Le test a été réalisé en mélangeant 100 µl de FeCl<sub>2</sub> (0.6 mM dans l'eau) et 900 µl de méthanol à 500 µl des différentes concentrations des extraits ou de standard de (EDTA). Le mélange est agité vigoureusement et laissé incuber à température ambiante pendant 5 mn. 100 µ L de ferrozine (5 mM) sont alors ajoutés à cette solution est secoué de nouveau. Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance de la solution est mesurée à 562 nm.

Les différents extraits issus des deux plantes sont testés à des concentrations de l'ordre de (0-10 mg/ml), (0-4 mg/ml), (0-1 mg/ml), (0-50 mg/ml), (0-1 mg/ml), (0-100 mg/ml) et (0-10 mg/ml) pour les fractions Ac1, Bu1, Aq1, AcF, AqF, AcP et AqP. Le standard EDTA est testé à des concentrations variant de 0 à 0.25 mg/ml.

L'activité chélatrice du standard (EDTA) et des différents extraits est exprimée en pourcentage en utilisant l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité chélatrice (\%)} = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs extrait}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

Abs contrôle : absorbance du contrôle

Abs extrait : Absorbance de l'extrait.

#### **Calcul des IC<sub>50</sub>:**

L'IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice de 50 %) est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour chélater 50% de fer ferreux, calculée graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des extraits et du standard.

## **V- Tests microbiologiques**

### **V.1- Matériels biologiques**

#### **V.1.1- Souches bactériennes**

Les souches de références ATCC (American Type Culture Collection) : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Pseudomonas aeruginosa* (27853);

ainsi que des souches cliniques: *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis* et *Klebsiella pneumoniae* (tableau VI), nous sont fournies par le Laboratoire de Microbiologie du CHU de Sétif. D'autres souches de référence: *Bacillus cereus* (ATCC10876), *Enterococcus faecalis* (ATCC49452), *Salmonella typhimurium* (ATCC13311), *Citrobacter freundii* (ATCC8090), *Proteus mirabilis* (ATCC 35659), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC700603) et *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), proviennent du Laboratoire des Substances Naturelles de l'Université de Tlemcen.

**Tableau VI :** Quelques caractéristiques des souches bactériennes et fongiques testés

Souches testées	Caractéristiques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocci à Gram+ ubiquitaire, commensal de l'homme et se révèle être pathogène opportuniste. Responsable d'infections nosocomiales, d'intoxications alimentaires et sa résistance aux antibiotiques est parfois un grand problème pour le traitement des patients.
<i>Escherichia coli</i>	Bacille aérobie et Gram- que l'on trouve couramment dans le tube digestif de l'être humain et des animaux à sang chaud.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacille aérobie, Gram-, souvent responsable d'infections nosocomiales (germe ubiquitaire). C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement,
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Gram-, aérobie et immobile. germe d'infection opportuniste chez l'homme, particulièrement chez les personnes immunodéprimées. Agent de maladies nosocomiales.
<i>Proteus mirabilis</i>	Bacille aérobie, Gram- et très mobile. Germe impliqué dans l'apparition d'infections urinaires. Il se trouve habituellement dans l'intestin, le tractus urinaire et les reins de l'être humain. <i>Proteus mirabilis</i> est très souvent présent chez les personnes hospitalisées pour une période prolongée.
<i>Salmonella typhimurium</i>	Bactérie pathogène Gram-, présence d'antigènes somatiques (O) et flagellaire (H).
<i>Bacillus cereus</i>	Gram+, aéro-anaérobie <sup>1</sup> , ubiquitaire synthétisant deux types de toxines : une toxine thermostable et une toxine thermolabile. Responsable d'intoxications alimentaires opportunistes.
<i>Enterococcus faecalis</i>	C'est une bactérie Gram+, anaérobie facultative, qui habite le tube digestif des humains et d'autres mammifères. Elle cause des infections mortelles chez l'homme, particulièrement dans les environnements hospitaliers.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacille Gram-, aéro-anaérobie, immobile, fait partie de la flore intestinale et peut être responsable d'infections urinaires et respiratoires.
<i>Candida albicans</i>	Levure saprophyte endogène de la lumière intestinale humaine et des cavités génitales par contiguïté. Responsable candidoses cutanéomuqueuses.
<i>Ascochyta rabiei</i>	Champignon responsable de l'antracnose chez le pois chiche
<i>Fusarium oxysporum albidis</i>	Champignon ascomycète responsable du flétrissement des plantes par envahissement des vaisseaux du xylème
<i>Fusarium Var coeruleum</i>	Agent de pourriture des tubercules de pomme de terre

### **V.1.2- Souches Fongiques**

*Candida albicans*, un champignon parasite de l'homme, est fourni par le Laboratoire de Parasitologie du CHU de Sétif; et des champignons phytopathogènes (*Aschochyta rabiei*, *Fusarium oxysporum albidinis* et *Fusarium Var coeruleum*) (tableau VI), proviennent du Laboratoire de Microbiologie Appliquée de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat Abbas Sétif1.

### **V.2- Evaluation de l'activité antibactérienne**

Le test de sensibilité des bactéries aux différentes fractions des extraits est réalisé *in vitro* par la méthode de diffusion en milieu gélosé (NCCLS, 1997; Rebecca *et al.*, 2011). Les différentes souches bactériennes sont repiquées par la méthode des stries sur gélose Mueller Hinton, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures. A partir de ces cultures jeunes, des colonies pures sont isolées pour préparer l'inoculum bactérien. Chaque colonie est mise en suspension dans 2.5 ml d'eau distillée stérile. La turbidité de la suspension est mesurée à l'aide d'un densitomètre et ajustée à 0.5 Mc Farland. L'ensemencement de l'inoculum est réalisé par écouvillonnage en effectuant des stries serrées sur la gélose. Cette opération est répétée 3 fois en tournant la boîte de 60°.

Des disques stériles de papier buvard de 6 mm de diamètre, sont imprégnés de 20 µl d'extrait et les disques de témoin négatif sont imprégnés de méthanol. Tous les disques, une fois séchés dans l'étuve à 37°C, sont déposés délicatement sur le milieu gélosé ensemencé préalablement avec une suspension bactérienne des souches testées. Des disques standards de Gentamicine (10µg) sont utilisés comme témoins positifs. Les tests sont réalisés en triplicata pour chaque extrait. Après incubation à 37° C pendant 18 à 20 heures, les diamètres des zones claires d'inhibition autour des disques sont mesurés en mm. Selon Biyiti *et al.* (2004), un extrait est considéré comme actif s'il produit une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10 mm. Une

zone d'inhibition supérieure à 14 mm correspond à une activité antibactérienne très significative (Ramzy *et al.*, 2010).

### **V.3- Evaluation de l'activité antifongique**

L'activité antifongique est déterminée par la méthode de diffusion sur gélose Sabouraud contenant du chloramphénicol ou de l'actidione utilisée dans le cas de *Candida albicans*. L'inoculum est préparé à partir de cultures jeunes de 2 à 3 jours. Une colonie pure est mise en suspension dans de l'eau distillée stérile. La turbidité de cette suspension est ajustée à 0.5 Mac Farland ( $10^8$  CFU/ml) et un aliquote de 0.1 ml de celle-ci est étalé sur la gélose. Des disques stériles de papier buvard de 6 mm de diamètre, imprégnés de 20 µl d'extrait et séchés dans l'étuve à 37° C sont aseptiquement déposés sur le milieu gélosé. Les disques imprégnés de méthanol ou d'Amphotéricine B (10 µg/ml) sont respectivement utilisés comme témoins négatif et positif.

Les champignons phytopathogènes (*Aschochyta rabiei*, *Fusarium oxysporum albidinis* et *Fusarium Var coeruleum*), sont ensemencés sur la gélose de Malt et incubées pendant 5 à 7 jours. Des disques de 5 mm de diamètre sont prélevés à partir de ces cultures et mis en suspension dans l'eau distillé stérile. La concentration de la suspension de spores est déterminée par comptage sur cellule de Malassez, une dilution est réalisée afin d'obtenir  $10^7$  spores /ml, puis un aliquote de 0.1 ml est étalé sur le milieu gélosé. Les contrôles négatif et positif consistent en des disques stériles de papier buvard de 6 mm imprégnés respectivement avec de 20 µl de méthanol ou de Digrain4 (Dichlorvos : 125 g/l, Malathion : 100 g/l). Après incubation à 25° C pendant 3 à 6 jours d'incubation, les diamètres des zones claires d'inhibition autour des disques sont mesurés en mm.

#### **V.4- Détermination de la concentration minimale d’Inhibition (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)**

##### **V.4.1- Détermination de la CMI par la méthode de diffusion sur gélose**

Les extraits ayant montré une activité antibactérienne positive, sont sélectionnés pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode de diffusion sur gélose. La CMI d’un extrait vis-à-vis d’une souche donnée correspond à la plus petite des concentrations ne montrant aucune croissance visible de germe. Des dilutions successives de progression arithmétique de raison 2 ont permis de préparer une gamme de dilution (1/2, 1/4, 1/8 et 1/16).

##### **V.4.2- Détermination de la CMI et la CMB par la méthode de micro-dilution**

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et les Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) sont déterminées en utilisant la technique de micro-dilution avec le bouillon Muller Hinton (NCCLS, 2000). Les CMI des extraits des deux plantes étudiées, sont déterminées selon le protocole suivant :

- Une gamme de concentrations est préparée avec des dilutions (de gradient 2) à partir de chaque extrait. 25 µl des dilutions sont distribués dans les puits 1 à 10 de la microplaque. Les puits 11 et 12 représentent respectivement le témoin de culture des bactéries et le témoin de stérilité du milieu de culture MH.
- L’inoculum bactérien est préparé dans 5 à 10 ml d’eau physiologique stérile à partir de cultures pures de 24 heures. La densité de la suspension, mesure effectuée sur densitomètre, est ajustée à 0.5 Mac Farland ( $10^8$  CFU/ml). Les cupules de la microplaque sont inoculées avec de 5 µl de la suspension bactérienne (diluée au  $1/10^{\text{ème}}$ ), à l’exception de la  $12^{\text{ème}}$  colonne sert de témoin négatif.
- 70 µl de milieu Muller Hinton sont répartis dans les 96 puits de la microplaque. Les

inocula sont de  $5.10^5$  UFC/ml. Les plaques sont incubées ensuite à 37 °C pendant 24 heures. Après incubation, une éventuelle croissance est révélée par la présence d'un trouble au fond de la cupule. La CMI est définie comme la concentration minimale d'extrait pour laquelle on n'observe pas de croissance visible à l'œil nu.

- Les cupules n'ayant montré aucune croissance microbienne visible à partir de la CMI, sont ré-isolés sur la gélose Muller-Hinton. L'ensemencement est fait par stries parallèles de 3 cm de long à la surface de la gélose. Après 24h d'incubation à l'étuve à 37 °C, le nombre de colonies sur les stries a été comparé à celles de la boîte témoin ensemencée avec des stries des dilutions de l'inoculum bactérien ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$ ). La plus faible concentration pour laquelle on n'observe aucune colonie microbienne (99,99% de destruction) correspond à concentration minimale bactéricide (CMB).

#### **V.5- Synergie entre les extraits des deux plantes étudiées et de leur combinaison à un antibiotique standard**

L'effet synergique entre les extraits des deux plantes est évalué par la méthode de diffusion des disques décrite précédemment. Des disques en papier sont imprégnés par un mélange de deux extraits issus des deux plantes, puis séchés dans l'étuve à 37°C, ensuite déposés délicatement sur l'agar ensemencé préalablement avec une suspension bactérienne des souches testées. Après incubation à 37° C pendant 24 heures, les diamètres des zones claires d'inhibition autour des disques sont mesurés en mm.

Le même protocole est appliqué pour la détermination de la synergie en combinant les extraits des deux plantes étudiées à un antibiotique de référence (Gentamicin Himedia SD016). Des disques d'antibiotique imprégnés de 20µl d'extrait, sont séchés, puis déposés délicatement sur l'agar ensemencé préalablement avec une suspension bactérienne des souches testées.

Après incubation à 37° C pendant 24 heures, les diamètres des zones claires d'inhibition autour des disques sont mesurés en mm.

Les zones d'inhibition observées pour les combinaisons entre les extraits des deux plantes sont comparées à la moyenne des zones d'inhibition des extraits testés seuls. Les zones d'inhibition pour l'antibiotique testé seul ou combiné à chacun des extraits sont également comparées. Une différence significative ( $\geq 5\text{mm}$ ) montre un effet synergique (Chanda *et al.*, 2013).

## **VI- Techniques de fractionnement et de purification des extraits**

Les extraits issus des deux plantes étudiées, ayant révélé des activités biologiques font l'objet d'une étude chimique en utilisant des techniques de purification, d'isolement, et d'identification structurale de principes actifs. Les techniques chromatographiques sont à la base de la séparation et la purification des principes actifs des extraits ayant une activité biologique initialement détectée. Parmi ces techniques, on peut citer la chromatographie sur colonne et sur couches minces préparative, et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

### **VI.1- Chromatographie sur couche mince (CCM)**

Des aliquotes de nos extraits sont déposés sur les couches minces de gel de silice (Silica gel F254) sur support d'aluminium ou plastique. Après élution chaque tache correspondant à un constituant est identifié par comparaison du Rf avec un témoin (une même substance migre à la même hauteur dans des conditions opératoires identiques; même Rf).

$$\mathbf{Rf = hauteur\ de\ la\ tache/hauteur\ du\ front\ du\ solvant}$$

Trois systèmes de solvants ont été utilisés :

- Système 1 : toluène /acétone/Acide formique (6 : 1 : 1)

- Système 2 : butanol/acide acétique/eau (40 : 10 : 50)
- Système 3 : hexane/Acide acétique (5/1)

L'étude chromatographique retenue permettra alors une approche de la composition flavonique de l'échantillon à analyser.

### **VI.2- Chromatographie préparative sur colonne**

L'extrait dissous dans le méthanol est additionné à quelques grammes de gel de silice puis évaporé à sec afin d'obtenir un solide sous forme de poudre. La masse des fractions acétate d'éthyle Ac et AcF des racines et feuilles de *Carthamus caeruleus L.*, AcP de *Plantago major L.*, correspondait à 8, 2 et 4 grammes d'extraits.

Le mélange est déposé sur une colonne de gel de silice (70-230 mesh, Merck) préparée dans le toluène. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système toluène-méthanol en commençant par le toluène pur et en terminant par le méthanol pur. A l'issue de cette phase préparatoire, les fractions collectées de la colonne sont soumises à un contrôle par chromatographie monodimensionnelle sur couche mince de gel de silice (Silica gel F254) sur support d'aluminium, en vue d'apprécier leur degrés de pureté et réunir les fractions similaires. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365nm).

### **VI.3- Etude des spectres UV-visible dans le méthanol et en présence de réactifs**

Les spectres UV des composés flavoniques purifiés enregistrés dans le méthanol permettent de déterminer la classe de flavonoïdes à laquelle ils appartiennent. Ces spectres peuvent être modifiés en présence de réactifs tels que la soude, le chlorure d'aluminium, l'acétate de sodium et l'acide borique. Ces derniers réagissent avec les groupements hydroxyles par formation de complexes qui se traduira sur le spectre UV par des déplacements

bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorption, permettant la localisation des hydroxyles libres sur le squelette flavonique.

En général, la procédure d'enregistrement des spectres avec addition des réactifs se fait comme suit :

**a- Première série spectrale**

- Enregistrement du spectre du composé flavonique purifié dans le méthanol. La densité de la solution est voisine de 0.5.

- Addition de 3 gouttes de solution aqueuse de soude (NaOH 0.5 N) sont ajoutées à la solution précédente. Enregistrement immédiat du spectre en présence de soude, puis après 5 minutes.

**b- Deuxième séries spectrale**

- Enregistrement du spectre du composé flavonique dans le méthanol.
- Addition de 5 gouttes d'une solution méthanolique à 1% de chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) et enregistrement du spectre en présence de  $\text{AlCl}_3$ .
- Addition à la cuve précédente de 3 à 5 gouttes de HCl (2N). puis enregistrement du spectre  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$ .

**c- Troisième série spectrale**

- Enregistrement du spectre du composé flavonique dans le méthanol.
- Quelques grains d'acétate de sodium NaOAc sont ajoutés à la solution précédente et après dissolution u, le spectre en présence de NaOAc est mesuré.
- Le spectre NaOAc/ $\text{H}_3\text{BO}_3$ , est enregistré après addition de 5 gouttes à 5% de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  à la cuve contenant NaOAc.

Les spectres méthanoliques et en présence de réactifs sont interprétées se basant sur les données du tableau III.

## **VII- Analyse statistique**

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne. L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel Graph pad Prism. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives pour  $p < 0,05$  dans l'ensemble des analyses statistiques en utilisant l'analyse de la covariance « One way » et le test de Tukey.

## Chapitre III : Résultats et discussion

### I- Rendement des extraits

Les rendements des extraits hydro-méthanolique et hydro-éthanolique, préparés à partir des racines de *Carthamus caeruleus L.*, sont similaires et sont respectivement de 16.2% et 15.2% du poids sec. Le poids des différentes fractions acétate d'éthyle (Ac1), buthanolique (Bu1) et aqueuse (Aq1) issues de l'extrait hydro-méthanolique est de 0.47 g, 2.72 g, 5.20 g respectivement. Une légère différence est notée par rapport aux fractions de l'extrait hydro-éthanolique des racines (Ac2, Bu2 et Aq2) dont le poids sont de 0.40 g, 2.17 g et 4.70 g respectivement. Les poids correspondant aux deux fractions organique (AcF) et aqueuse (AqF) des feuilles de la même plante, sont de 0.5 g et 1.384 g.

Par rapport au mélange hydro-éthanolique, le mélange méthanol-eau s'avère être un très bon solvant et facilite l'évaporation.

En ce qui concerne les extraits des feuilles de *Plantago major L.*, le poids des deux fractions organiques éther de pétrole (EPP) et acétate d'éthyle (AcP), et la fraction aqueuse sont respectivement de 0.44, 1.34 et 4.58 g.

### II- Teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes

#### II.1- Extraits de *Carthamus caeruleus L.*

Les concentrations totales en polyphénols et flavonoïdes sont estimés à partir de courbes d'étalonnage établies avec l'acide gallique et la quercétine. Tous les résultats sont regroupés dans le tableau VII. Ils montrent une grande variabilité du taux des polyphénols non seulement dans les extraits issus d'un même organe, mais aussi des différences très significatives par comparaison aux teneurs obtenues dans les feuilles et les racines. Ainsi, le taux des polyphénols obtenu au niveau des fractions (Ac1, Bu1 et Aq1) issues de l'extrait

hydro-méthanolique est plus élevé que celui des mêmes fractions issues de l'extrait hydro-éthanolique des racines ce qui la performance du méthanol comme solvant dans l'extraction des polyphénols.

Au regard de la fraction acétate d'éthyle (AcF) des feuilles nous remarquons qu'elle est la plus riche en polyphénols avec  $316.11 \pm 4.46$  mg EAG/g d'extrait. Les deux fractions : acétate d'éthyle (Ac1) des racines et aqueuse (AqF) des feuilles de la même plante renferment des taux élevés en phénols totaux de l'ordre de  $99.94 \pm 3.53$  et  $80.39 \pm 1.67$  mg EAG/g d'extrait, alors que les fractions acétate d'éthyle (Ac2), buthanolique (Bu2) des racines issues de l'extrait hydro-éthanolique donne des teneurs respectives de  $69.06 \pm 1.67$  et  $53.36 \pm 0.51$  mg EAG/g d'extrait). Les teneurs plus faibles sont observées dans les fractions aqueuses (Aq1 et Aq2) et éther de pétrole (EPC) avec  $27.17 \pm 1.64$ ,  $24.15 \pm 0.90$  et  $22.14 \pm 0.28$  mg EAG/g d'extrait.

**Tableau VII.** Teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes des extraits de *Carthamus caeruleus L.* Les valeurs sont la moyenne de trois essais  $\pm$  SD

Fractions	Teneur en polyphénols totaux mg EAG/g d'extrait	Teneur en flavonoïdes $\mu$ g EQ/mg d'extrait
EPC	$22.14 \pm 0.28$	$1.35 \pm 0.07$
Ac1	$99.94 \pm 3.53$	$8.71 \pm 0.16$
Ac2	$69.06 \pm 1.67$	$6.52 \pm 0.69$
Bu1	$60.00 \pm 2.35$	$3.94 \pm 0.10$
Bu2	$53.36 \pm 0.51$	$3.25 \pm 0.14$
Aq1	$27.17 \pm 1.64$	$1.71 \pm 0.03$
Aq2	$24.15 \pm 0.90$	$1.36 \pm 0.09$
AcF	$316.11 \pm 4.46$	$28.13 \pm 0.38$
AqF	$80.39 \pm 1.67$	$5.30 \pm 0.12$

Par ailleurs, les données du tableau VII montrent également un ordre décroissant quant à la teneur en flavonoïdes des extraits des racines (Ac1 > Bu1 > Aq1 > EPC) et des feuilles (AcF

> AqF), le meilleur rendement est obtenu dans les fractions de l'extrait hydro-méthanolique (Ac1, Bu1 et Aq1). Pour l'extraction des flavonoïdes, c'est également le méthanol qui est le bon solvant. L'extrait qui renferme le taux le plus élevée est la fraction acétate d'éthyle (AcF) des feuilles avec  $28.13 \pm 0.38 \mu\text{g}/\text{mg}$  d'extrait, suivie des fractions acétate d'éthyle (Ac1 et Ac2) des racines et la fraction aqueuse (AqF) des feuilles taux correspondants de  $8.75 \pm 0.16$ ,  $6.52 \pm 0.69$  et  $5.30 \pm 0.12 \mu\text{g}/\text{mg}$ . Les fractions buthanolique Bu1 et Bu2 des racines possèdent des teneurs moyennes similaires avec  $3.94 \pm 0.10$  et  $3.25 \pm 0.14 \mu\text{g}/\text{mg}$  d'extrait. Quant aux fractions éther de pétrole (EPC) et aqueuses (Aq1 et Aq2) des racines, leurs teneurs restent les plus faibles ( $1.35 \pm 0.07$ ,  $1.98 \pm 0.09$ ,  $1.74 \pm 0.03$  et  $1.36 \pm 0.09 \mu\text{g EQ}/\text{g}$  d'extrait).

Une nette différence dans les taux des flavonoïdes au niveau des feuilles ( $28 \mu\text{g EQ}/\text{g}$  d'extrait) et des racines ( $8,75 \mu\text{g EQ}/\text{g}$  d'extrait) est trouvée, elle pourrait s'expliquer par le fait que les feuilles représentent le lieu privilégié de leur synthèse.

Il faut cependant noter que les résultats obtenus dans la présente étude en ce concerne les polyphénols et les flavonoïdes totaux des extraits (acétate d'éthyle et aqueux) issus des racines de *Carthamus caeruleus L.* sont nettement supérieures à ceux trouvées par d'autres auteurs : Belkhiri (2009) et de Boumerfeg (2010) qui ont utilisé un procédé extractif différent de celui que nous avons utilisé.

## **II.2- Extraits de *Plantago major L.***

Conforté par les résultats obtenus précédemment nous avons adopté le méthanol comme solvant dans la suite de nos expériences.

Le tableau VIII rapporte un ordre décroissant des teneurs en polyphénols et flavonoïdes dans les extraits des feuilles de *Plantago major L.* (AcP > AqP > EPP). La fraction acétate d'éthyle

(AcP) renferme des taux très élevés en phénols et flavonoïdes, ils sont de  $114.45 \pm 2.42$  mg EAG/g et  $5.48 \pm 0.06$   $\mu$ g EQ/mg d'extrait. Alors que, des quantités faibles en phénols totaux et flavonoïdes ont été retrouvées dans les fractions aqueuse : ( $26.89 \pm 0.79$  mg EAG/g d'extrait et de  $2.34 \pm 0.19$   $\mu$ g EQ/mg d'extrait) et éther de pétrole ( $5.79 \pm 0.10$  mg EAG/g et  $1.24 \pm 0.03$   $\mu$ g EQ/mg d'extrait).

**Tableau VIII.** Teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes des extraits de *Plantago major L.* Les valeurs sont la moyenne de trois essais  $\pm$  SD.

Fractions	Teneur en polyphénols totaux mg EAG/g d'extrait	Teneur en flavonoïdes $\mu$ g EQ/mg d'extrait
EPP	$5.79 \pm 0.10$	$1.24 \pm 0.03$
AqP	$26.89 \pm 0.79$	$2.34 \pm 0.19$
AcP	$114.45 \pm 2.42$	$5.48 \pm 0.06$

### III- Activités biologiques

#### III.1- Activité antioxydante

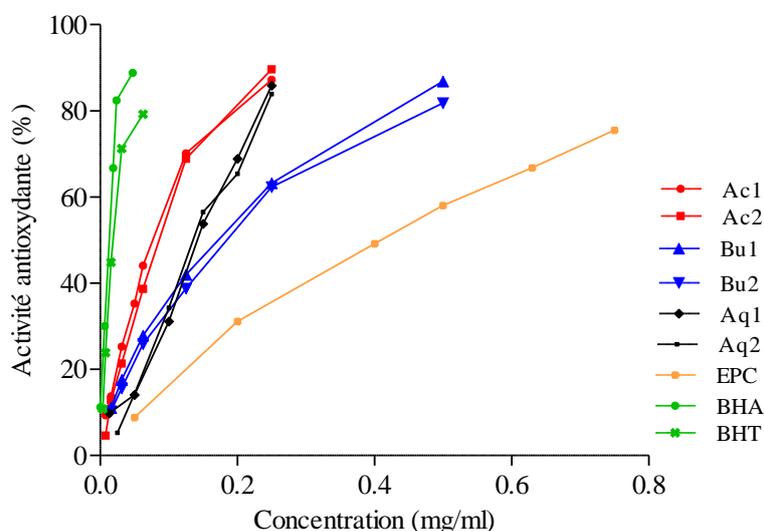
L'activité antioxydante des différents extraits issus des deux plantes étudiées a été évaluée *in-vitro* par trois méthodes différentes, le piégeage du radical libre DPPH, le test de blanchiment du  $\beta$ -carotène et la chélation des ions métalliques comme le fer.

##### III.1.1- Activité anti-radicalaire au DPPH

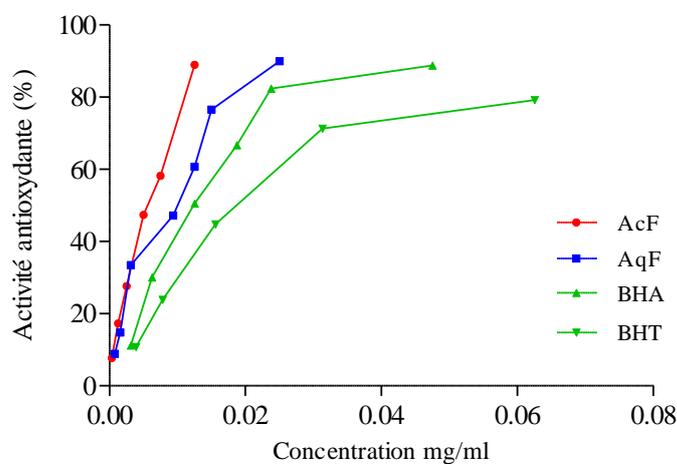
###### III.1.1.1- Extraits des racines et feuilles de *Carthamus caeruleus L.*

Le pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations différentes des extraits issues à partir des racines et feuilles de *Carthamus caeruleus L.* est représenté par les figures 12 et 13. L'activité antioxydante est inversement proportionnelle aux concentrations comprises entre 1.25 à 25  $\mu$ g/ml dans le cas des extraits des feuilles (AcF et AqF). Le même résultat est obtenu mais à des concentrations plus élevées allant jusqu'à 500  $\mu$ g/ml pour les

fractions acétate d'éthyle (Ac1), buthanolique (Bu1) et aqueuse (Aq1) des racines, et plus encore en ce qui concerne la fraction éther de pétrole, 100 à 750 µg/ml.



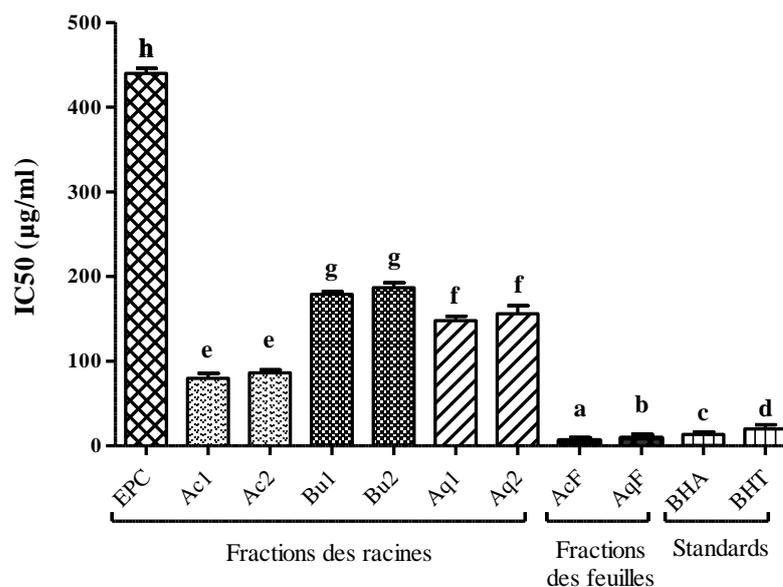
**Figure 12.** Activité anti-radicalaire au DPPH des extraits de racines de *Carthamus caeruleus L.* et des standards (BHT et BHA)



**Figure 13.** Activité anti-radicalaire au DPPH des extraits de feuilles de *Carthamus caeruleus L.* et des standards (BHT et BHA)

En résumé, les fractions d'acétate d'éthyle sont plus efficaces que les fractions buthanolique, aqueuses et d'éther de pétrole. Le plus important est de noter qu'il existe dans les racines une présence de flavonoïdes avec une activité non négligeable.

Si l'on observe le résultat de l'effet scavenger des flavonoïdes des feuilles, il est plus marqué que celui des molécules standards (BHA et BHT) utilisés en agroalimentaire comme suppléments. Ainsi, cette plante s'avère très intéressante à exploiter dans le domaine pharmaceutique. La figure 14 illustre l'IC<sub>50</sub> des différents extraits des feuilles et racines de *Carthamus caeruleus L*



**Figure 14 :** IC<sub>50</sub> en µg/ml des des extraits des racines et feuilles de *Carthamus caeruleus L.* et des standards(BHA et BHT)

Les données montrent donc un ordre décroissant du pouvoir réducteur de ces différents extraits et des standards (BHA et BHT) : AcF > AqF > BHA > BHT > Ac1 > Aq1 > Bu1 > EPC. Les fractions AcF et AqF possèdent la plus faible IC<sub>50</sub> de  $6.18 \pm 0.05$  et  $9.6 \pm 0.26$  µg/ml respectivement. Donc, elles ont un pouvoir antioxydant plus élevé que celui des extraits des racines de la même plante et des standards (BHT et BHA).

De plus, les fractions issues des extraits bruts hydro-méthanolique et hydro-éthanolique des racines de *Carthamus caeruleus L.* montrent des activités similaires. Les fractions acetate d'éthyle (Ac1) et aqueuse (Aq1) présentent une activité assez faible avec une IC<sub>50</sub> de  $81.81 \pm$

0.48 et  $100.10 \pm 2.10$   $\mu\text{g/ml}$  par rapport aux standards BHA et BHT ( $13.44 \pm 0.30$  et  $20.35 \pm 0.16$   $\mu\text{g/ml}$ ). En ce qui concerne les fractions buthanoliques (Bu1 et Bu2) et éther de pétrole (EPC), leurs  $\text{IC}_{50}$  sont très élevée de l'ordre de  $178.76 \pm 3.28$   $\mu\text{g/ml}$  et  $439.89 \pm 5.82$   $\mu\text{g/ml}$  respectivement. Leurs activités antioxydantes sont donc moins significatives.

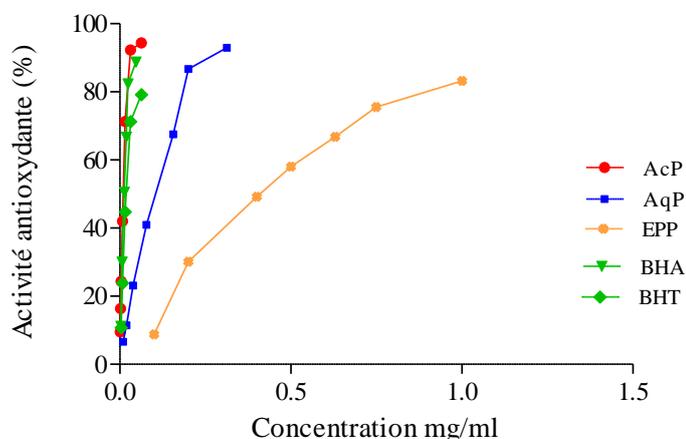
En résumé : quantitativement et qualitativement, les feuilles de *Carthamus caeruleus L.* constituent une source substantielle d'antioxydants.

### III.1.1.2- Extraits des feuilles de *Plantago major L.*

Je rappelle que *Plantago major L.* est largement utilisé comme médicament traditionnel dans notre région, en particulier pour toutes affections cutanées. Dans les extraits flavoniques des feuilles, l'activité antioxydante est fortement exprimée dans la fraction acétate d'éthyle (AcP), l'effet scavenger ces fractions est représenté dans la figure 15. Le pourcentage de l'activité antioxydante est très élevée à des concentrations très faibles (1.25 à 31.25  $\mu\text{g/ml}$ ). Une différence est statistiquement significative à  $P < 0.05$ . La fraction acétate d'éthyle (AcP) est notamment la plus active, avec une  $\text{IC}_{50}$  de l'ordre de  $12.87 \pm 0.27$   $\mu\text{g/ml}$ , qui est similaire à celle du standard de référence BHA ( $13.44 \pm 0.3$   $\mu\text{g/ml}$ ), mais supérieure à celle du standard BHT ( $20.35 \pm 0.16$   $\mu\text{g/ml}$ ) (figure 16). Ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Özge Kaya (2011). Les données montrent un ordre décroissant du pouvoir réducteur du DPPH par les différentes fractions des extraits feuilles de *Plantago* (AcP=BHA > BHT > AqP > EPP). Des concentrations élevées de l'ordre de 1.56 à 400  $\mu\text{g/ml}$  et 100 à 1000  $\mu\text{g/ml}$  pour les fractions aqueuses (AqP) et d'éther de pétrole (EPP) sont employées. Ces fractions montrent une activité relativement faible voire non significative.

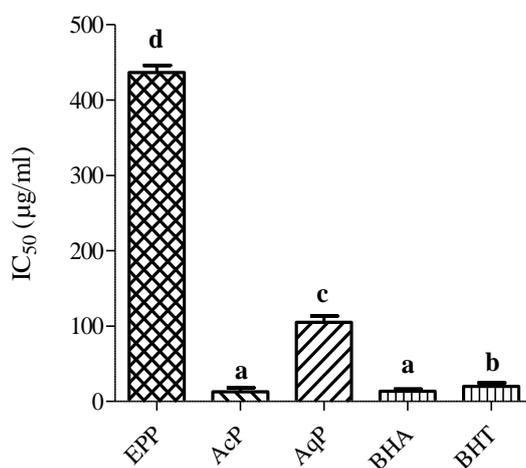
La courbe de régression indique un effet scavenger de la fraction AcP d'égale importance par rapport à celui des standards (BHA et BHT). Dans notre cas, l'activité que nous avons

trouvée (12,87  $\mu\text{g/ml}$ ) est supérieure à celle obtenue (1369.31  $\mu\text{g/ml}$ ) par les travaux de Mehni et ses collaborateurs (2012).



**Figure 15.** Activité anti-radicalaire au DPPH des extraits de feuilles de *Plantago major L.* et des standards (BHT et BHA)

En ce qui concerne, les fractions aqueuse (AqP) et éther de pétrole (EPP), leur activité antioxydante est moins significative, étant donné que leur  $\text{IC}_{50}$  est très élevée :  $109.67 \pm 0.21$  et  $439.84 \pm 6.51$   $\mu\text{g/ml}$  (Figure 16).



**Figure 16.**  $\text{IC}_{50}$  en  $\mu\text{g/ml}$  des extraits des feuilles de *Plantago major L.* et des standards (BHA et BHT)

D'après les résultats obtenus, la variation du pouvoir antioxydant des différents extraits pourrait s'expliquer par leur richesse différentielle en polyphénols et plus particulièrement de

la nature des composés. Les fractions acétate d'éthyle (Ac1 AcF) et aqueuse (AqF) de *Carthamus caeruleus L.*, et acétate d'éthyle (AcP) de *Plantago major L.*, ont un pouvoir antioxydant très importants. Certains auteurs ont attribué la capacité des composés flavoniques à piéger les radicaux libres, à la présence de groupements OH en 3', 4' sur le noyau B et/ou un OH libre (Amic *et al.*, 2003). Dans nos perspectives, l'identification structurale de nos composés sera l'objectif principal pouvant permettre la mise en évidence de la relation structure/activité.

### **III.1.2- Test de blanchiment du $\beta$ -carotène. Activité antioxydante relative (AAR)**

#### **III.1.2.1- Extraits de racines et feuilles de *Carthamus caeruleus L.***

La propriété de décoloration du  $\beta$ -carotène est employée dans l'évaluation de l'activité antioxydante du standard (BHT) et des extraits testés. D'après les résultats, nous constatons que ces derniers inhibent d'une manière significative l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du  $\beta$ -carotène par rapport au contrôle négatif (méthanol) qui représente 100% de la peroxydation (Figure 17 et 18).

Toutes les fractions ont des activités antioxydantes significativement différentes à  $P < 0.05$ . Les fractions acétate d'éthyle (AcF) des feuilles et (Ac1) des racines possèdent les plus importantes activités antioxydantes relatives (AAR) estimées à 87.28% et 82.24%. Ces dernières sont peu différentes de celle du contrôle positif (BHT) avec une activité inhibitrice de l'ordre de 99.84% (Figure 19). La fraction aqueuse (AqF) des feuilles montre une AAR de 71,04%, suivie par les fractions buthanolique (Bu1) et aqueuse (Aq1) des racines (60.96% et 57,76%). Par contre, la fraction éther de pétrole (EPC) représente l'extrait le moins actif (14.44%).

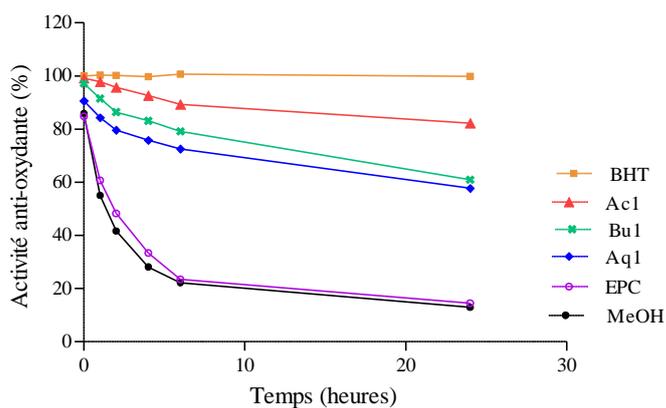


Figure 17. Test de blanchiment du  $\beta$ -carotène des extraits de racines de *Carthamus caeruleus L.*

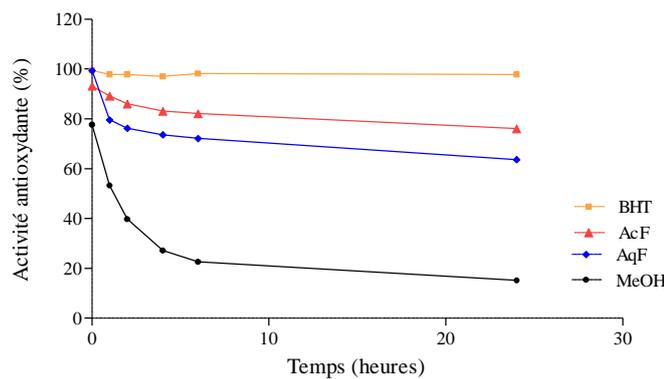


Figure 18. Test de blanchiment du  $\beta$ -carotène des extraits de feuilles de *Carthamus caeruleus L.*

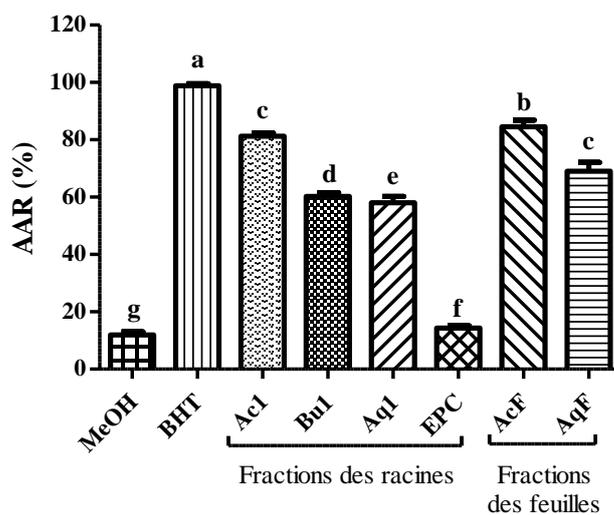


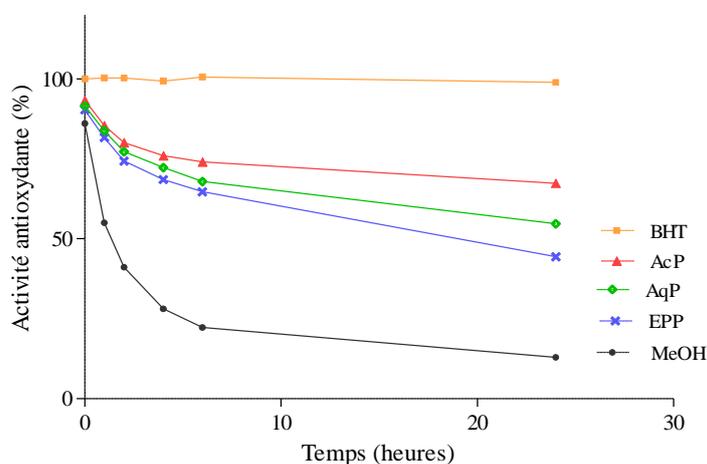
Figure 19 : Activité antioxydante relative (AAR) des extraits de racines et feuilles de *Carthamus caeruleus L.*

### III.1.2.2- Extraits de feuilles de *Plantago major L.*

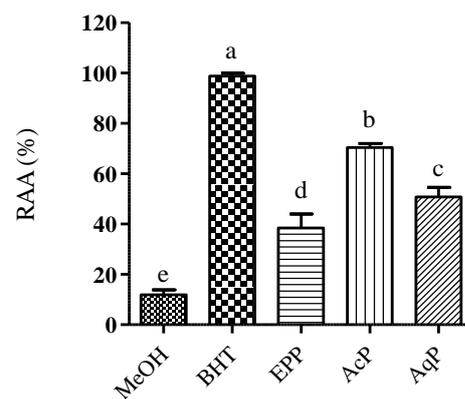
La figure 20 montre le pourcentage d'inhibition de l'oxydation couplée à l'acide linoléique et du  $\beta$ -carotène par les extraits de feuilles de *Plantago major L.*, le standard (BHT) et le témoin négatif (méthanol), à des intervalles de temps différents. Les données montrent un ordre décroissant quant à l'activité antioxydante  $\beta$ -carotène des différents extraits testés (AcP >

AqP> EPP). La fraction acétate d'éthyle (AcP) montre la plus grande activité inhibitrice avec une AAR de 70.48 %, mais qui est significativement inférieure ( $p<0.05$ ) à celle du contrôle positif (BHT) qui représente 100% d'activité inhibitrice (Figure 21). Les fractions aqueuses (AqP) et éther de pétrole (EPP) possèdent une AAR moyenne de 50.16% et 36.72% respectivement.

De nombreux travaux ont montré qu'il existe une corrélation exponentielle linéaire entre la teneur en flavonoïdes et leurs activités antioxydantes ou effet scavenger (Borneo *et al.*, 2008 ; Souri *et al.*, 2008).



**Figure 20.** Test de blanchiment du  $\beta$ -carotène des extraits de feuilles de *Plantago major L.*

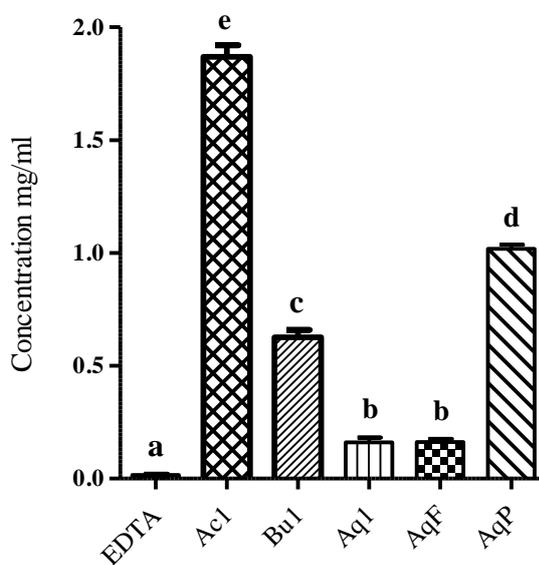


**Figure 21.** Activité antioxydante relative (AAR) des extraits de feuilles de *Plantago major*

### III.1.3- Chélation du fer ferreux

Les chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre impliqués dans la génération de radicaux libres peuvent prévenir les oxydations. Ces chélateurs forment des composés de coordination avec les métaux en inhibant ainsi le cycle redox du métal ou forment des complexes métalliques insolubles. Les flavonoïdes sont de bons chélateurs du fer ce qui est un des mécanismes de leur activité antioxydante (Ferrali *et al.*, 1997).

L'activité chélatrice des extraits testés est exprimée en mg/ml. Pour chaque extrait ou standard de référence, une courbe de régression linéaire ( $y = ax + b$ ) est établie afin de calculer l'IC<sub>50</sub>. L'IC<sub>50</sub> étant la concentration de l'extrait ou du standard qui permet la chélation de 50% de Fe<sup>2+</sup>. Les résultats obtenus montrent que l'activité antioxydante la plus élevée est obtenue dans le cas des fractions aqueuses des fractions Aq1 et AqF de *Carthamus caeruleus L.*, avec une IC<sub>50</sub> de l'ordre de  $0.164 \pm 0.002$  et  $0.173 \pm 0.003$  mg/ml (figure 22). Par contre, l'IC<sub>50</sub> des fractions Bu1, AcP et Ac1 est respectivement de  $0.59 \pm 0.3$ ,  $1.936 \pm 0.002$  et  $1.02 \pm 0.2$  mg/ml. Ces activités restent inférieures à celle du standard (EDTA) avec une IC<sub>50</sub> de  $0.014 \pm 0.0003$  mg/ml et dont l'effet chélateur est très puissant. Les fractions acétate d'éthyle AcF des feuilles de *Carthamus caeruleus L.* et AcP de *Plantago major L.* ne possèdent pas d'activité chélatrice.



**Figure 22.** Activité chélatrice du fer par les extraits de *Carthamus caeruleus L.* et de *Plantago major L.*

Selon Prior *et al.* (2005), il n'y a pas une méthode simple et universelle par laquelle l'activité antioxydante est évaluée qualitativement et quantitativement. La combinaison de plusieurs

méthodes est nécessaire pour réaliser cette évaluation. Les flavonoïdes sont connus par leur capacité à induire la réaction de Fenton et limiter ainsi la production des EOR (Engelmann, 2005). Les résultats variables des activités antioxydantes des flavonoïdes serait due à leur structure et la présence des groupements hydroxyles (Sharififar *et al.*, 2008).

Les antioxydants issus des plantes sont plus efficaces que les antioxydants synthétiques : ils n'induisent pas d'effets secondaires alors que les antioxydants synthétiques sont génotoxiques (Rohman *et al.*, 2010).

### **III.2- Activité antimicrobienne**

Nous avons effectué un criblage de l'activité antimicrobienne sur 16 souches de micro-organismes dont 12 bactéries Gram+ et Gram- parmi lesquelles certaines sont des souches de référence ATCC; et 4 souches fongiques dont *Candida albicans*, pathogène chez l'homme et *Aschochyta rabiei*, *Fusarium oxysporum albidinis* et *Fusarium Var coeruleum*.

#### **III.2.1- Activité antibactérienne des extraits des racines et feuilles**

##### ***Carthamus caeruleus L.***

L'activité antimicrobienne des extraits de plantes est basée sur la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller Hinton agar. Les résultats obtenus pour les tests antibactériens des extraits de racines et feuilles de *Carthamus caeruleus L.*, sont représentés dans le tableau IX.

De manière générale, des effets antibactériens significatifs et variables ont été obtenus avec les fractions organiques et aqueuses, aussi bien sur des bactéries Gram-positives que Gram-négatives. Les fractions organiques (Ac1, Ac2, Bu1 et Bu2) des extraits racinaires, ont montré des activités significatives similaires avec un diamètre d'inhibition respectivement de  $20 \pm 1.5$  mm et  $15 \pm 2.0$  mm à l'encontre de *Bacillus cereus* et *Acinetobacter baumannii* (Annexe, figure 23). Alors que l'une des espèces pathogènes, le *Staphylococcus aureus* a montré une

forte sensibilité à la fraction aqueuse Aq1, le diamètre d'inhibition est de 20 mm, par contre, la fraction acétate d'éthyle Ac1 génère une activité faible 7mm (tableau IX). Des activités modérées de  $10 \pm 1$  mm et  $11.5 \pm 1$  mm ont été notées avec la fraction Ac1 pour *Enterococcus faecalis* et *Escherichia coli*.

D'autre part, les extraits des feuilles de *Carthamus* ne montrent pas le même effet que les racines sauf pour la fraction acétate d'éthyle (AcF) très active sur *Escherichia coli* avec une zone d'inhibition de  $23 \pm 1$  mm de même que la fraction AqF sur *Staphylococcus aureus* et *Acinetobacter baumannii* (Annexe, figure 24).

**Tableau IX.** Diamètre (mm) des zones d'inhibition des différents extraits des racines et feuilles de *Carthamus caeruleus L.*

Souches bactériennes	Zone d'inhibition en mm									
	Ac1	Bu1	Aq1	Ac2	Bu2	Aq2	AcF	AqF	C-	C+
<i>Staphylococcus aureus</i>	7±1.5	-	20±3.5	-	-	10±1.5	10±1	20±1	-	27±00
<i>Escherichia coli</i>	11.5±1	9.5±0.7	9.5±0.7	-	-	-	23±1	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	10±0.6	-	30±00
<i>Acinetobacter baumannii</i>	15±2	10±1.5	-	15±1.0	10±1	-	10±0.6	20±1.5	-	23±00
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27±00
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31±00
<i>Bacillus cereus</i>	20±1.5	16±1.5	-	20±1.5	17±2	12±2.5	10±0.6	-	-	30±00
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	10±1	-	-	-	-	-	-	-	-	17±00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20±00
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

C- : contrôle négatif. C+ : contrôle positif (gentamicine). -: absence d'activité.

L'analyse des données a également révélé qu'aucune fraction n'était efficace sur d'autres espèces pathogènes ATCC : *Listeria monocytogenes*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella*

pneumoniae, *Salmonella typhimurium* et *Serratia marcescens*, qui présentent probablement une résistance innée. La fraction éther de pétrole (EPC) n'est active sur aucun germe.

### III.2.2- Activité antibactérienne des extraits de feuilles de *Plantago major*

*L.*

Les résultats des activités antimicrobiennes des fractions issues des feuilles de *Plantago major L.* sont illustrés dans le tableau X. L'analyse des données a également montré que la fraction acétate d'éthyle (AcP) est plus active que la fraction aqueuse vis-à-vis des bactéries aussi bien sur les Gram-positives que les Gram-négatives (Annexe, figure 25). En effet, *Escherichia coli* est la souche la plus sensible ( $27 \pm 1$  mm) à la fraction acétate d'éthyle (AcP). *Staphylococcus aureus* a également montré une sensibilité très significative ( $16.7 \pm 0.6$  et  $15.3 \pm 1$  mm) vis-à-vis de l'extrait acétate d'éthyle et aqueux.

**Tableau X.** Diamètre (mm) des zones d'inhibition des différents extraits de feuilles de *Plantago major L.*

Souches bactériennes	Zone d'inhibition en mm			
	AcP	AqP	C-	C+
<i>Staphylococcus aureus</i>	$16.7 \pm 1$	$15.3 \pm 1$	–	27±00
<i>Escherichia coli</i>	$27 \pm 1$	$9.5 \pm 0.7$	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$13.3 \pm 0.6$	$12 \pm 1$	–	30±00
<i>Acinetobacter baumannii</i>	$11.3 \pm 0.6$	$10.3 \pm 0.6$	–	23±00
<i>Proteus mirabilis</i>	$8.3 \pm 0.6$	–	–	27±00
<i>Serratia marcescens</i>	–	–	–	–
<i>Salmonella typhimurium</i>	$9.5 \pm 0.5$	–	–	31±00
<i>Bacillus cereus</i>	$14.3 \pm 0.6$	–	–	30±00
<i>Citrobacter freundii</i>	–	–	–	–
<i>Enterococcus faecalis</i>	–	–	–	17±00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$8.7 \pm 0.6$	–	–	20±00
<i>Listeria monocytogenes</i>	–	–	–	–

C<sup>-</sup>: contrôle négatif. C<sup>+</sup> : contrôle positif (gentamicine). –: absence d'activité

Les fractions acétate d'éthyle AcP et aqueuse AqP présentent une bonne activité respectivement sur *Bacillus cereus* ( $14.3 \pm 0.6$  mm) et *Pseudomonas aeruginosa* ( $13.3 \pm 0.6$  mm). Ces activités sont nettement supérieures par rapport à celles trouvées par Victor (1996), Sharifa (2008) et Marwan (2013) ; mais sont similaires aux activités obtenues avec d'autres espèces du même genre botanique (Chang Ho, 2004 ; Motamadi, 2010). Des activités faibles ont été obtenues pour la fraction acétate d'éthyle (AcP) testé sur *Acinetobacter Baumannii* ( $11.3 \pm 0.6$  mm), *Salmonella typhimurium* ( $9.5 \pm 0.5$  mm), *Klebsiella pneumoniae* ( $8.7 \pm 0.6$  mm), *Proteus mirabilis* ( $8.3 \pm 0.6$  mm).

Les résultats obtenus ont montré qu'aucun extrait n'était efficace vis-à-vis de *Serratia marcescens*, ni sur *Citrobacter freundii*, *Listeria monocytogenes* et *Candida albicans*, et que l'extrait d'éther de pétrole (EPP) est inactif sur tous les germes testés.

Toutes les activités antibactériennes enregistrées sont moins marquées que le contrôle positif utilisé (gentamicine). Les résultats obtenus ont indiqué l'existence de composés antimicrobiens dans la majorité des extraits testés, et la différence d'activité antimicrobienne entre ces différents extraits issues de *Carthamus caeruleus L.* et *Plantago major L.*, pourrait s'expliquer par la nature des molécules contenues dans chaque fraction. En effet, il existe des différences de solubilisation des composés phénoliques dans les solvants polaires ou apolaires. Selon Cowan (1999), au cours de l'extraction liquide-liquide, les phytomolécules sont réparties entre les solvants en fonction de leur polarité et leur solubilité. On pourrait en déduire que les substances antibactériennes contenues dans les racines et feuilles de *Carthamus caeruleus L.* et les feuilles de *Plantago major L.*, sont plus solubles dans l'acétate d'éthyle que dans les autres solvants utilisés. L'acétate d'éthyle concentrerait alors mieux le principe actif.

### III.2.3- Activité antifongique des extraits de *Carthamus caeruleus L.* et *Plantago major L.*

Les résultats des tests antifongiques des extraits racinaires de *Carthamus caeruleus L.* sont représentés dans le tableau XI.

La fraction acétate d'éthyle (Ac1) est la plus active avec une zone d'inhibition de 25 mm, suivie de la fraction aqueuse Aq2 (20 mm), buthanolique Bu2 (18 mm) et acétate d'éthyle Ac2 (17 mm). Ces activités sont nettement supérieures à celle du contrôle positif (Amphotéricine B), qui était de l'ordre de  $14.3 \pm 0.5$  mm. A notre connaissance, nos résultats sur *Candida* sont les premiers décrits.

**Tableau XI.** Activité antifongique (zones d'inhibition en mm) des différents extraits des racines de *Carthamus caeruleus L.*

Souches fongiques	Zone d'inhibition en mm						
	Ac1	Bu1	Aq1	Ac2	Bu2	Aq2	C+
<i>Candida albicans</i>	25 ± 2	10 ± 1.5	–	17 ± 2.6	18 ± 2	20 ± 1.5	14.3 ± 0.5
<i>Aschochyta rabiei</i>	12 ± 1.5	11.3 ± 3.9	–	11 ± 1.2	–	–	22.5 ± 3.5
<i>Fusarium oxysporum albidinis</i>	10.6 ± 0.6	–	–	11.3 ± 2.5	8.3 ± 1.1	–	22.5 ± 3.5
<i>Fusarium Var coeruleum</i>	11 ± 2.1	–	–	10.3 ± 0.6	10 ± 1	–	11.6 ± 1.5

– : Absence d'activité. C+ : contrôle positif

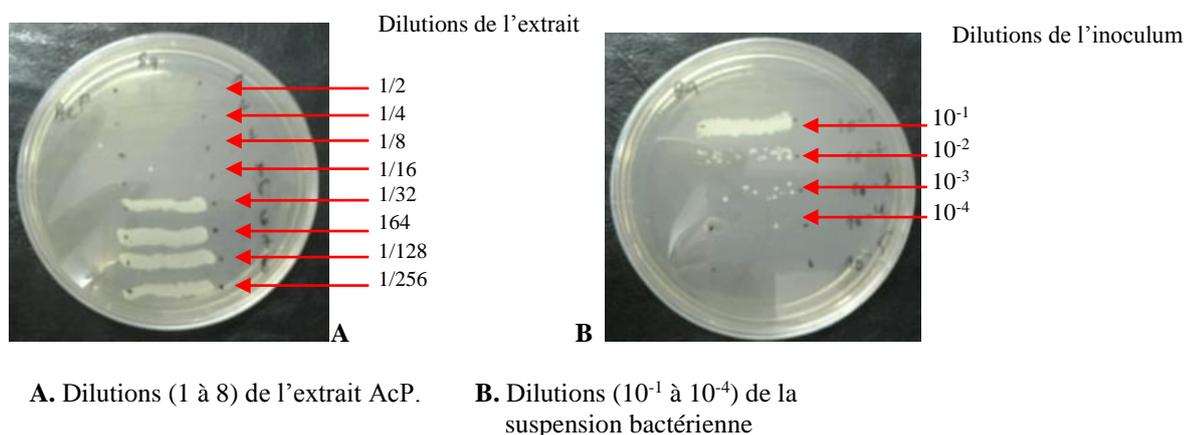
Les tests sur les champignons phytopathogènes, ont montré des activités modérées et similaires avec les fractions acétate d'éthyle Ac1 et Ac2 à l'encontre des 3 souches fongiques testées et sont inférieures à celle du contrôle positif (le Digrain) pour les deux premières souches, mais similaires dans le cas de *Fusarium Var coeruleum*. D'autre part, les souches *Fusarium oxysporum albidinis* et *Fusarium Var coeruleum* sont sensibles à la fraction buthanolique Bu2, la fraction Bu1 n'est active que sur *Aschochyta rabiei* (Annexe, figure 26).

Les résultats ont montré que les souches fongiques étaient résistantes aux extraits issus des feuilles de *Carthamus caeruleus L.* et *Plantago major L.*, mais très sensibles aux extraits de racines de *Carthamus caeruleus L.* et plus particulièrement *Candida albicans*.

Les extraits de racines de *Carthamus caeruleus L.* ont un potentiel antifongique très important. Cette plante pourrait être exploitée comme une source d'agents antifongiques naturels et offre une alternative de lutte biologique contre les infections fongiques des plantes.

### III.2.4- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)

L'évaluation des pouvoirs bactéricides et bactériostatiques des extraits ayant révélé une activité antimicrobienne, a été effectuée en utilisant la technique de micro-dilution sur microplaque. Les CMI et CMB sont déterminées après observation des cultures. La CMB (99,99% de destruction microbienne), a été déterminée par comparaison à une boîte témoin ensemencée avec différentes dilutions de l'inoculum bactérien (figure 27).



**Figure 27.** Exemple de CMB de l'extrait acétate d'éthyle (AcP) de *Plantago major L.* testé sur *Staphylococcus aureus*

Le tableau XII indique que les CMI et les CMB des différents extraits testés sur différentes souches bactériennes. Les CMI s'échelonnent de la valeur la plus basse 0.046 à 34 mg/ml, les CMB varie de 0.046 à 54.25 mg/ml. Les extraits ayant une CMI inférieure à 500 µg/ml sont considérés actifs, l'activité antibactérienne est modérée à des concentrations de CMI comprises entre 500 et 1000 µg/ml, et faible au-delà de 1000 µg/ml (Rios et Recio, 2005; Molina Salinas *et al.*, 2007, Toyang *et al.*, 2012). Le pouvoir bactéricide est confirmé à partir du rapport CMB/CMI.

Les fractions Ac1, AcF et AqF issues de *Carthamus caeruleus L.*, et AcP de *Plantago major L.* sont les extraits les plus actifs étant donné que leurs CMI étaient inférieures à 500 µg/ml. Par contre, les fractions Bu1 et Aq1 issues de *Carthamus caeruleus L.*, et AqP de *Plantago major L.* sont considérés comme des extraits inactifs car leurs CMI sont supérieures à 1000 µg/ml.

Les souches les plus sensibles sont celles qui présentaient les CMI les plus basses. Ce qui permet de faire une classification des micro-organismes par ordre de sensibilité croissante selon la CMI. *Staphylococcus aureus* (CMI = 0.046 mg/ml) et *Acinetobacter baumannii* (CMI=0.046 mg/ml) sont les souches les plus sensibles, suivies par *Bacillus cereus* (CMI=0.19 mg/ml). Des CMI modérées ont été obtenues dans le cas de *Proteus mirabilis* (CMI = 1.05 mg/ml) et *Pseudomonas aeruginosa* (CMI = 1.05 mg/ml), mais sont élevées en ce qui concerne *Salmonella typhimurium* (CMI = 4.19 mg/ml) et *Klebsiella pneumoniae* (CMI = 4.19 mg/ml).

La fraction acétate d'éthyle Ac1 des racines de *Carthamus caeruleus L.* est bactéricide sur *Acinetobacter baumannii* (CMB = 0.37 mg/ml), *Staphylococcus aureus* (CMB = 2.94 mg/ml) et *Enterococcus faecalis* (CMB = 5.87 mg/ml). D'autre part, les fractions buthanolique Bu1 et aqueuse Aq1 des racines sont bactéricides sur *Bacillus cereus*. La fraction acétate d'éthyle des

feuilles de la même plante est bactéricide contre trois souches: *Acinetobacter baumannii* (CMB = 0.046 mg/ml), *Bacillus cereus* (CMB = 0.78 mg/ml) et *Staphylococcus aureus* (CMB = 3.12 mg/ml), la fraction aqueuse est bactéricide sur *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Acinetobacter baumannii*.

La fraction acétate d'éthyle AcP est bactéricide à l'encontre de *Acinetobacter baumannii* (CMB = 0.19 mg/ml), *Pseudomonas aeruginosa* (CMB = 2.1 mg/ml), *Staphylococcus aureus* (CMB = 2.10 mg/ml) et *Klebsiella pneumoniae* (CMB = 16.75), la fraction aqueuse AqP de *Plantago major L.* est bactéricide sur *Acinetobacter baumannii*.

Dans le rapport CMB/CMI calculé, l'extrait est validé comme bactéricide lorsqu'il est inférieur ou égal à 4 et bactériostatique, lorsqu'il est supérieur à 4 selon Carbomelle (1987), Marmonier (1990) et Berche *et al.* (1991).

Des valeurs de ce rapport sont variables pour les divers extraits en fonction des souches bactériennes testées (tableau XII), ce qui permet d'établir une classification de ces extraits suivant leur spectre d'action.

Ainsi, Ac1 est bactériostatique sur *Bacillus cereus*, elle est bactéricide sur *Acinetobacter baumannii* (1), *Staphylococcus aureus* (4) et *Enterococcus faecalis* (4). La fraction AcF de la même plante est bactéricide contre trois souches: *Acinetobacter baumannii* (1), *Bacillus cereus* (4) et *Staphylococcus aureus* (4). D'autre part, les fractions buthanolique Bu1 et aqueuse Aq1 des racines sont bactéricides sur *Bacillus cereus*.

La fraction acétate d'éthyle de *Plantago* est bactéricide à l'encontre de *Acinetobacter baumannii* (1), *Pseudomonas aeruginosa* (2), *Staphylococcus aureus* (2.35) et *Klebsiella pneumoniae* (4), la fraction aqueuse AqP de *Plantago major L.* possède un pouvoir bactériostatique sur *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

**Tableau XII.** CMI et CMB (mg/ml) des différents extraits de  
*Carthamus caeruleus L.* et *Plantago major L.*

Fractions	CMI et CMB	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Ac1	CMI	0.73	–	0.37	–	–	1.47	–	1.47
	CMB	2.94	–	0.37	–	–	11.75	–	5.87
	CMB/CMI	4	–	<b>1</b>	–	–	<b>8</b>	–	<b>4</b>
Bu1	CMI	–	–	34	–	–	34	–	–
	CMB	–	–	34	–	–	68	–	–
	CMB/CMI	–	–	<b>1</b>	–	–	<b>2</b>	–	–
Aq1	CMI	32.5	–	–	–	–	16.25	–	–
	CMB	130	–	–	–	–	32.50	–	–
	CMB/CMI	<b>4</b>	–	–	–	–	<b>2</b>	–	–
AcF	CMI	0.78	–	0.046	–	–	0.19	–	–
	CMB	3.12	–	0.046	–	–	0.78	–	–
	CMB/CMI	<b>4</b>	–	<b>1</b>	–	–	<b>4</b>	–	–
AqF	CMI	0.26	2.16	0.54	–	–	–	–	–
	CMB	4.31	4.31	4.31	–	–	–	–	–
	CMB/CMI	<b>16.57</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	–	–	–	–	–
AcP	CMI	0.89	1.05	0.19	1.05	4.19	4.19	4.19	–
	CMB	2.10	2.10	0.19	33.5	33.5	33.5	16.75	–
	CMB/CMI	<b>2.35</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	–
AqP	CMI	7.15	7.16	3.58	–	–	–	–	–
	CMB	54.25	57.25	28.62	–	–	–	–	–
	CMB/CMI	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	–	–	–	–	–

**CMB/CMI ≤ 4 : Pouvoir bactéricide. CMB/CMI > 4 : Pouvoir bactériostatique**

L'analyse des données a révélé comme pour les activités antioxydantes, que les fractions ayant un pouvoir antibactérien très intéressant sont les fractions acétate d'éthyle Ac1, AcF de *Carthamus caeruleus L.* et AcP de *Plantago major L.* Par conséquent, ces résultats sont en concordance avec les activités antimicrobiennes obtenues par les tests *in vitro*. Ceci pourrait être lié à la nature qualitative et quantitative des composés flavoniques dotés d'un pouvoir

antibactérien, qui se solubilisent mieux dans l'acétate d'éthyle. En effet, des auteurs ont supposé que certains flavonoïdes appartenant à la classe des flavonols (Cushni, 2005b) des flavan-3-ols (Sirk *et al.*, 2008) provoquent une altération de la membrane cytoplasmique conduisant à sa lyse, ou bien l'inhibition de la topoisomérase par les isoflavonoïdes, bloquant alors la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Gradisar *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2010). D'autres travaux ont pu montrer que les flavonoïdes comme la quercétine et l'apigénine sont impliqués dans l'inhibition de la D-alanine : D-alanine ligase, perturbant alors la synthèse de la paroi bactérienne (Wu *et al.*, 2008).

### III.2.5- Synergie entre les extraits de *Carthamus caeruleus L.* et *Plantago major L.*

Des combinaisons entre les extraits (Ac1, Bu1, Aq1, AcF et AqF) issus des racines et feuilles de *Carthamus caeruleus* et des extraits (AcP et AqP) de *Plantago major L.* sont testées sur toutes les souches bactériennes pour déterminer s'il existe une éventuelle synergie. Les résultats obtenus sont exprimés en diamètres des zones d'inhibition pour les différentes combinaisons des différents extraits vis-à-vis des souches testées et sont comparées aux diamètres moyens des zones d'inhibitions des extraits testés isolément (tableau XIII).

Les effets antimicrobiens des associations de ces extraits, comme pour les associations aux antibiotiques, sont définis en réponse aux interactions de manières suivantes:

- **Indifférence:** l'activité d'un extrait n'est pas affectée par l'autre:  $(A + B) = \text{effet A ou effet B}$ .
- **Addition:** l'effet de l'association des extraits est égal à la somme des effets de chaque extrait étudiée isolément:  $(A + B) = \text{effet A} + \text{effet B}$ .
- **Synergie:** l'effet est significativement supérieur à la somme de chaque extraits étudiée isolément:  $(A + B) > \text{effet A} + \text{effet B}$ .

- **Antagonisme**: l'association diminue l'activité. Elle est inférieure à la somme des effets de chaque extrait pris séparément: (A+B) < effet A ou effet B.

**Tableau XIII.** Diamètre (mm) des zones d'inhibition des différentes combinaisons des extraits de *Carthamus caeruleus* L. et *Plantago major* L.

Fractions	Zone d'inhibition en mm							
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<b>AcP+Ac1</b>	14 ± 0.7 (I)	13.5 ± 0.5 (I)	14 ± 1.5 (I)	17 ± 1 (S)	7 ± 0.3 (A)	7.5 ± 0.7 (A)	–	11 ± 0.5 (I)
<b>Moy des ZI</b>	11.85 ± 1.25	13.3 ± 0.6	13.15 ± 1.3	8.3 ± 0.6	9.5 ± 0.5	17.15 ± 1.05	–	10 ± 1
<b>AcP+Bu1</b>	10.5 ± 0.5 (A)	9.5 ± 0.7 (A)	11.5 ± 0.7 (I)	13.7 ± 0.6 (S)	11.5 ± 0.7 (I)	8.7 ± 0.6 (A)	–	–
<b>Moy des ZI</b>	16.7 ± 1	13.3 ± 0.6	10.65 ± 1.05	8.3 ± 0.6	9.5 ± 0.5	15.15 ± 1.05	–	–
<b>AcP+Aq1</b>	13.5 ± 0.7 (A)	10 ± 0.7 (A)	14.5 ± 0.7 (S)	18 ± 2.8 (S)	12.5 ± 0.7 (S)	8.3 ± 0.6 (A)	–	–
<b>Moy des ZI</b>	18.35 ± 2.05	13.3 ± 0.6	11.3 ± 0.6	8.3 ± 0.6	9.5 ± 0.5	14.5 ± 0.6	–	–
<b>AcP+AcF</b>	26 ± 1.4 (S)	15.5 ± 0.3 (I)	22.5 ± 0.7 (S)	13.3 ± 0.6 (I)	9.5 ± 0.3 (I)	20.3 ± 0.6 (S)	–	–
<b>Moy des ZI</b>	13.35 ± 1.35	13.3 ± 0.6	10.65 ± 0.6	11.3 ± 0.6	9.5 ± 0.5	12.15 ± 0.6	–	–
<b>AcP+AqF</b>	21.5 ± 0.7 (S)	10.5 ± 0.7 (I)	24.5 ± 0.7 (S)	8.3 ± 0.6 (I)	7.7 ± 0.3 (I)	18.3 ± 0.6 (S)	–	–
<b>Moy des ZI</b>	18.35 ± 0.8	10 ± 0.6	15.65 ± 1.05	8.3 ± 0.6	8.3 ± 0.6	14.3 ± 0.6	–	–
<b>AqP+Ac1</b>	11.3 ± 1.2 (A)	7.5 ± 0.7 (A)	9.5 ± 0.7 (A)	–	–	–	7 ± 0.3 (A)	10 ± 0.5 (I)
<b>Moy des ZI</b>	11.15 ± 2.25	13.3 ± 0.6	12.65 ± 2.3	–	–	–	10 ± 1	10 ± 1
<b>AqP+Bu1</b>	12.5 ± 0.7 (A)	9.5 ± 1 (A)	13.5 ± 0.7 (S)	–	–	–	11.5 ± 0.7 (S)	–
<b>Moy des ZI</b>	15.1 ± 1	12 ± 1	10.3 ± 1	–	–	–	8.7 ± 0.6	–
<b>AqP+Aq1</b>	15.7 ± 1.5 (I)	15 ± 1 (S)	14.5 ± 0.7 (S)	–	–	–	8.5 ± 0.5 (I)	–
<b>Moy des ZI</b>	17.65 ± 2.25	12 ± 1	10.3 ± 0.6	–	–	–	8.7 ± 0.6	–
<b>AqP+AcF</b>	21 ± 1 (S)	12.5 ± 0.7 (I)	13.5 ± 0.7 (S)	–	–	–	10.5 ± 0.7 (I)	–
<b>Moy des ZI</b>	12.65 ± 1	12 ± 1	10.15 ± 0.6	–	–	–	8.7 ± 0.6	–
<b>AqP+AqF</b>	16.7 ± 1.5 (I)	7 ± 0.5 (A)	14.5 ± 0.7 (I)	–	–	–	9.5 ± 1 (I)	–
<b>Moy des ZI</b>	17.65 ± 1	12 ± 1	15.15 ± 1.25	–	–	–	8.7 ± 0.6	–

(S) : synergie. (A) : antagonisme. (I) : indifférence. **Moy des ZI** : moyenne des zones d'inhibition deux extraits

L'effet synergique le plus significatif a été obtenu en combinant la fraction acétate d'éthyle AcP de *Plantago major L.* et AcF de *Carthamus caeruleus L.* sur de *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* et *Bacillus cereus* avec des zones d'inhibition respectives  $26 \pm 1.4$ ,  $22.5 \pm 0.7$  et  $20.3 \pm 0.6$  mm (Annexe, figure 28), et ces dernières sont supérieures à celles des fractions testées isolément.

Il en est de même pour la combinaison des deux fractions : acétate d'éthyle (AcP) de *Plantago major L.* et fraction aqueuse (AqF) de *Carthamus caeruleus L.* D'autre part, en combinant la fraction AcP à chacune des fractions (Ac1, Bu1 et Aq1) issues des racines de *Carthamus caeruleus L.*, un effet synergique a été obtenu surtout sur *Proteus mirabilis*.

L'effet synergétique des extraits des deux plantes étudiées peut être dû la complémentarité entre les composés flavoniques des deux extraits, ou bien la formation de complexe entre les agents antibactériens contenus dans ces extraits, qui devient effective dans la destruction d'une espèce particuliers de micro-organismes probablement en agissant sur la paroi cellulaire ou en causant leur lyse, ou leur mort.

### **III.2.6- Synergie entre les extraits de *Carthamus caeruleus L.* et *Plantago major L.* et un antibiotique standard**

Des activités antibactériennes variables et significatives sont obtenues en combinant les extraits végétaux à l'antibiotique standard (gentamicine), les zones d'inhibition sont supérieures à celles de l'antibiotique testé seul (tableau XIV). Ce qui en accord avec les résultats d'Akinbobola (2014). Le meilleur effet synergique (40 mm) est obtenu vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*, en combinant la gentamicine avec la fraction acétate d'éthyle AcP de *Plantago major L.* Cette même combinaison présente un bon effet synergique sur *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*. Cette dernière

souche est aussi très sensible lorsqu'elle est testée en associant également l'antibiotique à chacune des fractions Aq1, AcF et AqF de *Carthamus caeruleus L.*, ou encore avec à la fraction AqP de *Plantago major L* (Annexe, figure 29). D'autres combinaisons réalisées avec la fraction Ac1, AcF ou bien AcP, sont très actives sur *Bacillus cereus*. L'effet synergique des extraits de plantes peut être exploité pour réduire la dose de l'antibiotique, et en minimiser les effets indésirables. Plusieurs travaux réalisés sur l'activité antimicrobienne des extraits de plantes combinés aux antibiotiques ont pu montrer une bonne synergie vis-à-vis des souches testées (Adwan *et al.*, 2009; Sanjeev Ranjan *et al.*, 2012; Akinbobola *et al.*, 2014).

**Tableau XIV.** Diamètre (mm) des zones d'inhibition des combinaisons des extraits de *Carthamus caeruleus L.* et *Plantago major L.* à un antibiotique standard

Souches bactériennes	Zone d'inhibition en mm							
	Gen	Gen +Ac1	Gen+Bu1	Gen+Aq1	Gen+AcF	Gen+AqF	Gen+AcP	Gen+AqP
<i>Staphylococcus aureus</i>	27 ± 00	–	–	32 ± 00 (S)	30 ± 00 (S)	36 ± 00 (S)	35 ± 00 (S)	32 ± 00 (S)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30 ± 00	–	–	–	–	32 ± 00 (I)	40 ± 00 (S)	–
<i>Acinetobacter baumannii</i>	23 ± 00	26 ± 00 (S)	23 ± 00 (I)	–	23 ± 00 (I)	22 ± 00 (I)	22 ± 00 (I)	23 ± 00 (I)
<i>Proteus mirabilis</i>	27 ± 00	–	–	–	–	–	32 ± 00 (S)	–
<i>Salmonella typhimurium</i>	31 ± 00	–	–	–	–	–	35 ± 00 (S)	–
<i>Bacillus cereus</i>	30 ± 00	32 ± 00 (S)	30 ± 00 (I)	–	32 ± 00 (S)	–	34 ± 00 (S)	–
<i>Enterococcus faecalis</i>	17 ± 00	16 ± 00 (I)	–	–	–	–	–	–
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20 ± 00	–	–	–	–	–	20 ± 00 (I)	–

(S) : synergie. (I) : indifférence

D'autre part, parmi toutes ces fractions Ac1, Bu1, Aq1, AcF, AqF, AcP et AqP, seule la fraction Ac1 était active sur *Acinetobacter baumannii*, les autres fractions ont reproduit des activités similaires à celles de l'antibiotique testé seul sur cette même souche : il y a indifférence. Il en est de même pour la fraction AcP qui était active sur *Proteus mirabilis* et

*Salmonella typhimurium*, mais inefficace vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae*. Ce qui est en contradiction avec les résultats trouvés par Hani Gouda et Elsayed Alsaied (2014), qui ont trouvé une synergie de plusieurs combinaisons d'extraits de plantes et d'antibiotiques sur les souches que nous avons testées.

A partir de ces données (tableau XIV), il apparaît que le diamètre de la zone d'inhibition augmente. La fraction la plus active est la fraction acétate d'éthyle AcP de *Plantago major L.* vis-à-vis de plusieurs souches bactériennes, suivie de la fraction Ac1 et AcF de *Carthamus caeruleus L.* Il existe probablement un ou plusieurs composés phénoliques actifs dans ces extraits qui ont un potentiel synergique intéressant.

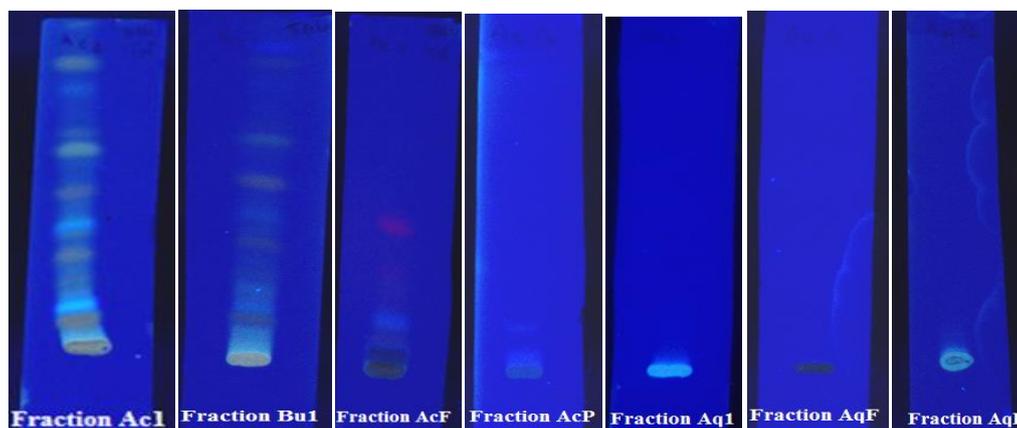
Cependant, les mécanismes par lesquels les composés phénoliques agissent en synergie avec les antibiotiques ne sont pas encore élucidés, mais on observe un effet positif et une augmentation de l'activité antibactérienne des composés flavoniques combinés aux antibiotiques. Ce qui suggérerait une complémentarité entre deux composés. Certains auteurs pensent qu'il s'agit d'un effet conjugué sur la perméabilité de la membrane cytoplasmique des germes, facilitant l'influx des antibiotiques (Zhao *et al.*, 2001; Shiota *et al.*, 2004 ; Sibanda, 2007) ; ou bien l'inhibition des  $\beta$ -lactamases (Kusuda *et al.*, 2006 ; Eumkeb *et al.*, 2010).

## **IV- Fragmentation et séparation des fractions acétate d'éthyle de *Carthamus caeruleus L.* et *Plantago major L.***

### **IV.1- Chromatographie sur couche mince**

Après les tests biologiques réalisés sur les différents extraits, nous avons effectué une étude analytique phytochimique par les méthodes chromatographiques classiques. Pour identifier les familles moléculaires présentes dans les différents extraits des deux plantes étudiées, nous avons procédé à un criblage phytochimique par différentes méthodes : chromatographie sur

couches minces et spectrophotométrie UV/visible. La chromatographie sur couches minces a permis de retenir les extraits acétate d'éthyle (Ac1) des racines et (AcF) feuilles de *Carthamus caeruleus L.*, et (AcP) des feuilles de *Plantago major L.*, qui sont riches en composés phénoliques (figure 30).



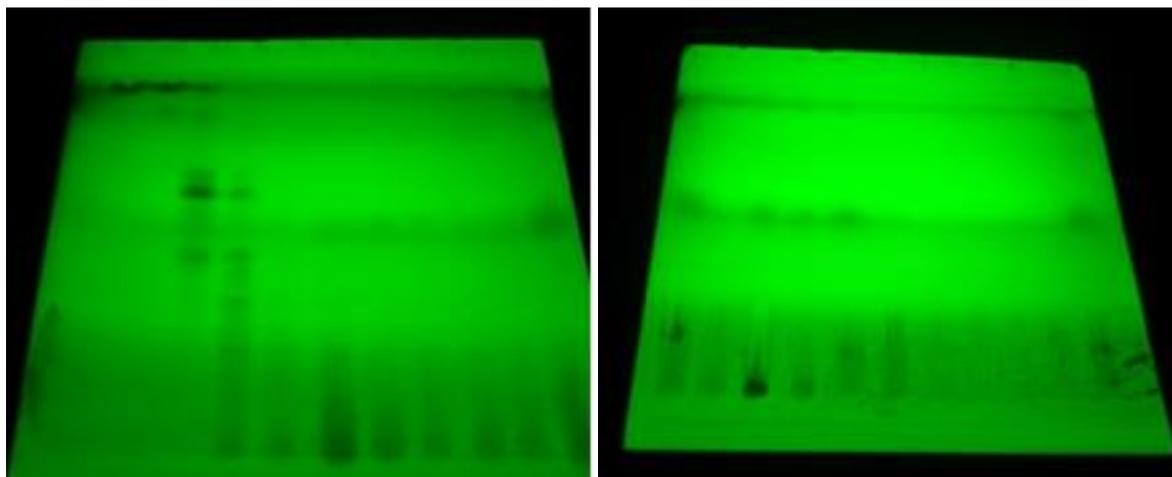
**Figure 30.** Chromatogrammes des différents extraits de *Carthamus caeruleus L.* et *Plantago major L.* dans le système Toluène/Acétone/Acide formique (6 :1 :1)

Tandis que les chromatogrammes des fractions aqueuses (Aq1, AqF et AqP) ont révélé la présence d'une seule tache. Cette analyse chromatographique a aussi révélé que la meilleure séparation des phytoconstituants des différents extraits a été obtenue avec le Système 1 : Toluène /Acétone/Acide formique (6 :1 :1). Ce dernier a été également utilisé pour vérifier la pureté des fractions issues du fractionnement des extraits.

#### **IV.2- Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction acétate d'éthyle Ac des racines de *Carthamus caeruleus L.***

Les composés de la fraction acétate d'éthyle Ac des racines des *Carthamus caeruleus L.* ont été soumis à une séparation un fractionnement sur une colonne de gel de silice préparée dans le toluène enrichi progressivement avec du méthanol. Ces composés sont ensuite évalués par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support en plastique (figure 31). Les

plaques sont visualisées sous lumière UV/visible (254 et 365 nm). Le résultat permet de dire que la première, la deuxième et la dernière fraction contiennent un seul produit, mais les autres fractions contiennent un mélange de composés. Les aliquotes de même composition sont rassemblés, donnant ainsi 9 fractions (Ac1 à Ac9). Parmi ces dernières, les fractions Ac1 et Ac9 correspondent à des produits purs.

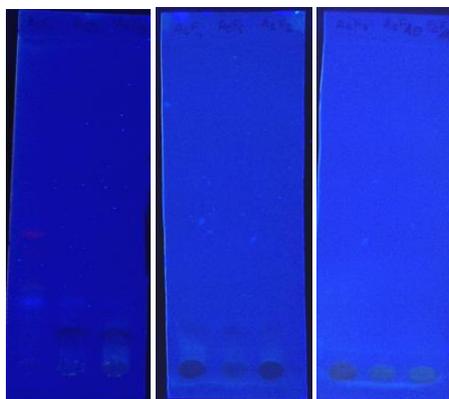


**Figure 31.** Profil chromatographique des fractions de l'extrait acétate d'éthyle (Ac1) des racines de *Carthamus caeruleus L.*

#### **IV.3- Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction acétate d'éthyle AcF des feuilles de *Carthamus caeruleus L.***

L'extrait acétate d'éthyle AcF des feuilles de *Carthamus caeruleus L.* a subi le même traitement que les extraits racinaires. Le suivi de la composition des fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support en aluminium dans le système de solvant : Toluène /Acétone/Acide formique (6 :1 :1). Les plaques sont visualisées sous lumière UV visible (254 et 365 nm). 15 fractions (AcF1 à AcF15) ont été collectées parmi lesquelles les six premières contiennent deux produits, alors que les autres n'en contiennent qu'un seul (figure 32). Pour s'assurer que ces dernières correspondent à des molécules pures,

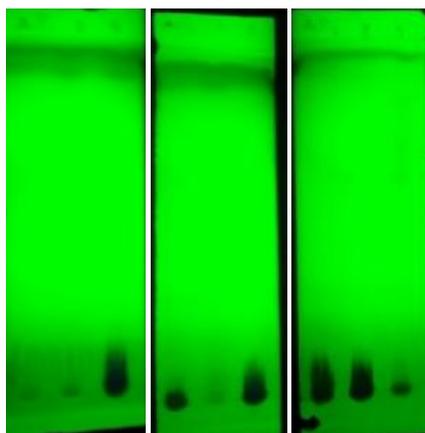
nous envisageons de les soumettre à d'autres systèmes de solvants et d'autres méthodes analytiques.



**Figure 32.** Profil Chromatographique des fractions de l'extrait acétate d'éthyle (AcF) des feuilles de *Carthamus caeruleus L.*

#### **IV.4- Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction acétate d'éthyle AcP des feuilles de *Plantago major L.***

Le même protocole a été appliqué pour la fraction acétate d'éthyle des feuilles de *Plantago major L.* L'élution a été faite par du toluène avec un gradient de méthanol. Cette fraction renferme peu de composés (AcP1 à AcP12) (figure 33). Un seul produit est pur (AcP9).



**Figure 33.** Profil Chromatographique des fractions de l'extrait acétate d'éthyle (AcP) des feuilles de *Plantago major L.*

#### IV.5- Corrélation entre l'activité antibactérienne des fractions isolées

Les composés flavoniques isolés des fractions acétate d'éthyle Ac et AcF des racines et feuilles de *Carthamus caeruleus L.* et AcP de *Plantago major L.* ont été testés sur plusieurs souches pour évaluer leur activité antibactérienne, et les résultats sont représentés dans le tableau XV. Parmi les fractions issues des racines, la fraction Ac9 correspondant à un produit probablement pur, se comporte en bon principe antimicrobien à large spectre, elle agit avec efficacité sur plusieurs souches bactériennes, les zones d'inhibitions variant de 21 à 27 mm (Annexe, figure 34) qui se rapprochent des effets de l'antibiotique standard. La fraction Ac5 qui montre plusieurs bandes, prouve d'un mélange de produits, présente une bonne activité de  $19 \pm 1.4$  et  $20 \pm 1$  mm vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*.

**Tableau XV.** Diamètre (mm) des zones d'inhibition de quelques fractions des extraits des deux plantes

Fractions	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Ac1	$11.5 \pm 0.7$		$10 \pm 1$	$12.5 \pm 0.7$				
Ac5			$19 \pm 1.4$	$20 \pm 1$				
Ac9	$25 \pm 1.8$	$28.5 \pm 2.1$	$25.5 \pm 0.7$	$21.5 \pm 0.7$	$21.5 \pm 0.7$		$23.5 \pm 1.1$	$23.5 \pm 1.3$
AcF1	$14.5 \pm 0.7$	$12 \pm 1$	$11.5 \pm 0.7$	$20 \pm 1$				
AcF7			$11.5 \pm 0.7$	$14.5 \pm 1$		$13 \pm 0.6$		
AcP8	$20.5 \pm 0.7$	$14 \pm 1.4$	$24 \pm 1.4$	$22 \pm 1.8$		$12.5 \pm 0.7$		$16 \pm 1.4$

La fraction AcP8, un produit « pur », provenant de l'extrait AcP des feuilles de *Plantago major L.* a également un potentiel antibactérien très significatif. Les souches qui sont très sensibles à ce composé sont *Staphylococcus aureus* ( $20.5 \pm 0.7$  mm), *Pseudomonas aeruginosa* ( $24 \pm 1.4$  mm) et *Acinetobacter baumannii* ( $22 \pm 1.8$  mm). Les fractions AcF1 et AcF7 des feuilles de *Carthamus caeruleus L.* sont actives sur plusieurs souches.

Par conséquent, il est clair que les produits obtenus après cette première purification ont une meilleure activité que celle observée dans les extraits bruts.

#### IV.6- Identification partielle des composés purifiés

Par la suite, nous avons procédé à une première identification basée sur les caractéristiques chromatographiques et spectrales. La fluorescence noire-violette sous la lumière UV-Visible des composés purs isolés des deux plantes oriente vers une structure d'une flavone ou un flavonol substitué en position 3. La valeur de la longueur d'onde de la bande I dans le méthanol, inférieur à 350 nm (tableau XVI), permet de déduire des structures de type flavone.

**Tableau XVI.** Caractéristiques chromatographiques et spectrophotométriques des composés purs

Composé	Fluorescence	Rf	Spectre MeOH	
			Bande II	Bande I
Ac1	noire-violette	0.80	242	313
Ac9	noire-violette	0	280	332
AcF7	noire-violette	0	284	330
AcP8	noire-violette	0.82	234	332

Ainsi, le comportement chromatographique des composés Ac1 et AcP8, permet d'envisager des structure de type aglycone, étant donné que leur Rf est très élevé dans le système organique utilisé. Par contre, les composés Ac9 et AcF7 sont des hétérosides puisque leur Rf est nul.

## Discussion Générale

A la suite d'enquêtes ethnobotaniques auprès de tradipraticiens et herboristes de la région de Sétif, notre choix a porté sur deux plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle : *Carthamus caeruleus L.* et *Plantago major L.* Nous avons opté pour ces deux plantes du fait de leur utilisation dans le traitement d'affections cutanées et la similitude de leurs effets thérapeutiques, alors que pour *Carthamus* ce sont les racines (rhizomes) qui fournissent le principe actif, chez *Plantago* ce sont les feuilles qui sont employées.

Notre travail concernait l'étude des activités antioxydante, antibactériennes et antifongiques des extraits préparés à partir de racines et feuilles pour la première plante, et des extraits de feuilles pour la seconde en référence à leur utilisation en pharmacologie traditionnelle. Les extraits hydro-méthanoliques issus de chaque plante ont été d'abord soumis à un fractionnement avec des solvants de polarité différente, qui a fourni des extraits organiques et aqueux.

Certains de nos extraits ont montré un pouvoir antioxydant vérifié à l'aide de trois méthodes différentes : le piégeage du radical DPPH, l'inhibition de l'oxydation de l'acide oléique et le  $\beta$ -carotène et la chélation des métaux lourds comme le fer.

Notre recherche suggère la forte potentialité d'activité antimicrobienne dans les produits naturels. Cette action est mise en évidence par les différents tests microbiologiques comme la CMI, la CMB et les tests de synergie. Nos résultats ont confirmé l'existence dans la majorité des extraits méthanoliques bruts et des fractions purifiées, l'existence d'un potentiel anti-infectieux important en particulier sur les souches bactériennes responsables d'infections cutanées. Ce qui valide l'utilisation de ces plantes en médecine traditionnelles en application dermique.

L'effet antifongique notable associé à l'activité antibactérienne de nos composés flavoniques pourraient être exploités en complément des détergents.

La séparation des composés flavoniques des extraits bruts, en molécules pur ou contenant des mélanges de deux à trois produits a permis de mettre en évidence une action antibactérienne plus marquée que celles des extraits.

Nos résultats sont cohérents avec les travaux portant sur l'évaluation des activités biologiques des flavonoïdes puisque certains d'entre eux ont montré précédemment une forte activité antibactérienne probablement en inhibant le fonctionnement d'enzymes impliquées dans la réplication du pathogène, puisque pour la majorité de nos extraits l'effet est bactéricide

## Conclusion et perspectives

### Conclusion

➤ Les bactéries, les champignons et les radicaux libres sont à l'origine de réels problèmes de santé publique à cause de leur implication dans de nombreuses maladies. Beaucoup de travaux de recherches ont été réalisés pour la découverte d'antioxydants et d'agents antimicrobiens naturels à partir de plantes médicinales qui représentent un réservoir de molécules bioactives encore peu exploré.

C'est dans ce contexte que l'étude que nous avons entreprise a été menée sur deux plantes utilisées en pharmacopée traditionnelle dans la région de Sétif au nord-est de l'Algérie : *Carthamus caeruleus L.* et *Plantago major L.* qui sont réputées pour leurs capacités à cicatriser les brûlures et les plaies, pour leurs pouvoirs anti-infectieux et anti-inflammatoire.

➤ Nos plantes sont riches en substances flavoniques potentiellement intéressantes pour leurs propriétés biologiques. Ces activités importantes mais variables sont en relation avec la composition structurale des différents constituants qu'ils contiennent.

➤ Quantitativement et qualitativement, les feuilles de *Carthamus caeruleus L.* et *Plantago major L.* constituent une source substantielle d'antioxydants.

➤ Notre recherche suggère la forte potentialité d'activité antimicrobienne dans les produits naturels. Les résultats obtenus ont montré des activités positives variables à l'encontre de nombreuses souches bactériennes.

➤ En ce qui concerne l'effet antifongiques de nos extraits, seul *Carthamus caeruleus L.* a révélé un effet positif *Candida albicans* et *Aschochyta rabiei*.

➤ L'association de l'antibiotique et les extraits a donné un effet synergique. Ceci pourrait être exploité pour augmenter l'activité antibactérienne de l'antibiotique.

➤ Notre étude phytochimique nous a permis de trouver les quatre principaux composés actifs de type flavone, ayant une activité antimicrobienne. Le principe antibactérien de ces molécules est supérieur aux résultats observés avec les mélanges.

➤ Le mode d'action de ces composés reste encore à déterminer.

En conséquence : les deux plantes étudiées ont un potentiel antioxydant et antibactérien très importants et pourraient être exploitées comme une source d'agents antibactériens et antioxydants naturels pour traiter les maladies infectieuses et autres pathologies liées au stress oxydant

### **Perspectives**

➤ Du fait que les deux plantes étudiées ont un potentiel antioxydant et antibactérien très importants. Il nous importe actuellement de compléter notre étude phytochimique sur l'ensemble des composés isolés.

➤ L'étude des activités biologiques *in vitro* constitue un point de départ essentiel pour entreprendre des études *in vivo* sur modèle animal.

➤ Les travaux sur les composés isolés doivent se poursuivre afin de révéler leur mécanisme d'action.

➤ Actuellement un des problèmes de santé publique est représenté par les virus pour lesquels il n'existe ni traitement, ni vaccin, il serait intéressant d'explorer les activités antivirales des produits purs ayant montré un effet antibactérien.

➤ La recherche d'autres principes actifs est envisageable, les deux plantes sont toujours très utilisées et parfois remplacent les médicaments dans beaucoup de régions de Sétif.

➤ Du point de vue phytochimique, nous prévoyons de poursuivre nos expérimentations en vue de réaliser la purification des composés bioactifs et leur identification par les méthodes physiques puis de poursuivre l'investigation de leur activité biologique propre.

## Références bibliographiques

- Amic D., Davidovic-Amic D., Beslo D. and Trinajstic N. 2003.** Structure radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica ACTA*, **76**(1): 55–61.
- Adwan G. and Mhanna M. 2009.** Synergistic effects of plant extracts and antibiotics on *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical specimens. *Asian pacific Journal of Tropical Medicine*, **2**(3): 46–51.
- Agrawal S., Kulkarni G.T. and Sharma V.N. 2011.** A comparative study of the antioxidant activity of methanolic extracts of *Terminalia paniculata* and *Madhuca longifolia*. *Free Radical Antioxidant*, **1**: 62–68.
- Akinbobola A.B. and Dada E.O. 2014.** *In-vitro* evaluation of the synergistic antimicrobial activities of *Zingiber officinale* (Rosc) and *Tridaxprocumbens* (Linn) against selected pathogenic bacteria. *Journal of Medicinal Plant and Herbal Therapy Research*, **2**: 16–22.
- Ames B.N., Gold L.S. and Willett W.C. 1995.** The causes and prevention of cancer. *Proceedings of National Academy of Sciences*, **92**: 5258–5265.
- Bacon J.D., Mabry T.J. and Mears J.A. 1976.** UV spectral procedure for distinguishing free and substituted 7-hydroxyl groups in flavones and flavonols. *Revue Latioam Quim*, **7**: 83–86.
- Bahorun T., Grinier B., Trotin F., Brunet G., Pin T., Luncky M., Vasseur J., Cazin M., Cazin C. and Pinkas M. 1996.** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, **46**(11): 1086–1089.
- Beal M.F. 1995.** Aging, energy and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annals of Neurology*, **38**: 357–366.
- Beaudeau J.L. and Vasson M.P. 2005.** Sources cellulaires des espèces réactives de l’oxygène. *In: Delattre JB, Bonnefont-Rousselot D, Ed. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques.* Paris : Lavoisier; 45–86.
- Belkhiri F. 2009.** Activité antimicrobienne et antioxydante de *Thamus communis* et *Carthamus caeruleus*. Thèse de Magister. Département de Biochimie. Université Ferhat Abbas, Sétif 1.
- Benavente-Garcia O., Castillo J., Marin F.R., Ortuno A. and Del Rio J.A. 1997.** Uses and properties of Citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**: 4505–4515.
- Berche P., Gaillard J.L. and Simonet M. 1991.** Les bactéries des infections humaines. Editeur Flammarion, Médecine et Sciences, 660 p.
- Biyiti L.F., Meko'o D.J.L., Tamzc V. and Amvam Z.P.H. 2004.** Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales camerounaises. *Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaine*, **13**: 11–20.

- Blast A., Haenen G. and Doelman C. 1991.** Oxidants and antioxidants: State of the Art. American Journal of Medicine, **91**(supplement 3c): 2S–13S.
- Bobba S., Ponnaluri V.K., Mukherji M. and Gutheil W.G. 2011.** Microtiter Plate-Based Assay for Inhibitors of Penicillin-Binding Protein 2a from Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **55**(6): 2783–2790.
- Boersma P.D., Kareiva P., Fagan W.F., Clark J.A. and Hoekstra J.M. 2001.** How good are endangered species recovery plans? BioScience, **51**: 643–649.
- Borneo R., Leon C.A., Aguirre A., Ribotta P. and Canterro J.J. 2008.** Antioxydant capacity of medicinal plant from province of Cordoba (Argentina) and there in vitro testing antimicrobial and antiproliferative activities of *Melissa officinalis* extracts. Journal of Medicinal Food, **11**: 133–143.
- Botta B., Menendez P., Zappia G., Lima R.A.D., Torge R. and Monache G.D. 2009.** Prenylated isoflavonoids: botanical distribution, structures, biological activities and biotechnological studies. An update (1995-2006). Current Medicinal Chemistry, **16**: 3414–3468.
- Boizot N. et Charpentier J-P. 2006.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Cahier des Techniques de INRA, Numéro spécial: 79–82.
- Bougandoura N., et Bendimerad N. 2013.** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. Nepeta (L.). Revue « Nature & Technologie». B. Sciences agronomiques et biologiques, **9**: 14–19.
- Boumerfeg S. 2010.** Antioxydative properties of *Tamus communis l.*, *Carthamus caeruleus l.* and *Ajuga iva l.* extracts. Thèse de Doctorat. Département de Biochimie. Université Ferhat Abbas, Sétif 1.
- Bowles V.G., Mayerhofer R., Davis C., Good A.G. and Hall J.C. 2010.** A phylogenetic investigation of *Carthamus* combining sequence and microsatellite data. Plant Systematics and Evolution, **287**: 85–97.
- Bruneton J. 2009.** Pharmacognosie-Phytochimie, plantes médicinales. 4ème édition. Paris: Edition Tec & Doc. Edition médicales internationales 1292 p.
- Cadenas E. and Davies K.J. 2000.** Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free Radical Biology and Medicine, **29**(3-4): 222–230.
- Carbomelle B., Denis F., Mannonier A., Pinon G. et Vague R. 1987.** Bactériologie médicale: Techniques usuelles, SIIVIPR (éd), Paris: 228–282.
- Castaneda-ovando A., Pacheco-Hernández M.L., Elena Páez-Hernández M.E., Rodríguez J.A., Carlos Andrés Galán-Vida C.A. 2009.** Chemical studies of anthocyanins: a review. Food Chemistry, **113**(4): 859–871.
- Chanda S., Rakholiya K., Dholakia K. and Baravalia Y. 2013.** Antimicrobial, antioxidant, and synergistic properties of two nutraceutical plants: *Terminalia catappa L* and *Colocasia esculenta L*. Turkish Journal of Biology, **37**: 81–91.

- Chang-Ho J., Young-II B., Ki-Hwan S. and Jine-shang C. 2004.** DPPH radical scavenging effect and antimicrobial activities of plantain (*Plantago asiatica L.*) extracts. J. Korean Society of Food Science and Nutrition, **33**(10): 1601–1605.
- Chen Y.H., Yang Z.S., Wen C.C., Chang Y.S., Wang B.C., Hsiao C.A. and Shih T.L. 2012.** Evaluation of the structure-activity relationship of flavonoids as antioxidants and toxicants of zebrafish larvae. Food chemistry, **134**(2): 717–724.
- Chugh S.N., Kakkar R., Kalra S. and Sharma A. 1999.** An evaluation of oxidative stress in diabetes mellitus during uncontrolled and controlled state and after vitamin E supplementation. Journal of the Association of Physicians of India, **47**(4): 380–383.
- Cillard J. and Cillard P. 2006.** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des antioxydations. Oléagineux-Corps Gras- Lipides, **13**: 24–29.
- Conforti F., Silvio S., Mariangela M., Federica M., Giancarlo A.S., Dimitar U., Aurelia T., Francesco M. and Roberto D.L. 2008.** *In vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. Journal of Ethnopharmacology, **116**: 144–151.
- Conway G.A and Slocumb J.C. 1979.** Plants used as abortifacients and emmenagogues by Spanish New Mexicans. Journal of Ethnopharmacology, **1**(3): 241–261.
- Courvalin P. 2008.** Bacterial antibiotic resistance: combinations of biochemical and genetic mechanisms. Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France, Tome **161**(1): 76–12.
- Cushnie T.P.T. and Lamb A.J. 2005a.** Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents, **26**: 343–356.
- Cushnie T.P.T., Lamb and A.J. 2005b.** Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. Journal of Ethnopharmacology, **101**: 243–248.
- Delattre J., Beaudoux J.L. and Bonnefont-Rousselot. 2005.** Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales, Paris, 1–405.
- De Medina F., Sanchez F., Posadas O., Lopez R., Romero-Calvo C., Mascaraque G., Daddaoua A., Perez R., Gonzalez Herrera M.M., Gonzalez G.H., Martinez-Plata E., Ortega M., Suarez Zarzuelo A. and Martinez-Augustin O. 2009.** The intestinal anti-inflammatory activity of the flavonoid rutin requires oral administration and may involve effects on mucosal lymphocytes. Clinical Nutrition Supplements: 49.
- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A. and Capasso F. 1999.** Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Science, **65**(4): 337–353.
- Divya N., Thenmozhi S., Sureshkumar B.T. and Selvan M. 2014.** Antibacterial activity of medicinal plant against wound infected pathogens. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, **5**(11): 4942–4947.
- Dixon R.A and Steele C.L. 1999.** Flavonoids and isoflavonoids- a gold mine for metabolic engineering. Trends in Plant Science, **4**: 394–400.
- Duchnowicz P., Broncel M., Podśędek A. and Koter-Michalak M. 2012.** Hypolipidemic and antioxidant effects of hydroxycinnamic acids, quercetin, and cyanidin 3-glucoside

- in hypercholesterolemic erythrocytes (*in vitro* study). *European Journal of Nutrition*, **51**: 435–43.
- ElGharras H. 2009.** Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *International Journal of Food Science and Technology*, **44**(12): 2512–2518.
- Engelman M.D., Hutchenson R. and Cheng I.F. 2005.** Stability of ferric complexes with 3-Hydroxyflavone (flavonol), 5,7-Dihydroxyflavone (Chrysin) and 3',4'-Dihydroxyflavone. *Journal of agricultural and food chemistry*, **53**: 2953–2950.
- Eumkeb G., Sakdarat S. and Siriwong S. 2010.** Reversing  $\beta$ -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. *Phytomedicine*, **18**: 40–45.
- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. and Abdelly C. 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs and their biological activities. *Compte Rendu de Biologie*, **331**: 372–379.
- Favier A. 1997.** Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Annales de Biologie Clinique*, **55**(1): 9–16.
- Favier A. 2003.** Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, **17**: 501–512.
- Ferrali M., Signorini C., Caciotti B., Sugherini L., Ciccoli L., Giachetti D. and Comporti M. 1997.** Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavanoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters*, **416**: 123–132.
- Figen M.T. 2002.** Phytoalexins: Defence or just a response to stress. *Journal of Cell and Molecular Biology*, **1**: 1–6.
- Flávia M. da Silva, Natalia L. P. Iorio, Leandro A. Lobo, Kátia Regina N. dos Santos, Adriana F., Lucianne C. Maia and Andréa G.A. 2014.** Antibacterial Effect of aqueous extracts and bioactive chemical compounds of *Coffea canephora* against microorganisms involved in dental caries and periodontal. *Disease Advances in Microbiology*, **4**: 978–985
- Fowler Z.L. and Koffas M.A.G. 2009.** Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **83**: 799–808.
- Galleano M., Calabro V., Prince P.D., Litterio M.C., Piotrkowski B., Vazquez-Prieto M.A., Miatello R.M., Oteiza and Fraga P.I. 2012.** Flavonoids and metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1259**: 87–94.
- Gardès-Albert M. and Jore D. 2005.** Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène. In : Delattre JB, Bonnefont-Rousselot D, Ed. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Paris : Lavoisier. 1–23.

- Gilgun-Sherki Y., Melamed E. and Offen D. 2004.** The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. *Journal of Neurology*, **251**: 261–268.
- Gurib-Fakim A., Sewrey M., Gueho J. and Dulloo E. 1993.** Medical ethnobotany of some weeds of Mauritius and Rodriguez. *Journal of Ethnopharmacology*, **39**: 175–185.
- González-Gallego J., Sánchez-Campos S. and Tuñón M. J. 2007.** Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutricion hospitalaria*, **22**(3): 287–293.
- Gonzalez-Paramas A.M., Santos-Buelga C., Duenas M. and Gonzalez-Manzano S. 2011.** Analysis of flavonoids in foods and biological samples. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **11**: 1239–55.
- Gradisar H., Pristovsek P., Plaper A. and Jerala R. 2007.** Green tea catechins inhibit bacterial DNA gyrase by interaction with its ATP binding site. *Journal of Medicinal Chemistry*, **50**: 264–71.
- Halbwirth H. 2010.** The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, **11**: 595–621.
- Halliwel B. 1994.** Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*, **52**: 253–265.
- Halliwel B. 1990.** How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communication*, **13**: 1–32.
- Hani Gouda A. and Elsayed Alsaied M.H. 2014.** *In vitro* antibacterial and synergistic effects of some plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobials, Photon*, **129**: 338–346.
- Harborne J.B. and Smith D.M. 1978.** Correlation between anthocyanins chemistry and pollinisation ecology in the *Polemoniaceae*. *Biochemistry Systematic and Ecology*, **6**: 127–130.
- Harborne J.B. and Williams C.A. 2000.** Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry*, **55**: 481–504.
- Hare J.M. 2004.** Nitroso-redox balance in the cardiovascular system. *New England Journal of Medicine*, **351**: 2112–2114.
- Hernández I., Alegre L., Van Breusegem F. and Munné-Bosch S. 2009.** Trends in Plant Science, **14** (3), 125–132.
- INRA. 2006.** Deuxième rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques. [www.fao.org/docrep/013/i1500e/Algeria.pdf](http://www.fao.org/docrep/013/i1500e/Algeria.pdf). Consulté en 2013.
- Iwashina T. 2000.** The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, **113**: 287–299.
- Iwu M.W., Duncan A.R. and Okunji C.O. 1999.** New antimicrobials of plant origin, in: perspectives on new crops and new uses, Jannick (Ed), ASHS Press, Alexandria, VA.
- Izzo A.A. 1996.** PAF and the digestive tract. A review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **48**(11): 1103-1111.

- Jeandet P., Hébrard C., Deville M.A., Cordelier S., Dorey S., Aziz A. and Crouzet J. 2014.** Deciphering the Role of Phytoalexins in Plant-Microorganism Interactions and Human Health. *Molecules*, **19**(11): 18033-18056.
- Jimenez-Gonzalez L., Alvarez-Corral M., Munoz-Dorado M. and Rodriguez-Garcia I. 2008.** Pterocarpan: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochemistry Reviews*, **7**: 125-154.
- Jurd L. and Geissman T.A. 1956.** Absorption spectra of metal complexes of flavonoids compounds. *Journal of Organic Chemistry*, **21**(12): 1395–1401.
- Kartal N., Sokmen M., Tepe B., Daferera D., Polissiouc M. and Sokmen A. 2007.** Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis L.* using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, **100**: 584–589.
- Kesatebrhan H.A.. 2013.** Antimicrobial activity and phytochemical screening of crude extracts of medicinal plants grown in eastern Ethiopia. *International Journal of Pharmacological and Biological Sciences*, **4**(4): 326– 333.
- Khan M.T.H., Ather A., Thompson K.D. and Gambari R. 2005.** Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. *Antiviral Research*, **67**:107–119.
- Knasmüller S., Nersesyan A., Mišik M., Gerner C., Mikulits W., Ehrlich V., Hoelzl C., Szakmary A. and Wagner K.H. 2008.** Use of conventional and -omics based methods for health claims of dietary antioxidants: a critical overview. *British Journal of Nutrition*, **99**: ES3–ES52.
- Kundu J.K. and Surh Y. (2008).** Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. *Cancer Letters*, **269**(2): 243– 261.
- Kusuda M., Inada K., Ogawa T.O., Yoshida T., Shiota S., Tsuchiya T., Tsuchiya T and Hatano T. . 2006.** Polyphenolic constituent structures of *Zanthoxylum piperitum* fruit and the antibacterial, effects of its polymeric procyanidin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **70**: 1423–31.
- Laviano A., Meguid M.M., Preziosa I. and Rossi Fanelli F. 2007.** Oxidative stress and wasting in cancer. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, **10**: 449–456.
- Le K., Chiu F. and Ng K. 2007.** Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, **105**: 353–363.
- Leopoldini M., Russo N. and Toscano M. 2011.** The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, **125**(2): 288–306.
- Lewis G. A., Mathieu D. and Phan-Tan-Luu R. 1999.** *Pharmaceutical Experimental Design*. Marcel Dekker, New York.
- Linderschmidt R., Trylka A., Goad M. and witschi H. 1986.** The effects of dietary butylated hydroxytoluene on liver and colon tumor development in mice. *Toxicology*, **38**, 151–160.
- Lithander A. 1992.** Intracellular fluid of way bread (*Plantago major*) as a prophylactic for mammary cancer in mice. *Tumor Biology*, **13**: 138–141.
- Liu H., Zhang L. and Lu S. 2012.** Evaluation of antioxidant and immunity activities of

- quercetin in isoproterenol-treated rats. *Molecules*, **17**: 4281–4291.
- Livermore D.M.** 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases*, **34**(5): 634–640
- Liyana-Pathirana C.M. and Shahidi F.** 2006. Antioxidant properties 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.
- Mabry T.J, Markham K.R. and Thomas M.B.** 1970. The systematic identification of flavonoids. Edition Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-Newyork, 250.
- Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C.** 2005. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques, 192 pages.
- Maisarah A.M., Nurul Amira B., Asmah R. and Fauziah O.** 2013. Antioxidant analysis of different parts of *Carica papaya*. *International Food Research Journal*, **20**(3): 1043–1048.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C. and Jimenez L.** 2004. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, **79**(5): 727–747.
- Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E. and Kefalas P.** 2005. Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*, **89**: 411–420.
- Markham K.R.** 1982. Techniques of flavonoids identification. Edition Academic Press, London.
- Markov M.** 1992. On the pharmacology of *Plantago major*. Poster 6 at the 2nd International Congress on Ethnopharmacology, Uppsala, Sweden. July 2-4, 1292 (Swedish Academy of pharmaceutical Sciences).
- Marmonier A.** 1990. Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. *Bactériologie Médicale, technique usuelles*, 227–236.
- Martinez J.L. and Rojo F.** 2011. Metabolic regulation of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology reviews*, **35**: 768–789.
- Martone P., Estevez, J., Lu F., Ruel K., Denny M., Somerville C., Ralph J.** 2009. Discovery of Lignin. *Current biology*, **19**(2): 169–75.
- Marwan K.Q., Nezek S.K. and Arshad M.A.** 2013. Antibacterial activity of some plant extracts against clinical pathogen. *International Journal of Microbiology and Immunology Research*, **1**(5): 53–56.
- Masella R., Di Benedetto R., Vari R., Filesi C. and Giovannini C.** 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **16**: 577–586.
- Matev M., Angelova I., Koichev A., Leseva M. and Stefanov G.** 1982. Clinical trial of a *Plantago major* preparation in the treatment of chronic bronchitis. *Vutr Boles*, **21**(2): 133–137.

- Matsuo M., Sasaki N., Saga K. and Kaneko T. 2005.** Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biological and pharmaceutical bulletin*, **28**(2): 253–262.
- Mehni A.M. and Shahdadi F. 2014.** Phenolic compounds and antiradical properties of methanolic extracts of *Citrullus colocynthis* and *Plantago major* in Iran. *International Journal of Bioscience*, **4**(3): 224–228.
- Metiner K., Özkan O. and Seyyal A.K. 2012.** Antibacterial effects of ethanol and acetone Extract of *Plantago major L.* on Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **18**(3): 503–505.
- Mladinka P., Zatloukalova L., Filipisky T. and Hrdina R. 2010.** Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*, **49**: 963–975.
- Molina-Salinas G.M., Perez-Lopez A., Becerril-Montes P., Salazar-Aranda R., Said-Fernandez S. and de Torres N.W. 2007.** Evaluation of the flora of northern Mexico for in vitro antimicrobial and anti-tuberculosis activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **109**(3): 435–441.
- Molyneux P. 2004.** The use of the stable free radical diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH), for estimating antioxidant activity. *Songklanakarın Journal of Science and Technology*, **26**(2): 211–219.
- Morel S. 2011.** Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae). Thèse de doctorat, Université d'Angers, France.
- Morelle J. et Israel L. 2003.** L'oxydation des aliment et la santé. Edition Impression Librairie F-X. de Guilbert. 257.
- Motamadi H., Drabpour E., Gholipour M. and Seyyed Nejad S.M. 2010.** The antibacterial effect of ethanolic and methanolic extracts of *Plantago ovata* and *Oliveria decumbens* endemic in Iran against some pathogenic bacteria. *International journal of pharmacology*, **6**(2): 117–122.
- Nauciel C. and Vildé J.L. 2009.** Bactériologie Médicale. 2ème édition MASSON.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 1997.** Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility test, VI<sup>th</sup> ed. Wayne, PA: Approved Standard, M2–A6.
- Newman D.J. and Cragg G. M. 2007.** Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products*, **70**: 461–477.
- Noor H., Juing M., Chee B.J., Kuehb L. and Zolkepli O. 2000.** Medicinal Properties of *Plantago major*: hypoglycemic and male fertility studies. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, **23**(1): 29–35.
- Ozben T. 2007.** Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **96**: 2181–2196.
- Özge K. 2011.** Investigation of antioxidant and antimicrobial effects of *Plantago major* leaves. Thesis of Master of Science. Department of Biochemistry, Middle East Technical University, Turkey.
- Pagès J.M. 2004.** Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques. *Médecine Sciences*

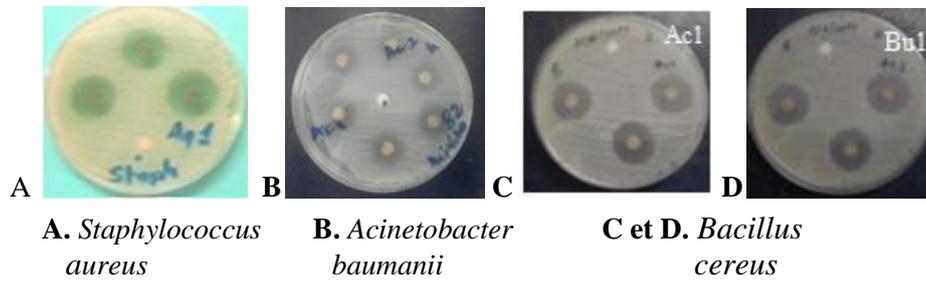
- (Paris), **20**(3): 346-351.
- Palmer H.J. and Paulson K.E. 1997.** Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutrient Reviews*, **55**: 353-361.
- Parage C. 2013.** Génomique de la biosynthèse des stilbènes chez la vigne (*Vitis vinifera*). Thèse de Doctorat, Université de Strasbourg, France.
- Park H.H., Lee S., Son H.Y., Park S.B., Choi E.J., Singh T.S., Ha J.H., Lee M.G., Kim J.E., Hyun M.C., Kwon T.K., Kim Y.H. and Kim S.H. 2008.** Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Archives of pharmacal research*, **31**(10):1303-11.
- Peggy E Pollak, Thomas V, Yinyuan M. and Loveline P.T. 1993.** Chalcone synthase and flavonol accumulation in stigmas and anthers of *Petunia hybrida*. *Plant Physiology*, **102**: 925–932.
- Pietta P.G. 2000.** Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, **63**:1035–1042.
- Pitout J.D.D., Hanson N.D., Church D.L. and Laupland K.B. 2004.** Population-based laboratory surveillance for *Escherichia coli* -producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: The importance of community isolates with blaCTX-M genes. *Clinical Infectious Diseases*, **38**:1736–1741.
- Pretorius C.J. and Watt E. 2001.** Purification and identification of active components of *Carpobrotus edulis* L *Journal of Ethnopharmacology*, **76**: 87–91.
- Prior R.L., Wu X., Chaish K. 2005.** Standardized Methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **53**: 4290–4302.
- Ramadan M. and Safwat N. 2009.** Antihelicobacter Activity of Flavonoid Compound isolated from *Desmostachya bipinnata*. *Australian Journal Basic and Applied Sciences*. **3**, 2270–2277.
- Ramzi A.A.M., Salah A.A.A., Sidgi H., Faisal M.N.A., Sama A.Z.A. and Ulrike L. 2010.** Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities and phytochemical Screening of Some Yemeni Medicinal Plants. *Evidence Complementary and Alternative Medecine*, **7**(3): 323–330.
- Rebecca N., John D.K., Deo O. and John K. 2011.** Antibacterial activity and phytochemical screening of eleven plants used as poultry ethnomedicines in Southern Uganda. *Agricultural journal*, **6**(6): 303–309.
- Renaud J. and Martinoli M.G. 2011.** Propriétés neuroprotectrices, antioxydantes et anti-inflammatoires du resvératrol dans les neurones dopaminergiques. *Médecine Sciences Amérique*, **1**(1): 1–14.
- Ribéreau-Gayon P. 1968.** Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod Paris, 254 p.
- Rice-Evans C., Nicholas M. and George P. 1997.** Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Science*, **2**(4): 152–159.

- Rios J.L. and Recio M.C. 2005.** Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **100**(1-2): 80–84.
- Roussel A.M., Nève J. and Hininger I. 2005.** Antioxydants et nutrition. In: Delattre JB, Bonnefont-Rousselot D, ED. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Paris: Lavoisier; 261–80.
- Ross J.A. and Kasum C.M. 2002.** Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, **22**: 19–34.
- Samuelsen AB. 2000.** The traditional uses chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. *Journal of Ethnopharmacology*, **71**: 1–21.
- Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A. and Saura-Calixto F. 1998.** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **76**: 270–276.
- Sanjeev R., Bhavya K, Muntaj Sk., Glory B. and Rajesh M. 2012.** Synergistic effect of some medicinal plants and antibiotics against few pathogenic bacteria. *International Journal of Biological and Pharmaceutical Research*, **3**(8): 1000–1004.
- Schmelzer E., Jahnen W. and Halbrock K. 1988.** *In situ* localization of high-induced chalcone synthase and flavonoid en products in epidermal cells of parsley leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **85**: 2989–2993.
- Seaforth C.E., Ballah S., Rollocks S. and Craig-James S. 1998.** Medicinal plants used in Tobago. *Fitoterapia*, **69**: 523–527.
- Selvaraj N., Bobby Z. and Sathiyapriya V. 2006.** Effect of lipid peroxides and antioxidants on glycation of hemoglobin: an *in vitro* study on human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*, **366**: 190–195.
- Sharifa A.A., Neoh Y.L., Iswadi M.I., Khairul O., Abdul Halim M., Jamaludin M., Mohamed Azman A.B. and Hing H.L. 2008.** Effects of methanol, ethanol and aqueous extract of *Plantago major* on Gram positive bacteria, Gram negative bacteria and yeast. *Annals of microscopy*, **8**: 41– 44.
- Sharififar F., Nudeh-Dehghn G. and Mirtajaldini M. 2008.** Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food chemistry*, **112**: 885–888.
- Shirley B.W. 1996.** Flavonoid biosynthesis: "new" functions for an "old" pathway. *Trends in Plant Science*, **1**: 377–382.
- Shorr A.F. 2009.** Review of studies of the impact on Gram-negative bacterial resistance on outcomes in the intensive care unit. *Critical Care Medicine*, **37**: 1463–1471.
- Sibanda T., and Okoh A. I. 2007.** The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents. *African Journal of Biotechnology*, **6**(25): 2886-2896.
- Sirk T.W., Brown E.F., Sum A.K. and Friedman M. 2008.** Molecular dynamics study on the biophysical interactions of seven green tea catechins with lipid bilayers of cell membranes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 7750–7758.
- Skibola C.F. and Smith M.T. 2000.** Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology and medicine*, **29**(3-4): 375–383.

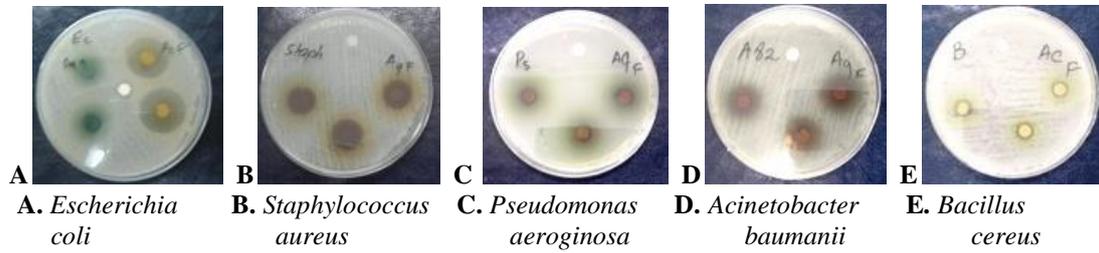
- Soo Cheon C., Jai-Heon L. and Sang U.P. 2013.** Recent studies on flavonoids and their antioxidant activities. *Experimental and Clinical Sciences*, **12**: 225–230.
- Souri E., Amin G., Farsam H. and Barazandeh Tehrani M. 2008.** Screening of antioxidant activity and phenolic content of 24 medicinal plant extracts. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, **16**(2): 83–87.
- Soro T.Y., Néné-bi A.S., Zahoui O.S., Yapi A. and Traoré F. 2015.** Activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de *Ximenia americana* (Linné) (Olacaceae). *Journal of Animal and Plant Sciences*, **24**(3): 3802–3813.
- Stafford, H. A. 1990.** Flavonoid metabolism. CRC Press, Boca Raton, FL. 298 pages.
- Stapleton, A.E. 1992.** Ultraviolet radiation and plants: Burning questions. *The Plant Cell*, **105**: 881–889.
- Stomper M.J., Hennekens C.H., Manson J.E., Colditz G.A., Rosner B. and Willett W.C. 1993.** A prospective study of vitamin E consumption and risk of coronary disease in women. *New England Journal of Medicine*, **328**: 1444–1449.
- Tato Rocha R.E., Cardenas V.E. and Herrero H.E. 1994.** Selenium: the physiopathological and clinical implications. *Anales de Medicina Interna*, **1**: 457–463.
- Tchakmichian M. 2003.** Etude de quinze plantes à renommée vulnérable. Thèse de Doctorat. Faculté de pharmacie, Université de Nantes, France.
- Tepe B., Sokmen M., Akpulat H.A and Sokmen A. 2006.** Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chemistry*, **95**: 200–204.
- Toyang N.J., Ateh E.N., Keiser J., Vargas M., Bach H., Tane P., Sondengam L.B., Davis H., Bryant J. and Verpoorte R. 2012.** Toxicity, antimicrobial and anthelmintic activities of *Vernonia guineensis* Benth. (Asteraceae) crude extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, **144**: 700–704.
- Tsimikas S., Brilakis E.S., Miller E.R., McConnell J.P., Lennon R.J., Kornman K.S., Witztum J.L. and Berger P.B. 2005.** Oxidized phospholipids, Lp (a) lipoprotein, and coronary artery disease. *New England Journal of Medicine*, **353**(1): 46–57.
- Upadhyay N.K., Yogendra Kumar M.S. and Gupta A. 2010.** Antioxidant, cytoprotective and antibacterial effects of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology*, **48**(12): 3443–3448.
- Upson T.M., Grayer R.J., Greenham J.R., Williams C.A., Al-Ghamdi F. and Chen F.H. 2000.** Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. *Journal of Biochemical Systematic and Ecology*, **17**: 991–1007.
- Urquiaga I. et Leighton F. 2000.** Plant polyphenol antioxidant and oxidative stress. *Biological Research*, **33**(2): 55–64.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M. and Mazur M. 2006.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, **160**: 1–40.

- Van Tunen A.J., Mur L.A., Brouns G.S., Rientra J.D., Koes R.E. and Mol J.N.M. 1990.** Pollen and specific CHI promoters from *Petunia*: Tandem promote regulator of the CHI A gene. *Plant Cell*, **2**: 393–401.
- Veale D.J.H., Furman K.I. and Oliver D.W. 1992.** South African traditional herbal medicines used during pregnancy and childbirth. *Journal of Ethnopharmacology*, **36**: 185–191.
- Victor N., Ma. Luisa V., Gabriela R. and Xavier L. 1996.** Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, **53**(3): 143–147.
- Vogt T. 2009.** Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, **3**: 2–20.
- Voirin B. 1983.** UV spectral differentiation of 5-hydroxy and 5-hydroxy-3-méthoxyflavones with mono-4', di-3',4' or tri-3',4',5'-substituted B rings. *Phytochemistry*, **10**: 2107–2145.
- Wang D., Tang W., Yang G.M. and Cai B.C. 2010.** Anti-inflammatory, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Flavonoids from *Oxytropis falcata* Bunge. *Chinese Journal of Natural Medicines*, **6**(8): 461–465.
- Wang Q., Wang H. and Xie M. 2010.** Antibacterial mechanism of soybean isoflavone on *Staphylococcus aureus*. *Archives of Microbiology*, **192**: 893–898.
- Wollenweber E., Wehde R., Dorr M., Lang G. and Stevens J.F. 2000.** C-methyl-flavonoids from the leaf waxes of some *Myrtaceae*. *Phytochemistry*, **55**: 965–970.
- Wu T., Zang X., He M., Pan S. and Xu X. 2013.** Structure-activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase. *Journal of food chemistry*, **61**(34): 8185-8190.
- Wu D., Kong Y., Han C., Chen J., Hu L., Jiang H. and Shen X. 2008.** D-alanine:D-alanine ligase as a new target for the flavonoids quercetin and apigenin. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **32**: 421–426.
- Yamashita S.K., Louie M., Simor A.E. and Rachis A. 2000.** Microbiological surveillance and parenteral antibiotic use in a critical care unit. *Canadian Journal of Infectious Diseases*, **11**(2): 107– 111.
- Yaremenko K.V. 1990.** Adaptogenes of the natural origin in prophylactic oncology. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 116–182.

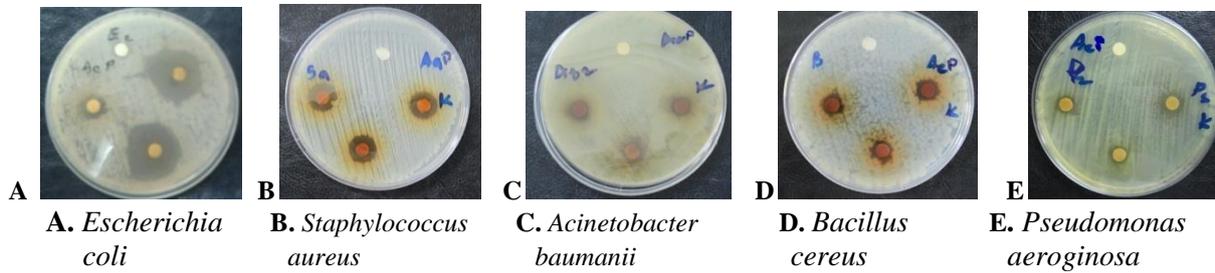
# Annexe



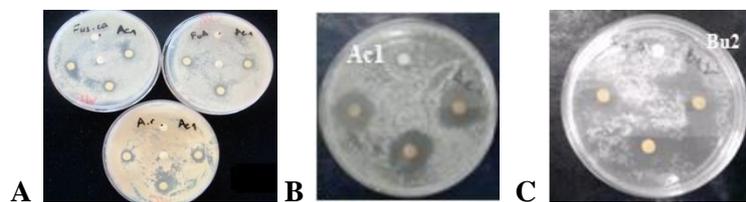
**Figure 23.** Activité antibactérienne des extraits de racines de *Carthamus caeruleus* L.



**Figure 24.** Activité antibactérienne des extraits de feuilles de *Carthamus caeruleus* L.

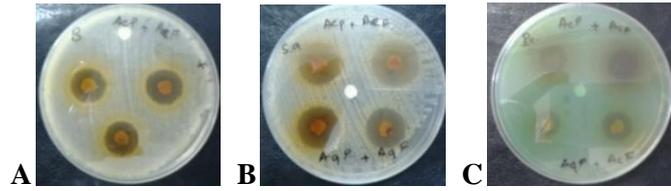


**25.** Activité antibactérienne des extraits de feuilles de *Plantago major* L.



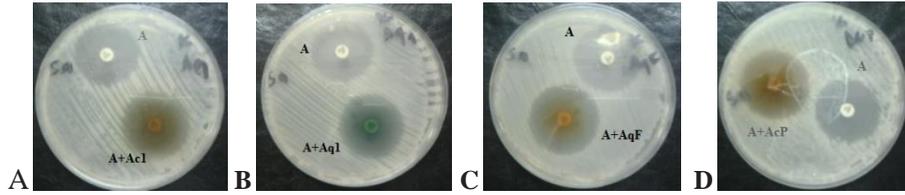
**A.** *Aschochyta rabiei*, *Fusarium oxysporum albidinis* et *Fusarium Var coeruleum*  
**B et C.** *Candida albicans*

**Figure 26.** Activité antifongique des extraits de racines de *Carthamus caeruleus* L.

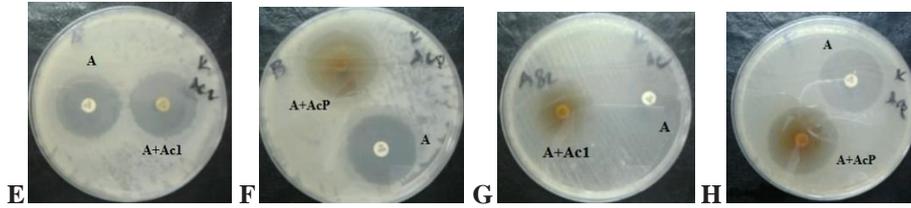


**A- *Bacillus cereus***      **B- *Staphylococcus aureus***      **C- *Pseudomonas aeruginosa***

**Figure 28.** Exemple de synergie entre deux extraits (AcF+AcP, AcF+AqP et AqF+AqP) de *Carthamus caeruleus L.* et *Plantago major L.*



**A, B, C et D. *Staphylococcus aureus***

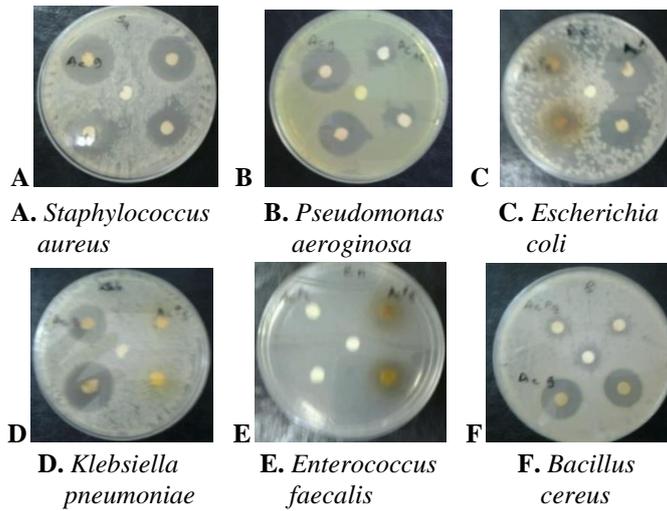


**E, F. *Bacillus cereus***

**G. *Acinetobacter baumannii***

**H. *Salmonella typhimurium***

**Figure 29.** Exemple de synergie entre extraits Ac1 et AqF de *Carthamus caeruleus L.* et AqP de *Plantago major L.* avec un antibiotique standard (gentamicine)



**A. *Staphylococcus aureus***

**B. *Pseudomonas aeruginosa***

**C. *Escherichia coli***

**D. *Klebsiella pneumoniae***

**E. *Enterococcus faecalis***

**F. *Bacillus cereus***

**Figure 34.** Activités antibactériennes des fractions Ac9, AcF7 et AcP8

BeitZaman Hotel and Resort

Petra-Jordan

November 21-23/2012

### 1.78 Antimicrobial activity of *Carthamus* sp a Medicinal Plant in Algeria

**Saffidine Karima<sup>1</sup>, Sahli Farida<sup>a</sup> and Zerroug Mohamed Mihoub<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Medicine, Faculty of Medicine, University Ferhat Abbas of Sétif, ALGERIA.

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Natural and Live Sciences, University Ferhat Abbas of Sétif, ALGERIA.

**Abstract:** Medicinal plants constitute a source of bioactive substances to treat chronic as well as infectious diseases in many countries of the world. A wide range of active compounds used as natural antimicrobial agents are economically accessible to face the apparition of phenomena of germ resistance to antibiotics. *Carthamus* includes almost all plants of the family *Asteraceae* growing in the Mediterranean area. This botanical genus has been traditionally used to treat various diseases: cardiovascular diseases, male sterility and skin diseases. It is either known to possess sedative and anti-tumor activity. Our work was undertaken in order to evaluate the antimicrobial activity of a species of *Carthamus* growing in Sétif area in the North-East of Algeria. The study was carried on the roots and leaves of this plant. The antimicrobial activity of aqueous and organic plant extracts was evaluated *in vitro* against ten bacterial and four fungal strains using disc diffusion method. It is also noteworthy that this study of the antimicrobial of this species is performed for the first time. The results showed a good activity of root and leaf extracts *in vitro* against Gram-negative and Gram-positive bacteria strains as well as against pathogenic fungus. Organic fractions from methanol and ethanol extracts exhibited high inhibition zones against one or more of the tested microorganisms, compared to aqueous fractions with lowest activity. Maximum antifungal activity, 25 mm, was obtained against *Candida albicans* and moderate one, 10 to 12 mm, on plant pathogenic fungus: *Aschochyta rabiei*, *Fusarium oxysporum albidinis* and *Fusarium Var coeruleum*. But for antibacterial activity, maximum of 20 mm was exhibited against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Acinetobacter bowii*. While, low activity was obtained against *Enterobacter faecalis*, 10 mm and *Pseudomonas aeruginosa*, 9 mm. Extracts of this species may contain effective compounds against pathogenic microorganisms. These agents are in investigations to define their chemical structure and characteristics.

**Key words:** Antimicrobial activity, *Carthamus*, plant extracts.

# The 15<sup>th</sup> International Congress of the International Society For Ethnopharmacology

05-08 May ,2015 ,Petra Panorama Hotel

Petra-Jordan

**Keywords:** Antimicrobial, antioxidant activities, extract, *Plantago major*, species.

Abstract: Medicinal plants are widely used all over the World as folk medicine for several purposes. They are one potential source of novel drugs used as antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory, antiviral, and anticancer agents. In our study, we have used plants of the genus *Plantago*, which are widely distributed in the world and have been traditionally used for several purposes. Our experiments were carried on leaves of *Plantago major*, a species growing in Sétif area in the North-East of Algeria. Different extracts of the leaves: petroleum ether (EP), ethyl acetate (Ac), aqueous (Aq) fractions were evaluated for their antioxidant and antibacterial properties. The total phenolic content of the extracts was determined according to the Folin-Ciocalteu procedure and ranged from 5.79 to 114.45 mg GAE/g dry extract. The total flavanoid content of extracts was determined by Aluminium chloride colorimetric assay and ranged from 1.24 to 5.48 µg QAE/mg dry extract. Antioxidant properties were determined via the DPPH free radical scavenging, ferrous ion chelating activity and β-carotene bleaching assays. The ethyl acetate fraction showed the best DPPH scavenging capacity ( $IC_{50}=12.85\pm 0.27$  µg/ml). However, low activities were obtained with the aqueous and the petroleum ether fractions ( $IC_{50}$  of 109.69±0.21 and 439.84±6.51 µg/ml). In the β-carotene/linoleic acid assay, the most active extract was ethyl acetate fraction with a relative antioxidant activity (RAA %) of 70.48%, followed by the aqueous fraction (50.16%) and the least one was the petroleum ether fraction (36.72%). Furthermore, only aqueous extract have a capacity of chelating 50% of iron ion at concentration of 1.02±0.02 mg/ml. The findings indicated either that the ethyl acetate extract was more effective than aqueous extract *in vitro* against Gram-negative and Gram-positive bacteria strains. Different inhibition zone ranging from 8 to 16.7 mm have been obtained. High inhibition zone of 16.7±0.6 and 15.3±0.6 mm were exhibited on *Staphylococcus aureus* respectively for ethyl acetate and aqueous fractions (Ac and Aq). A maximum inhibition zone of 14.3±0.6 mm, moderate one of 13.3±0.6 mm and 11.3±0.6 mm were obtained for the ethyl acetate fraction (Ac) respectively against *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter bowie*. However, the same extract had a weaker activity on *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus sp* and *Salmonella typhimurium*. Synergistic antibacterial activity was also obtained by combination of standard antibiotic (Gentamicin) with leaves extracts of *Plantago major*. Our results showed a potential antioxidant and antibacterial activities of this species.

Saïtidine Karima<sup>1</sup>, Sahli F.<sup>1</sup> and Zerroug M.M.<sup>2</sup>

1.78. Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Plantago major*

<sup>1</sup>Department of Medicine, Faculty of Medicine, University Ferhat Abbas, Sétif 1, <sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Natural and Life Sciences, University Ferhat Abbas, Sétif 1, Algeria.

## Research Letter

# Antimicrobial activity of an Algerian medicinal plant: *Carthamus caeruleus* L.

Saffidine Karima<sup>a</sup>, Sahli Farida<sup>a</sup> and Zerroug Mohamed Mihoub<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Medicine, Faculty of Medicine, University Ferhat Abbas of Sétif, ALGERIA

<sup>b</sup>Department of Microbiology, Faculty of Natural and Live Sciences, University Ferhat Abbas of Sétif, ALGERIA

**ABSTRACT: Background:** Medicinal plants constitute a source of bioactive substances to treat chronic as well as infectious diseases in many countries of the world. A wide range of natural antimicrobial agents can either inhibit the growth of microorganisms or kill them and represent a good alternative to chemical drugs for treatment of various infectious diseases to face the phenomena of germ resistance. **Methods:** In our study, we have used plants of the genus *Carthamus*, which are widely distributed in the Mediterranean region and have been traditionally used to treat skin diseases and burns. Our experiments were carried on the roots and leaves of a *Carthamus* species growing in Sétif area in the North-East of Algeria, in order to evaluate its antimicrobial activity. **Results:** Our results showed potent activity of root and leaf extracts *in vitro* against Gram-negative and Gram-positive bacteria strains as well as against pathogenic fungus. Variable antimicrobial effects of different extracts have been obtained against the tested microorganisms. For root extracts, high inhibition zone of 25 mm was exhibited on *Candida albicans*, 20 mm against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*, and 15 mm on *Acinetobacter bowie*. Moderate activity of 12 mm and 11 mm was obtained for pathogenic plant fungi (*Aschochyta rabiei* and *Fusarium Var coeruleum*) and lowest activity of 8.3 mm was obtained for *Fusarium oxysporum albidinis*. Leaf extracts were only effective against *Acinetobacter bowie* and *Staphylococcus aureus* with inhibition zones of 18 and 20 mm respectively. The root extracts were more active than the leaf extracts against the tested microorganisms.

## INTRODUCTION

Medicinal plants are intensely screened and tested for a wide range of applications including pharmacology, pharmaceutical botany, medical and clinical microbiology, phytopathology and food preservation. The use of herbal medicines has taken on a greater importance during the last years because of their potential antioxidant activity and antimicrobial effects against a wide range of pathogenic micro-organisms. Various parts of vegetables: roots, leaves and flowers, have been used in traditional medicine to treat chronic as well as infectious diseases in many countries of the world. Microbial resistance to currently used antibiotics is considered a public health problem, particularly in developing countries and

many efforts have been made to discover new bioactive compounds as natural antimicrobial agents. Their antimicrobial activity has been attributed to a wide diversity of secondary metabolites such as flavonoids,<sup>[1,2]</sup> tannins<sup>[3]</sup> and saponins.<sup>[4]</sup> Phytochemical screening carried out on aerial parts of *Carthamus lanatus*<sup>[5]</sup> and seeds of *Carthamus tinctorius*,<sup>[6]</sup> have identified many of their bioactive agents such as fatty acids,<sup>[7]</sup> serotonin derivatives,<sup>[8]</sup> flavonoids<sup>[9]</sup> and hydroxy safflor yellow A.<sup>[10]</sup> These molecules possess pharmacological properties such as protection of bone,<sup>[11]</sup> effect on lipid metabolism,<sup>[12]</sup> anti-oxidation,<sup>[13–16]</sup> anti-hypertension,<sup>[17]</sup> treatment of heart ailments and rheumatism,<sup>[18,19]</sup> and also curing male and female fertility problems.<sup>[20–22]</sup> Other studies have reported on anti-inflammatory effect<sup>[21]</sup> and anti-tumor activity of *Carthamus*.<sup>[23–25]</sup> In dermatology, *Carthamus* spp. have many beneficial effects against skin problems such as erythematic, psoriasis and other dermatitis.<sup>[26]</sup> The antimicrobial activity has previously been tested for flower and seed extracts and few reports were investigated on leaf extracts.<sup>[6,26]</sup> However, all of these studies tested this extract on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* only. Thus, our study was focused

\*Correspondence

E-mail:

DOI: 10.5530/pc.2013.4.10

on the antimicrobial activity of root and leaf extracts of *Carthamus* species growing in Sétif area in the North-East of Algeria. Roots of this species are commonly used in traditional medicine by healers and the population of Sétif, because of their therapeutic benefits to treat skin problems and burns.

*Carthamus* is a biennial plant growing in the Mediterranean area and includes almost all plants of the family Asteraceae. This plant, which is also called false saffron, originates from Egypt and its flowers are used for colouring and flavouring foods. It is cultivated mainly in Algeria, in Corsica, in France, in the south of Italy and in Spain, for its oleaginous seeds. The most common species of this genus found in Algeria are: *Carthamus caeruleus*, *Carthamus daumasianus*, *Carthamus fauvei* and *Carthamus doumerguei*.<sup>[27]</sup>

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

The vegetable material consists of leaves and roots collected in May 2010 from the area of Sétif especially Maouane vilage. The fresh plant parts were cleaned and shade dried at the room temperature during a two week period. Exposure to sunlight was avoided to prevent the loss of active components. The dried plant material was ground into powder using electric blender. Botanical identification of the plant was conducted by Pr. Laouer Hocine “Laboratoire de Valorization des Ressources Naturelles”, University Ferhat Abbas of Sétif Algeria. A Voucher specimen of the plant was deposited in the herbarium of this laboratory.

### Preparation of the extracts

#### *Extract of the roots*

The extraction was carried out according to a previously established method.<sup>[28]</sup> The same procedure was used with methanol and ethanol extractions: 50 g of vegetable powder are mixed with 500 ml of the relevant solvent 70% (7:3) and put under magnetic agitation at 80 °C for 30 minutes. This process prevents the enzymatic hydrolysis.<sup>[29]</sup> The mixture was left for maceration during 24 hours and then filtered through muslin cloth and Whatman filter paper N°3. The marc was macerated three times. Finally, all the filtrates were collected and were evaporated to dryness under reduced pressure to 45 °C with a rotary evaporator (BUCHI R215). Each dry residue was weighed and treated with boiling distilled water to dissolve the flavonoids and left to settle in the refrigerator for 24 hours, then filtered through Whatman filter paper N°3. This filtrate (aqueous solution: Aq) was

firstly extracted with ethyl acetate (Fraction Ac), then with n-butanol (Fraction Bu). At the end of this treatment, various fractions were obtained:

- Two organic phases (Ac1 and Bu1) and an aqueous phase (Aq1) from methanol extract.
- Two organic phases (Ac2 and Bu2) and an aqueous phase (Aq2) from ethanol extract.

These fractions were evaporated to dryness under reduced pressure to 45 °C with a rotary evaporator (BUCHI R215) and each residue dissolved in 10 ml of methanol and stored in the refrigerator until used.

The percentage yield of extracts was calculated by following formula as the ratio of the mass of the dried extract to the mass of the ground plant sample.

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{Weight of extract obtained}}{\text{Total weight of the sample}} \times 100$$

#### *Extract of leaves*

The same procedure of extraction was used for leaves. The extract was obtained by three successive macerations in a mixture methanol/water (8:2). With the leaf extract, we have used only ethyl acetate to remove the phenol compounds. Two fractions were obtained by this treatment: an organic phase (AcF) and an aqueous phase (AqF). Both fractions were evaporated to dryness under reduced pressure to 45 °C with a rotary evaporator (BUCHI R215) and each residue dissolved in 10 ml of methanol to test their antibacterial activity.

### Antimicrobial susceptibility test

#### *Bacteria and Fungi strains*

The antibacterial tests were carried out using reference strains: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and clinical origins strains: *Acinetobacter bowie*, *Proteus sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* and *Candida albicans* obtained from the Laboratory of Bacteriology at Sétif hospital. The other reference strains: *Bacillus cereus* (ATCC10876), *Enterobacter fecalis* (ATCC49452), *Salmonella thyphimurium* (ATCC13311), *Citrobacter freundii* (ATCC8090) and *Klebsiella pneumonia* (ATCC700603) obtained from Laboratory of Natural Substances at the University of Tlemcen, Algeria. Plant pathogenic fungus, *Aschochyta rabiei*, *Fusarium oxysporum albidinis* and *Fusarium Var coeruleum* were obtained from Laboratory of Applied Microbiology at the University Ferhat Abbas of Sétif, Algeria.

#### *Antibacterial activity*

Antimicrobial activity *in vitro* was screened by using disc diffusion and micro-dilution methods.<sup>[30,31]</sup> For the

antibacterial assay, sterile Muller-Hinton agar plates were inoculated by the method of streak with inoculums of the tested bacterial suspension.

The bacterial suspension from young colonies of 18 to 24 hours was made in sterile distilled water for each strain. The turbidity of this suspension was adjusted to 0.5 Mc Farland ( $10^8$  CFU/ml). Then, sterile paper discs of 6 mm diameter were impregnated with 20  $\mu$ l of plant extract. Negative controls were discs impregnated with 20  $\mu$ l of methanol. Discs impregnated with methanol plant extract solutions or absolute methanol were left in an oven till total evaporation of methanol. First, the discs were impregnated with 10  $\mu$ l and let to dry, then they were impregnated with another 10  $\mu$ l and then, the discs were delicately deposited on the surface of the inoculated mediums. Plates were incubated at 37 °C for 24 hours and at 30 °C for 72 hours for bacteria and fungi respectively. Each extract was tested in triplicate. The antimicrobial activity was evaluated by measuring the zone of inhibition against the test organism and the average of the three measurements in all three replicates was calculated. An inhibition zone of 14 mm or more of plant extracts was considered as high antibacterial activity.<sup>[6]</sup>

#### **Antifungal susceptibility test**

Antifungal activity *in vitro* was tested against pathogenic human fungi (*Candida albicans*) and plant pathogenic fungus (*Aschochyta rabiei*, *Fusarium oxysporum albidinis* and *Fusarium Var coeruleum*).

Sabouraud dextrose medium containing chloramphenicol or actidione was used for *Candida albicans*.<sup>[32]</sup> The fungal suspension from two to three day old culture was made in sterile distilled water and its turbidity was adjusted to 5 Mc Farland ( $10^8$  CFU/ml). An aliquot of 0.1 ml of this fungal suspension was spread over the surface of agar plate.

Plant pathogenic fungi, were grown on Malt agar during 5–7 days. Mycelia discs of 5 mm diameter were taken with a sterilized cork borer from each fungus culture and transferred into sterile distilled water. The suspension was diluted with sterile distilled water till obtain  $10^7$  spore/ml, then an inoculums of 0.1 ml was spread uniformly on Malt agar plate.

The disc technique was used for the antifungal activity; sterile paper discs of 6 mm diameter impregnated with 20  $\mu$ l of plant extract. The same procedure was used as described previously. Negative controls were discs impregnated with 20  $\mu$ l of methanol. Discs impregnated with methanol plant extract solutions

or absolute methanols were left in an oven till total evaporation of methanol. After that, they were placed aseptically on the surface of the inoculated agar plates. The tests were performed out in triplicate. After incubation for 3 to 6 days, the diameters of the inhibition zones against the tested fungus were measured in mm.

#### **Determination of minimal inhibitor concentration (MIC)**

The MIC was determined using the dilution method for extracts which showed activity on any of the test bacteria and fungus. The test was performed using three dilutions of each extract (1/2, 1/4 and 1/8) against the tested microorganisms. Each dilution was tested in triplicate with the presence of sterile disc as a negative control. The same procedure for preparing bacteria and fungi cultures was done as described previously. The MIC was the lowest concentration of plant extracts that exhibited no growth of microorganisms.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

The percentage yield of extracts from roots was 15.2% for methanol extract and 16.2% for ethanol extract. These yields were similar. The weights of different fractions of the methanol and ethanol extracts from roots were: 0.47 g, 2.72 g, 5.20 g, 0.40 g, 1.17 g and 4.70 g respectively for Ac1, Bu1, Aq1, Ac2, Bu2 and Aq2. For the organic extract (AcF) and the aqueous extract (AqF) of leaves, their weight was 0.5 g and 13 g respectively.

#### **Antibacterial activity**

Results obtained for antibacterial activity of all fractions are reported in (Table 1). None of the different fractions was effective against *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumonia*, and *Serratia sp*. However, various antimicrobial effects have been obtained against both Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as against phytopathogenic fungus. Analysis of the data revealed that organic fractions from methanol and ethanol root extracts exhibited high inhibition zones against one or more of the tested microorganisms, compared to aqueous fractions which showed the lowest activity. Similar results were obtained with the ethyl acetate and butanol fractions from the methanol and ethanol extracts of roots. *Staphylococcus aureus*, strains showed high sensitivity to the investigated fractions. The range of the zone of the inhibition was from 7 to 20 mm (Table 1). Maximum inhibition zone of 20 mm was obtained with aqueous fraction (Aq1), organic fractions (Ac1 and Ac2) against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* respectively.

**Table 1: Antibacterial activity of root and leaf extracts**

Test Bacteria	Inhibition Zone in mm									
	Ac1	Bu1	Aq1	Ac2	Bu2	Aq2	AcF	AqF	C <sup>-</sup>	C <sup>+</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	20 ± 3.5	7 ± 1.5	-	10 ± 1.5	10 ± 1.0	20 ± 1.0	-	20
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25
<i>Bacillus cereus</i>	20 ± 1.5	16 ± 1.5	-	20 ± 1.5	17 ± 2.0	12 ± 2.5	10 ± 0.6	-	-	20
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt
<i>Enterobacter faecalis</i>	-	-	-	10 ± 1.00	-	-	-	-	-	nt
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt
<i>Serratia sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt
<i>Acinetobacter bowie</i>	15 ± 2.0	10 ± 1.5	-	15 ± 1.0	10 ± 1.0	-	10 ± 0.6	20 ± 1.5	-	nt
<i>Proteus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	10 ± 0.6	-	20

C<sup>-</sup>: Negative control (Methanol). C<sup>+</sup>: positive control (Gentamycin 10 µg/disc). - indicates no inhibition. Results are the mean ± SD of triplicate determinations. nt: Not tested.

Low activity was exhibited for the organic fraction (Ac2) from root extract on *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter faecalis*, and their inhibition zones were 7 and 10 mm respectively. Inhibition zones of 16 and 17 mm were obtained with the organic fractions (Bu1 and Bu2) against *Bacillus cereus*, and low activity of 10 mm was seen with the same fractions on *Acinetobacter bowie*.

For the leaf extracts, organic and aqueous fractions (AcF and AqF) were effective only on *Acinetobacter bowie* and *Staphylococcus aureus* and the corresponding inhibition zones were 18 and 20 mm. However, low activity of 10 and 9 mm was obtained for organic fraction against *Acinetobacter bowii* and *Bacillus cereus*, and for aqueous fraction on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeroginoa*.

Our results indicated high sensitivity of *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter bowii* and *Bacillus cereus*. Extracts of *Carthamus caeruleus* were more active than those of *Carthamus lanatus*<sup>[33]</sup> and *Carthamus tinctorius*.<sup>[6]</sup>

The Minimum Inhibition Concentrations (MIC) of the root extracts aqueous fraction (Aq1) was of 1.3 mg/ml

for *Staphylococcus aureus*, while the ethyl acetate fractions Ac1 and Ac2 had a MIC of 0.47 mg/ml and 0.2 mg/ml on *Acinetobacter bowie* respectively. For *Bacillus cereus*, the MIC values were 0.12 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.68 mg/ml and 0.29 mg/ml corresponding respectively to different organic extracts Ac1, Ac2, Bu1 and Bu2.

For the aqueous leaf extract (AqF), a MIC of 12.5 mg/ml was obtained on *Staphylococcus aureus*. In this study, it was observed that the aqueous fractions Aq1 and AqF had a higher MIC than the organic extracts. The ethyl acetate fraction Ac1 and Ac2 showed a higher inhibitory activity. This difference is attributed to the solubility of the active component in different solvents.<sup>[34]</sup> For the antifungal assay, results obtained of all fractions are reported in (Table 2).

The organic fractions (Ac1, Ac2 and Bu2) and the aqueous fraction (Aq2) exhibited maximum antifungal activity with inhibition zones of 25 mm, 17 mm, 18 mm and 20 mm on *Candida albicans* respectively.

Root and leaf extracts were tested on phytopathogenic fungi in order to determine their potent effect

**Table 2: Antifungal activity of root and leaf extracts against pathogenic fungi**

Fungus strains	Inhibition Zone in mm									
	Ac1	Bu1	Aq1	Ac2	Bu2	Aq2	AcF	AqF	C <sup>-</sup>	C <sup>+</sup>
<i>Candida albicans</i>	25 ± 2.0	10 ± 1.5	-	17 ± 2.6	18 ± 2.0	20 ± 1.5	-	-	-	14.3 ± 0.5
<i>Aschochyta rabiei</i>	12 ± 1.5	11.3 ± 3.9	-	11 ± 1.2	-	-	-	-	-	22.5 ± 3.5
<i>Fusarium oxysporum albidinis</i>	10.6 ± 0.6	-	-	11.3 ± 2.5	8.3 ± 1.1	-	-	-	-	22.5 ± 3.5
<i>Fusarium Var coeruleum</i>	11 ± 2.1	-	-	10.3 ± 0.6	10 ± 1.0	-	-	-	-	11.6 ± 1.5

C<sup>-</sup>: Negatif control (Methanol). C<sup>+</sup>: Amphotericin B (10 mg/ml) as positive control for *Candida albicans* and Digrain<sub>4</sub> [Dichlorvos (125 g/l), Malathion (100 g/l)] as positive control for plant pathogenic fungus. - indicates no inhibition. Results are the mean ± SD of triplicate determinations.

to treat plant diseases caused by fungi for new pesticide development. The fractions Ac1 and Bu1 inhibited the growth of the tested phytopathogenic fungi. The ethyl acetate fraction (Ac1) inhibited the growth of *Aschochyta rabiei*, *Fusarium Var coeruleum* and *Fusarium oxysporum albidinis* and the inhibition zones were 12 mm, 11 mm and 10.6 mm respectively. Buthanol fraction (Bu2) exhibited low activity of 10 mm on *Fusarium Var coeruleum* and 8.3 mm on *Fusarium oxysporum albidinis*. The organic and aqueous fractions of leave extract did not express any activity on the tested fungus strains.

The root extracts were more active than the leaf extracts against the tested microorganisms. This agrees with my own ethnobotanic investigation<sup>[35]</sup> near the herbalists and the population of the Sétif. In traditional medicine, roots are used for the treatment of the burns and gave good results in the case of the diabetic patients.

## CONCLUSIONS

This plant is an endemic species. The roots of this botanical genus are intensively used as a medicinal plant in the region of Sétif. The extracts showed significant effects on bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Acinetobacter baumannii*; and human pathogenic fungus: *Candida albicans*. *Carthamus* sp could be used as a potential source of natural antimicrobial agents with beneficial therapeutic effects.

Conversely, good antifungal activities were observed on phytopathogenic fungi. Our current research offers the possibility of developing strategies for controlling plant pathogens with natural extracts or bioactive metabolites of medicinal plants. Further, phytochemical studies are ongoing to define the chemical structure and characteristics of bioactive compounds especially present in the roots of this botanical genus.

## REFERENCES

- Benhammou N, Atik Bekkara F and Tatjana KP. Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. African J. Pharmacol. 2008; 2(2):022–8.
- Fawzi EM, Khalil AA and Afifi AF. Antifungal effect of some plant extracts on *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum* African J. Biotech. 2009; 8(11):2590–7.
- Springfield EP and Weitz F. The scientific merit of *Carpobrotus mellei* L. based on antimicrobial activity and chemical profiling. African Journal of Biotechnology. 2006; 5(13):1289–93.
- Kadam PV, Deoda RS, Shivatare RS, Yadav KN, Patil MJ. Pharmacognostic, phytochemical and physicochemical studies of *Mimusops Elengi* Linn stem bark (Sapotaceae). Scholars Research Library. 2012; 4(2):607–13.
- Rilka T, Maya M, Bozhanka M and Helmut DZ. Bioactive phenolics from *Carthamus lanatus* L. Naturforsch. 2003; 58c:704–7.
- Ramzi AAM, Salah AAA, Sidqi H, Faisal MNA, Sama AZA and Ulrike L. Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities and phytochemical Screening of Some Yemeni Medicinal Plants. eCAM. 2010; 7(3):323–30.
- Kim SK, Cha JY, Jeong SJ, Chung CH, Choi YR and Cho YS. Properties of the chemical composition of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) sprout. Korean Journal of Life Sciences. 2000; 10:68–73.
- Zhang HL, Nagatsu A, Watanabe T, Sakakibara J and Okuyama H. Antioxidative compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil cake. Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo). 1997; 45: 1910–14.
- Yaginuma S, Shiraishi T and Igarashi K. Developmental transition of the flavonoid contents in safflower leaves during stress-loaded cultivation. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2003; 67:1691–8.
- Zhu HB, Zhang L, Wang ZH et al. Therapeutic effects of hydroxysafflower yellow A on focal cerebral ischemic injury in rats and its primary mechanisms. Journal of Asian Natural Products Research. 2005; 7(4):607–13.
- Kim HJ, Bae YC, Park RW, Choi SW, Cho SH, Choi YS and Lee WJ. Bone-protecting effect of safflower seeds in ovariectomized rats. Calcified Tissue International. 2002; 71:88–94.
- Ihara M, Umekawa H, Takahashi T and Furuichi Y. Comparative effects of short- and long-term feeding of safflower oil and perilla oil on lipid metabolism in rats. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology. 1998; 121:223–31.
- Lee JY, Chang EJ, Kim HJ, Park JH and Choi SW. Antioxidative flavonoids from leaves of *Carthamus tinctorius*. Archives of Pharmacol Research. 2002; 25:313–19.
- Samia Inayatullah, Paul D. Prenzler, Hassan K. Obied, Ata-ur Rehman, Bushra Mirza Bioprospecting traditional Pakistani medicinal plants for potent antioxidants. Food Chemistry. 2012; 132:222–9.
- Mahadevappa P, Chapeyil KR, Venkatarangaiiah K, Yelegara SRK, Karur MMP. Hepatoprotective and *in vitro* antioxidant effect of *Carthamus tinctorius* L, var Annigeri-2-, an oil-yielding crop, against CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats. Pharmacognosy Magazine. 2011; 7(28):289–97.
- Liu F, Wei Y, Yang XZ, Li FG, Hu J and Cheng RF. Hypotensive effects of safflower yellow in spontaneous hypertensive rats and influence on plasma renin activity and angiotensin II level. Acta-pharmaceutica Sinica. 1992; 27:785–7.
- Buwa LV and Afolayan AJ. Antimicrobial activity of some medicinal plants used for the treatment of tuberculosis in the Eastern Cape Province, South Africa. African J. Biotech. 2009; 8(23):6683–7.
- More SD, Raghavaiah CV Hangarge DS, Joshi BM, Dhawan AS, SAFFLOWER: a unique crop for oil spices AND health consequently, a better life for you. In: VI<sup>th</sup> International Safflower Conference (Ed. Esendal E.). Istanbul; Turkey; 6–10; June 2005.
- Qin Yuehao. Jiangxi. An analysis on the clinical treatment of male sterility of 300 cases by kidney-benefited and invigorating blood-circulation decoction. Trad. Chinese Med. 1990; 20(3):21–2.
- Rilka T, Maya M, Bozhanka M and Helmut DZ. Bioactive phenolics from *Carthamus lanatus* L. Naturforsch. 2003; 58c:704–7.
- Sung-Hee C, Jeong-Hee J, Ji Young Y, Chi-Dong H, Youngsun C and Sang-Won C. Effects of a safflower tea supplement on antioxidative status and bone markers in postmenopausal women. Nutr. Res. Pract. 2011; 5(1):20–7.
- Saima J, Bozhanka M, Rilka T, Maya M, Helmut D, Muhammad IC and Atta-ur-Rahmana. *In vitro* Anti-inflammatory Effect of *Carthamus lanatus* L. Z. Naturforsch. 2003, 58c:830–2.
- Benedi J, Iglesias I, Manzanares I, Zaragoza F. Preliminary pharmacological studies of *Carthamus lanatus* L. Plant Med Phytother. 1986; 20:25.
- Loo WTY, Cheung MNB and Chow LWC. The inhibitory effect of a herbal formula comprising *Ginseng* and *Carthamus tinctorius* on breast cancer. Life Sci. 2004; 76(2):191–200.
- Teerakul Arpornsuwan, Sawang Petvises, Arthid Thim-uam, Atirada Boondech, and Sittiruk Roytrakul. Effects of *Carthamus tinctorius* L. solvent extracts on anti-proliferation of human colon cancer (SW 620 cell line) via apoptosis and the growth promotion of lymphocytes. Songklanakarin J. Sci. Technol. 2012; 34(1):45–51.

26. Bai Pu, Cao Linlin, Ma K, Li Zhilao and Wang Xinghai J. Shanxi. Pill was used for treatment on vitiligo of 369 cases. *Traditional Chinese J. Medical Sci.* 1992; 13(6):254.
27. Anonymous. Deuxième Rapport National sur l'état des Ressources Phytogénétiques. INRAA; 2006.
28. Margarita T, Rilka T, Nedjalka H, Bozhanka M, and Helmut D. Clastogenic Effect of *Carthamus lanatus L.* (Asteraceae). *Z. Naturforsch.* 2003; 58c:833–6.
29. Upson TM, Grayer RJ, Greenham JR, Williams CA, Al-Ghamdi F, Chen FH. Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. *Biochemical Systematics and Ecology.* 2000; 17:991–1007.
30. Drago L, Mombelli B, Giardo G, De Vecchi E and Gismondo MR. Effect of three different fish oil formulations on *Helicobacter pylori* growth and viability: *In vitro* study. *J. Chemother.* 1999; 11:207–10.
31. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility test, VI<sup>th</sup> ed. Wayne PA: Approved Standard, M2-A6, 1997.
32. Taskova R, Mitova M, Najdenski H, Tsvetkova I and Duddeck H. Antimicrobial and cytotoxicity of *Carthamus lanatus*. *Fitoterapia.* 2002; 73:540–3.
34. Hena JS, Adamu AK, Iortsuun DN and Olonitola OS. phytochemical screening and antimicrobial effect of the aqueous and methanolic extracts of roots of *Balanites aegyptiaca* (Del.) on some bacteria species. *Science World Journal.* 2010; 5(2):59–62.
35. Laouer H, Personal communication.

Original Article

ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF *PLANTAGO MAJOR*

SAFFIDINE KARIMA<sup>a</sup>, SAHLI FARIDA<sup>a</sup>, ZERROUG MOHAMED MIHOUB<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Medicine, Faculty of Medicine, University Ferhat Abbas, Sétif, Algeria, <sup>b</sup>Department of Microbiology, Faculty of Nature and Life Sciences, University Ferhat Abbas, Sétif 1, Algeria  
Email: safkarima@yahoo.fr

Received: 26 Jan 2015 Revised and Accepted: 20 Feb 2015

ABSTRACT

**Objective:** The purpose of this research is to evaluate the antioxidant and antibacterial properties of different leaf extracts of *Plantago major*, using *in vitro* methods.

**Methods:** The antimicrobial activity of different extracts (petroleum ether, ethyl acetate and aqueous fractions) from *Plantago major* leaves and their synergistic effect with standard antibiotic (Gentamicin) were evaluated using the disc diffusion method. The total phenolic and total flavonoid content of these extracts was determined according to the Folin-Ciocalteu procedure and Aluminum chloride colorimetric assay respectively. Antioxidant properties were determined via the DPPH free radical scavenging,  $\beta$ -carotene bleaching assay and ferrous ion chelating activity.

**Results:** The total phenols and total flavonoid content of the extracts ranged from 5.79 to 114.45 mg GAE/g dry extract and from 1.24 to 5.48  $\mu$ g QAE/mg dry extract respectively. The ethyl acetate fraction showed the highest DPPH scavenging capacity ( $IC_{50} = 12.85 \pm 0.27 \mu$ g/ml) and relative antioxidant activity of 70.48% in the  $\beta$ -carotene bleaching assay. While, aqueous and petroleum ether fractions have the lowest activities. On the other hand, only the aqueous fraction has a capacity of chelating iron ( $IC_{50} = 1.02 \pm 0.02$  mg/ml). The findings indicated also that an ethyl acetate fraction was the most active *in vitro* against Gram-negative and Gram-positive bacteria strains. High inhibition zone of  $16.7 \pm 1$  mm and  $14.3 \pm 0.6$  was exhibited on *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. Moderate one of  $13.3 \pm 0.6$  and  $11.3 \pm 0.6$  mm was obtained against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter bowie*. However, lowest antibacterial activity was obtained against *Klebsiella pneumonia*, *Proteus mirabilis* and *Salmonella typhimurium*. Furthermore, synergistic antibacterial activity was either obtained by the combination of standard antibiotic (Gentamicin) with the tested extracts.

**Conclusion:** Our results showed a potent antioxidant and antibacterial activities of this species. This plant could be exploited as a potential source of natural antioxidant and antimicrobial agents for dreadful human diseases and oxidation prevention.

**Keywords:** Phenolic content, Flavanoid content, Antioxidant activity, Antimicrobial activity.

INTRODUCTION

Medicinal plants are widely used all over the World as folk medicine because they still are the most effective and cheapest alternative sources of drugs [1]. They produce a wide array of compounds (flavonoids, alkaloids, phenols and tannins), most of which are used in plant defense against predators. These compounds of natural origin have been a source of innumerable therapeutic agents with antibacterial, antiviral, antioxidant, antiulcer, anti-inflammatory and anticancer activities. In recent decades, there has been much interest in antioxidant and antimicrobial activities of medicinal plants as the tool in discovering new biologically active molecules. Antioxidants have the capacity for scavenging free radicals, which can damage several proteins and DNA, leading to genomic instability and cancer [2, 3]. The other significant biological action of medicinal plants is their antimicrobial activity against infectious diseases. Conventional antifungal and antibacterial treatment of infections becomes inefficient to cure patients, providing resistance of microorganisms. Many researchers have studied the antimicrobial activities of plants for new compounds that may be effective in drug therapy. Among many popular medicinal plants, *Plantago major* (common plantain) belonging to the Plantaginaceae family, has taken place in many historical uses as a wound healing remedy. This herbaceous plant was traditionally used in North Africa, to treat wounds, burns, abscesses, inflammations, hemorrhoids and fevers [4]. Previous reports have indicated that plantain was also effective against diarrhea, dysentery [5], bronchitis [6, 7], cataracts and conjunctivitis [8, 9]. Recent researches have demonstrated the importance of this species for treating diabetes, increasing male fertility [10] and as anti-cancer [11-13].

The present study is the first one on *Plantago major* in Algeria. The objective of our work was to evaluate the potential antioxidant activity of aerial parts of this species growing in the Sétif area, in the North-East of Algeria. The  $\beta$ -carotene bleaching assay and the

ferrous ion chelating test are done for the first time. The phenolic and flavonoids content of this plant was also estimated. On the other hand, the antimicrobial activity of the extracts was assessed against a wide range of different pathogenic microorganisms. Among the tested strains: *Serratia sp.*, *Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter faecalis*, *Acinetobacter bowie*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenese* have not been reported previously. Furthermore, the synergistic effect of the extracts with standard antibiotic (Gentamicin) was either evaluated using disc diffusion method. This alternative approach was not reported in previous research tasks.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The vegetable material consists of leaves collected in May 2011. The fresh plant parts were cleaned and shade dried at room temperature during two weeks. Exposure to sunlight was avoided to prevent the loss of active components. The dried plant material was grounded into powder using the electric blender.

The plant was identified by Doctor Boulachab Nacera "Department of Pharmacy, Faculty of Medicine" university Ferhat Abbas, Sétif 1, Algeria. A voucher specimen of the plant was deposited in "Laboratoire de Valorisation des Ressources Naturelles".

Extraction procedure

The extract was prepared by a maceration technique [14]. 200 g of vegetable powder were mixed with 2000 ml of methanol 70% (methanol/water, 7:3) and put under magnetic agitation at 80°C during 30 min. The mixture was let for maceration during 24 h and then filtered through cotton and Whatman paper n°3. The residue was then re-extracted twice with additional portions (2000 ml) of methanol/water (70:30, v/v). The combined extracts were

evaporated to dryness under reduced pressure at 40°C with a rotary evaporator (BUCHI R215). The crude methanol extract was treated with boiling distilled water to dissolve the flavonoids. It was then let settle in the refrigerator for 24 h and filtered through filter paper. This aqueous solution was firstly extracted with petroleum ether to remove chlorophyll and lipids, then with ethyl acetate. Three fractions were obtained by this treatment:

- Two organic phases: petroleum ether (EP) and ethyl acetate (Ac) fractions.
- Residual aqueous phase (Aq).

Each fraction was evaporated to dryness under reduced pressure to 45°C with a rotary evaporator and each residue was weighed and then dissolved with a minimum volume of methanol to test their antioxidant and antimicrobial activity.

#### Determination of total phenol contents (TPC)

The total phenol in the extracts was estimated by spectrophotometric assay [15]. The protocol of dosage was made as follows: 200 µl of sample (concentration 0.5 mg/ml) or standard was mixed with 1 ml of 1/10<sup>th</sup> dilute Folin-Ciocalteu's reagent. After 4 min, 800 µl of aqueous sodium carbonate solution (7.5%) was added. Samples were vortexed and allowed to stand in the dark at room temperature for 2 h. The optical density of the blue-color solution was read at 765 nm. The data presented were averaged for triplicate measurements. A standard curve of the absorbance of Gallic acid (0 to 250 µg/ml) at 765 nm was plotted. The results were expressed as milligram Gallic acid equivalent per gram of dry extract (mg GAE/g extract).

#### Determination of total flavonoids

The total flavonoid content of extracts was estimated by a colorimetric procedure using aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>) according to the method of Bahorun *et al.* [16]. 1 milliliter of extract (2 mg/ml) or Quercetin standards (0 to 40 µg/ml) was combined with one ml of AlCl<sub>3</sub> solution (2% in methanol). The mixture was kept in the dark for 10 min at ambient temperature and the absorbance was read at 430 nm. The test was carried out in triplicate. The results were expressed as milligram quercetin equivalent per gram of dry extract (µg QAE/mg extract).

#### Antioxidant activity

The antioxidant capacity of extracts from *Plantago major* leaves was evaluated using commonly colorimetric methods, namely, the 2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging method and β-carotene bleaching test. While, the metal-chelating assay is based on the ability of extracts to act as antioxidants by binding to iron.

#### DPPH scavenging assay

The antioxidant activity assay employed the inhibition of free radical 2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) which is widely used for evaluating natural antioxidants, due to its stability, simplicity and reproducibility. In the DPPH assay, the free radical (DPPH) is reduced to the yellow-colored diphenyl-picrylhydrazine in presence of antioxidant due to the formation of the non-radical form DPPH-H in the reaction [17]. The radical scavenging activity was calculated as a percentage of DPPH discoloration and the decrease of its absorbance is monitored at 517 nm.

The method used in this assay was described by Sanchez-Moreno [18] and Agrawal [19]. The test was performed by mixing 50 µl of extract or standard with 1.95 ml of DPPH dissolved in methanol (0.004 %). After shaking, the reaction was placed safe from light during 30 min and the absorbance was read at 517 nm. The extracts were tested at concentrations ranging (0 to 30 mg/ml) for the petroleum ether fraction (EP), (0 to 1.25 mg/ml) for the ethyl acetate fraction (Ac) and (0 to 16 mg/ml) for the aqueous fraction (Aq). The synthetic antioxidant butyl hydroxyl toluene (BHT) and butyl hydroxyl anisole (BHA) were used as antioxidant standards at concentrations of 0 to 5 mg/ml. Triplicate tests were carried out at each dilution of the standard and the extract. The radical scavenging activity (RSA) was calculated using the following formula

$$\%RSA = [(ADPPH - A_{sample})/ADPPH] * 100$$

Where %RSA is the percentage of inhibition, ADPPH is the absorbance of DPPH (t=0 min) and A<sub>sample</sub> is the absorbance of the extract (t=30 min).

IC<sub>50</sub> expresses the concentration of antioxidant that causes 50% loss of activity of DPPH. It was calculated from the plot of the inhibition percentage of extracts and standard [20].

#### Bleaching β-carotene test

Oxidation of aqueous emulsions of β-carotene and linoleic acid is frequently employed as a test for measuring total antioxidant activity of plant extracts. β-carotene bleaching of extracts from *Plantago major* leaves was determined based on the procedure of Tepe [21] with a slight modification. Antioxidant capacities of the samples were compared with those of the synthetic antioxidant butyl hydroxyl toluene (BHT) and the blank. 0.5 mg of β-carotene dissolved with 1 ml of chloroform was placed into a flask containing 25 µl of linoleic acid and 200 mg of Tween 40. Chloroform was removed using a rotary evaporator under reduced pressure at 40°C. Oxygenated distilled water (100 ml) was then added to the emulsion and shaken vigorously. Aliquots of 2500 µl of this mixture were mixed to 350 µl of extracts and standard (BHT) dissolved in methanol at a concentration of 2 mg/ml. The blank was prepared by mixing 350 µl of methanol to 2500 µl of the emulsion. The tests were carried out in triplicate. Readings of all samples were taken immediately t=0, 1, 2, 4, 6, 24 and 48 h respectively, using a spectrophotometer at 490 nm.

Relative antioxidant activities (RAA %) of the extracts were calculated from the equation given below [22].

$$RAA\% = A_{sample}/A_{BHT} * 100$$

Where A<sub>BHT</sub> is the absorbance of the positive control BHT and A<sub>sample</sub> is the absorbance of the extract.

#### Ferrous ion chelating activity

The chelating of ferrous ions by extracts was estimated by the method of Le [23]. This activity was measured by inhibition of the formation of iron (II)-ferrozine complex after treatment of the extracts or standard with Fe<sup>2+</sup>-ferrous ion. The assay was performed over a range of concentrations: 0 to 50 µg/ml, 0 to 40 mg/ml, 0 to 40 mg/ml and 0 to 5 mg/ml, respectively, for standard (EDTA), petroleum ether fraction (EP), ethyl acetate fraction (Ac) and aqueous fraction (Aq). 500 µl of standard or extract were added to 100 µl of FeCl<sub>2</sub> (0.6 % µmol in water) and 900 µl of methanol. The mixture was shaken and allowed to react at room temperature for 5 min. Then, 100 µl of ferrozine (5 % µmol) was added to this solution and shaken again. After 10 min of incubation, the absorbance of the solution was measured at 562 nm. Each reaction was performed in triplicate. The chelating effect was calculated as a percentage of inhibition of ferrozine- Fe<sup>2+</sup> complex formation, given by the formula:

$$\% inhibition = [(A_c - A_s)/A_c] * 100$$

Where A<sub>c</sub> was the absorbance of the control and A<sub>s</sub> was the absorbance of the sample.

Chelating activity was expressed as ChA IC<sub>50</sub>, the concentration that chelates 50% of Fe<sup>2+</sup> ions. It was calculated from the plot of the inhibition percentage of extracts and standard.

#### Antibacterial susceptibility test

##### Bacterial strains

The antibacterial tests were carried out using referenced strains: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and clinical origins strains: *Acinetobacter bowie*, *Serratia sp* and *Candida albicans* obtained from the Laboratory of Bacteriology at Sétif hospital. *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Enterobacter faecalis* (ATCC 49452), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090), *Proteus mirabilis* (ATCC 35659) and *Klebsiella pneumonia* (ATCC

700603) were obtained from Laboratory of Natural Substances at the University of Tlemcen Algeria.

**Antibacterial activity**

Antimicrobial activity *in vitro* was screened using the disc diffusion and micro-dilution methods [24, 25]. For the antibacterial assay, sterile Muller-Hinton agar plates were inoculated by the method of streak with inoculums of the tested bacterial suspension. The bacterial suspension from young colonies of 18 to 24 h was made in sterile distilled water for each strain and its turbidity was adjusted to 0.5 McFarland (10<sup>8</sup> CFU/ml). Then, sterile paper discs of 6 mm diameter were impregnated with 20 µl of plant extract, dried and delicately deposited on the medium. Each extract was tested in triplicate with the presence of sterile disc impregnated with methanol as a negative and standard antibiotic (Gentamicin 10µg) disc as positive control. Plates inoculated with bacteria were incubated at 37°C for 24 h. Antimicrobial activity was evaluated by measuring the zone of inhibition against the test microorganism and the average of the three measurements in all three replicates was calculated. An inhibition zone of 14 mm or more was considered as a high antibacterial activity [26].

**Determination of minimal inhibitor concentration (MIC)**

The MIC was determined using the dilution method for extracts which showed activity on any of the test bacteria and fungus. The test was performed using three dilutions of each extract (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 and 1/32) against the tested microorganisms. Each dilution was tested in triplicate with the presence of a sterile disc as a negative control. The same procedure for preparing bacteria cultures was done as described previously. The MIC was the lowest concentration of plant extracts that exhibited no growth of microorganisms.

**Determination of synergistic antibacterial activities of extracts from *Plantago major* leaves and standard antibiotic**

The assay was done using the same method of the disc diffusion cited previously. To evaluate the synergistic effect, combinations of extracts of *Plantago major* leaves with standard antibiotic (Gentamicin Himedia SD016) were tested for the sensitive bacteria. The standard antibiotic discs (10µg) were impregnated with 20 µl of plant extract: ethyl acetate (100 mg/ml) and aqueous (400 mg/ml) fractions. These discs were let evaporate in an oven and then, delicately deposited on the medium inoculated with the tested bacteria. The plates were incubated at 37°C for 24 h. Results were recorded by measuring the inhibition zone differences around the discs of single standard antibiotic or combined with plant extract [27].

**Statistical analysis**

The experiment results were expressed as means±standard deviations. Statistical Analysis was carried out by Graph Pad Prism 5. The analysis of variance was determined by one-way ANOVA and differences among the means were determined for significance at p<0.05 using a Tukey test.

**RESULTS**

**The weight of the different dried extracts**

The crude dried methanol of *Plantago major* leaves was suspended in water and subjected to fractionation using petroleum ether and ethyl acetate and gave three fractions:

- Two organic phases: petroleum ether (EP) and ethyl acetate (Ac) fractions have weights of 0.44 and 1.34 g respectively.
- Residual aqueous phase (Aq) had a weight of 4.58 g.

These different weights were determined after evaporation to dryness of the different fractions.

**Total phenolic content and total flavonoid content**

Gallic acid was used as a standard compound and the total phenols in extracts from *Plantago major* was expressed as mg GAE/g of extract using the standard curve equation:  $y = 0.012x + 0.073$ ,  $R^2 = 0.997$  (fig. 1). For total flavonoid content, the amount was calculated

using the standard curve equation determined:  $y = 0.031x + 0.019$ ,  $R^2 = 0.998$  (Fig.2), and expressed as milligram quercetin equivalent per gram of dry extract (mg QAE/g extract).

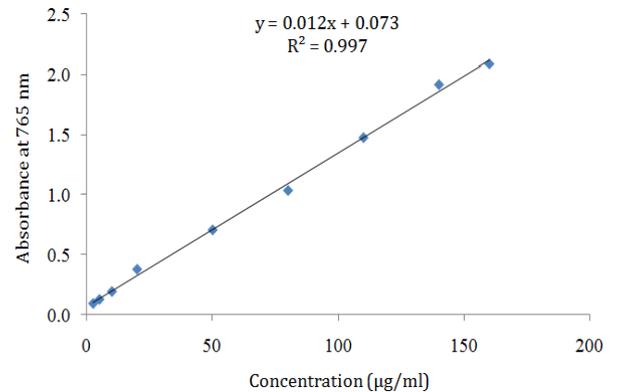


Fig. 1: It shows gallic acid standard curve

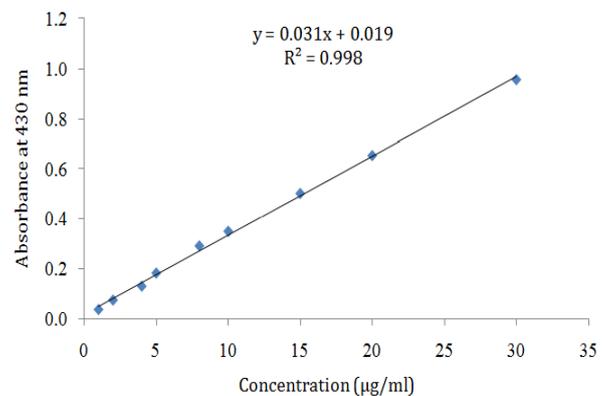


Fig. 2: It shows quercetin standard curve

Total phenolic content and Total flavonoid content of different fractions of leaf extract are represented in table 1. The data indicated that the highest amount of total phenolic was 114.45±2.45 mg GAE/g extract in the ethyl acetate fraction (Ac) and, lowest one of 26.89±0.79 and 5.79±0.10 were evaluated respectively for aqueous (Aq) and petroleum ether (EP) fractions. Whereas, total flavonoid content was found to be highest with values of 5.48±0.06 and 2.34±0.19 mg QAE/g respectively in ethyl acetate and aqueous fractions. The petroleum ether fraction has the lowest level of flavonoids (1.24±0.03µg QAE/mg).

**Table 1: It shows total phenolic and total flavanoid content of leaf extracts from *Plantago major*. EP: petroleum ether, Ac: ethyl acetate and Aq: Aqueous extract**

Fractions	Total phenolic content (mg GAE/g)	Total flavonoid content (µg QAE/mg)
EP	5.79±0.10	1.24±0.03
Aq	26.89±0.79	2.34±0.19
Ac	114.45±2.42	5, 48±0.06

Each value is represented as means±SD (n=3)

**Antioxidant activity**

Polyphenols, such as flavonoids play an important role in antioxidant system in plants. Their anti-oxidative properties are due

to several different mechanisms such as scavenging of free radicals, chelating of metal ions (iron and copper), and inhibition of enzymes responsible for free radical generation [28].

#### DPPH radical scavenging assay

It is well known that the antioxidant effect of the extract on DPPH is due to their ability to scavenge the DPPH free radicals by hydrogen donation. All the extracts were able to reduce the stable radical and exhibited a scavenging activity depending on extract concentration at various degrees. A significant higher scavenging effect against DPPH radical was obtained the ethyl acetate fraction and it increased rapidly at low concentrations ranging from 0.001 to 0.063 mg/ml for. While, a moderate scavenging activity of the aqueous fraction increased from 0.01 to 0.312 mg/ml and the last one was evaluated for the petroleum ether fraction from 0.1 to 1 mg/ml. The

activity was expressed as  $\mu\text{g/ml}$  and represents the concentration of extracts required for 50% of free radical inhibition ( $\text{IC}_{50}$ ). It has been reported that the lower the  $\text{IC}_{50}$  indicates higher activity in this assay. The differences between radical scavenging activities of these fractions were statistically significant, according to Tukey's test at  $p < 0.05$ . The ethyl acetate fraction (Ac) demonstrated a strong antioxidant activity with an  $\text{IC}_{50}$  of  $12.85 \pm 0.27 \mu\text{g/ml}$  (table 2). This fraction was found more effective than the positive control BHA and BHT, which exhibited an  $\text{IC}_{50}$  of  $13.44 \pm 0.3$  and  $20.35 \pm 0.16 \mu\text{g/ml}$  respectively. Low slight activity with an  $\text{IC}_{50}$  of  $109.67 \pm 0.21 \mu\text{g/ml}$  was obtained with the aqueous fraction (Aq), followed by the petroleum ether fraction (EP) with  $439.84 \pm 6.51 \mu\text{g/ml}$ . Thus, phenolic compounds from ethyl acetate extract (Ac) were more efficient antioxidants than aqueous and petroleum ether extracts (Aq and EP).

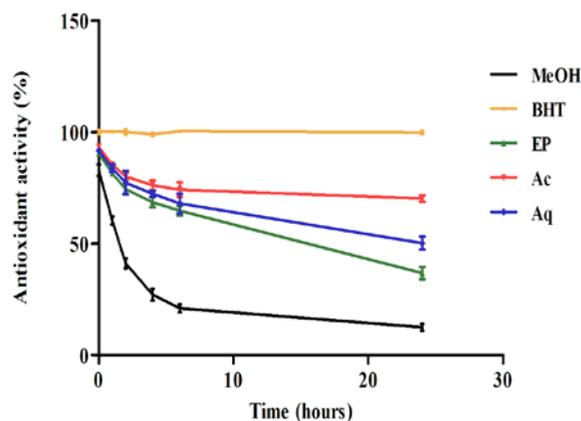
**Table 2: It shows DPPH radical scavenging activity (RSA  $\text{IC}_{50}$ ), antioxidant activity in  $\beta$ -carotene/linoleate test (RAA %) and Ferrous chelating activity (ChA  $\text{IC}_{50}$ ) of leaf extracts from *Plantago major*, and standard**

Sample	RSA $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	RAA (%)	ChA $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
EP	439.84 $\pm$ 6.51	36.72 $\pm$ 2.76	
Aq	109.67 $\pm$ 0.21	50.16 $\pm$ 2.9	1020 $\pm$ 20
Ac	12.85 $\pm$ 0.27	70.48 $\pm$ 1.6	
BHA	13.44 $\pm$ 0.3		
BHT	20.35 $\pm$ 0.16	98.88 $\pm$ 0.63	
EDTA			14.52 $\pm$ 0.32

Values are means $\pm$ SD of three replicates (n=3)

#### Bleaching $\beta$ -carotene test

The  $\beta$ -carotene bleaching method is based on the loss of the yellow color of  $\beta$ -carotene, due to its reaction with radicals (hydroperoxide) formed by linoleic acid oxidation in an emulsion. In the absence of an antioxidant,  $\beta$ -carotene undergoes rapid discoloration and the absorbance decreased rapidly. While, the rate of  $\beta$ -carotene bleaching can be slowed down by neutralizing the linoleate free radical in its presence. This retained the color of the emulsion and also absorbance for a longer time. Thus, the degradation rate of  $\beta$ -carotene-linoleate depends on the antioxidant activity of the extracts. The extract which had the lowest  $\beta$ -carotene degradation rate, exhibit the highest antioxidant activity and vice versa [29].



**Fig. 3: It shows the relative antioxidant activity of *Plantago major* extracts, positive control (BHT) and negative control (methanol) in  $\beta$ -carotene/linoleic acid assay**

fig. 3 showed the comparative  $\beta$ -carotene bleaching rates of the standard (BHT), extracts and the control (methanol). There was considerable variation in the antioxidant activities. The control had a rapid oxidation of  $\beta$ -carotene. But, all extracts have the capacity to inhibit the oxidation of  $\beta$ -carotene and their antioxidant activities

were lower than the standard (BHT). The orders of the antioxidant activity are as follows: BHT>Ac>Aq>EP>Methanol. The most active extract in the lipid peroxidation inhibition assay was ethyl acetate fraction (Ac) with relative antioxidant activity (RAA %) of  $70.48 \pm 1.6\%$ , followed by the aqueous fraction (Aq) with  $50.16 \pm 2.9\%$  (table 2). The petroleum ether fraction was the least active extract ( $36.72 \pm 2.76\%$ ). The standard (BHT) has the strongest antioxidant activity of  $98.88 \pm 0.63\%$ , which is statistically higher than the tested extracts when subject to Turkey's multiple comparison test ( $p < 0.05$ ).

#### Ferrous ion chelating activity

The  $\text{IC}_{50}$  value ( $\mu\text{g/ml}$ ), which is the concentration of the extract or standard that chelate 50% of the ferrous ion, was calculated through linear interpolation between values above and below 50% activity. The aqueous fraction was the most active fraction and possessed an  $\text{IC}_{50}$  of  $1.02 \pm 0.02 \text{ mg/ml}$  which was lower than that of the standard EDTA (table 2). No activity was observed for the ethyl acetate and the petroleum fractions.

#### Antibacterial activity

Antimicrobial activities results of all fractions are shown in (table 3) which indicated that the ethyl acetate (Ac) and aqueous (Aq) fractions were more active against gram-positive than gram-negative bacteria. Similar results were obtained with these fractions against three strains (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter bowie*). On the other hand, no inhibitory effects of the same fractions were found on *Citrobacter freundii*, *Enterobacter faecalis*, *Serratia sp*, *Listeria monocytogenes* and *Candida albicans*. Analysis of the data also showed that the petroleum ether extract (EP) did not show any activity against the test bacteria. The ethyl acetate fraction was more active than aqueous fraction and various antimicrobial effects have been obtained against different strains with inhibition zone ranging from 8.3 to 16.7 mm. *Staphylococcus aureus* showed high sensitivity with a maximum inhibition zone of 16.7 and 15.3 mm respectively to the investigated fractions (Ac and Aq). A maximum inhibition zone of 14.3 mm was exhibited on *Bacillus cereus* for the ethyl acetate fraction (Ac). While moderate activities of 13.3 and 11.3 mm for the same fraction were obtained respectively against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter bowie*. *Klebsiella pneumonia*, *Proteus mirabilis* and *Salmonella typhimurium* exhibited low susceptibility in comparison with the other strains. The antibacterial activities registered were weaker than the positive control used (Gentamicin).

**Table 3: It shows antibacterial and synergistic activity (zone of inhibition in mm) of extracts from *Plantago major* leaves. Ac: ethyl acetate and Aq: aqueous extract, and Gen: positive control (Gentamicin)**

Test microorganisms	Inhibition zone in mm					
	Ac	Aq	C-	Gen	Gen+Ac	Gen+Aq
<i>Staphylococcus aureus</i>	16.7±1	15.3±1	-	27±0.00	36±0.00	36±0.00
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	nt	nt	nt
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13.3±0.6	12±1	-	21±0.00	40±0.00	32±0.00
<i>Serratia sp.</i>	-	-	-	nt	nt	nt
<i>Bacillus cereus</i>	14.3±0.6	-	-	30±0.00	33±0.00	nt
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	nt	nt	nt
<i>Enterobacter faecalis</i>	-	-	-	nt	nt	nt
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8.7±0.6	-	-	20±0.00	20±0.00	nt
<i>Acinetobacter bowie</i>	11.3±0.6	10.3±0.6	-	23±0.00	23±0.00	22±0.00
<i>Proteus mirabilis</i>	8.3±0.6	-	-	27±0.00	30±0.00	nt
<i>Salmonella typhimurium</i>	9.5±0.5	-	-	31±0.00	35±0.00	nt
<i>Listeria monocytogenese</i>	-	-	-	nt	nt	nt
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	nt	nt	nt

C-, Negative control (Methanol), - indicates no inhibition and nt: not tested. Are the results mean±SD of triplicate determinations.

The fractions whose showed activity, were tested further on the same bacteria to determine the Minimum Inhibition Concentrations (MIC). Table 4 shows the MIC values of the extracts against the tested microorganisms. The MIC values for the ethyl acetate fraction (Ac) were 16.7 mg/ml against *Staphylococcus aureus* and 33.5 mg/ml exhibited on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus*. A MIC of 67 mg/ml was obtained by the same fraction on *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Salmonella typhimurium*.

Kamal Metiner et al. [30] have reported that acetone extract demonstrated the highest effective ness against *Bacillus Cereus* with

a MIC of 3.562 mg/ml. A MIC of 14.25 mg/ml was found with the same extract against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*, and MIC of 28.5 mg/ml against *Pseudomonas aeruginosa*. These results are almost similar to those that we had obtained regarding *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

For the aqueous fraction (Aq), a MIC of 57.25 mg/ml was obtained on *Staphylococcus aureus*, and 114.5 mg/ml against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter bowie*.

This data indicate that ethyl acetate (Ac) fraction was highly active as an antimicrobial agent than the aqueous fraction (Aq).

**Table 4: It shows the minimum inhibitory concentration (MIC) of leaf extracts of *Plantago major* against test bacteria. Ac: ethyl acetate and Aq: aqueous extract**

Test microorganisms	MIC (mg/ml)	
	Ac	Aq
<i>Staphylococcus aureus</i>	16.75±0.00	57.25±0.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33.5±0.00	114.5±0.00
<i>Bacillus cereus</i>	33.5±0.00	nt
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	67±0.00	nt
<i>Acinetobacter bowie</i>	33.5±0.00	114.5±0.00
<i>Proteus mirabilis</i>	67±0.00	nt
<i>Salmonella typhimurium</i>	67±0.00	nt

nt: not tested

#### Evaluation of synergistic effect of plant extracts and standard antibiotic

Sometimes the use of a single antibiotic does not produce the desired or effective antimicrobial activity, and to overcome this, treatment with a combination of drugs may be attempted. In this study, the inhibitory effect of Gentamycin was evaluated individually and in combination with ethyl acetate and aqueous fractions from the leaves of *Plantago major*. Synergistic antibacterial activity was obtained by the combination of standard antibiotic with leaf extracts of *Plantago major* and showed greater inhibition zones than a single antibiotic against the tested bacteria (table 2). The maximum synergistic effect had average zones of inhibition from 30 to 40 mm and 27 to 36 mm respectively against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Moderate synergistic activity was obtained against *Bacillus cereus* (from 30 to 33 mm), *Proteus mirabilis* (from 27 to 30 mm) and *Salmonella typhimurium* (from 31 to 35 mm). There were no significant differences between Gentamycin and combination of this antibiotic with plant extract on *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter bowie*.

The synergy found in this study, suggests that the ethyl acetate and aqueous extract of *Plantago major* contain bioactive compounds that can enhance the activity of antibiotic.

#### DISCUSSION

In the present investigation, high amount of phenolic and flavonoids content was obtained in the ethyl acetate extract than that of petroleum ether and aqueous extracts. Among the tested extracts from leaf *Plantago major*, the ethyl acetate extract has a strongest scavenging activity on DPPH as compared to the standards (BHA and BHT). The IC<sub>50</sub> of this fraction was similar to that of 10.7±0.2 mg/ml found in the study of Özge Kaya [31], and higher than inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>: 1369.31µg/ml) scavenged by methanol leaf extract of the same species [32]. An IC<sub>50</sub> of 16.77±1.56 g/ml recorded with seed extract was 1.3 fold lowest compared to inhibitory concentration evaluated in our findings [33]. On the other hand, the β-carotene bleaching method was either used to evaluate the antioxidant capacity of this genus and showed that the ethyl acetate extract was also more active than the other extracts. The ethyl acetate exhibit higher antioxidant activities and this might be due to the presence of high amount of phenolic and flavonoids content. The phenolic compounds contain hydroxyls that are responsible for the radical scavenging redox properties [34].

The ethyl acetate extract showed better antibacterial activity as compared to aqueous extract. This could be due to the presence of greater amount of active antimicrobial components which are more

soluble in organic solvent (ethyl acetate) than water. Our results indicated a high sensitivity of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa* than the antibacterial activity obtained from the same species by Victor et al. [35] and Sharifa et al. [36] (2008); and that of reported for *Plantago mediastepposa* by Marwan et al. [37]. Similar antibacterial activity was obtained in comparison with other species of the same genus such as *Plantago asiatica* [38], *Plantago ovata* [39] and *Plantago lanceolata* [40]. Our results showed a significant synergistic effect against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis* and *Salmonella typhimurium*. The ability of plant extracts to act synergistically with antibiotics could be a new approach to solve the problem of bacterial resistance. Thus, phytochemical studies are required to establish the structure of the active compounds of leaf extracts from *Plantago major*.

## CONCLUSION

*Plantago major* contained significant amounts of phenolic compounds and has a potential antioxidant and antibacterial activities. The synergistic effect of combining antibiotics with bioactive plant extracts against multidrug-resistant microorganisms can lead to new forms of treatment of infectious diseases. There is a great promise for development of novel antiradical compounds and antibacterial agents from this plant for dreadful human diseases and oxidation prevention. Further, studies are being conducted to elucidate the chemical structure of bioactive compounds and will be tested to determine their antioxidant and antimicrobial activities.

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors have no conflict of interest directly relevant to the content of this article.

## REFERENCES

- Pretorius CJ, Watt E. Purification and identification of active components of *Carpobrotus edulis* L. J Ethnopharmacol 2001;76:87-91.
- Laviano A, Meguid MM, Preziosa I, Rossi Fanelli F. Oxidative stress and wasting in cancer. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2007;10:449-56.
- Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. J Pharm Sci 2007;96:2181-96.
- Veale DJH, Furman KI, Oliver DW. South African traditional herbal medicines used during pregnancy and childbirth. J Ethnopharmacol 1992;36:185-91.
- Conway GA, Slocumb JC. Plants used as abortifacients and emmenagogues by Spanish New Mexicans. J Ethnopharmacol 1979;1(3):241-61.
- Matev M, Angelova I, Koichev A, Leseva M, Stefanov G. Clinical trial of a *Plantago major* preparation in the treatment of chronic bronchitis. Vutr Boles 1982;21(2):133-7.
- Markov M. On the pharmacology of *Plantago major*. Poster 6 at the 2<sup>nd</sup>. Int Congress on Ethnopharmacology, Uppsala, Sweden; 1992.
- Gurib-Fakim A, Sewrey M, Gueho J, Dulloo E. Medical ethnobotany of some weeds of Mauritius and Rodriguez. J Ethnopharmacol 1993;39:175-85.
- Seaforth CE, Ballah S, Rollocks S, Craig-James S. Medicinal plants used in Tobago. Fitoterapia 1998;69:523-7.
- Noor H, Juing M, Chee BJ, Kuehb L, Zolkepli O. Medicinal Properties of *Plantago major*: hypoglycemic and male fertility studies. Pertanika J Trap Agric Sci 2000;23(1):29-35.
- Yaremenko KV. Adaptogenes of the natural origin in prophylactic oncology. J Cancer Res Clin Oncol 1990;116-82.
- Lithander A. Intracellular fluid of way bread (*Plantago major*) as a prophylactic for mammary cancer in mice. Tumor Biol 1992;13:138-41.
- Samuelsen AB. The traditional uses chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. J Ethnopharmacol 2000;71:1-21.
- Upson TM, Grayer RJ, Greenham JR, Williams CA, Al-Ghamdi F, Chen FH. Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. J Biochem Syst Ecol 2000;17:991-1007.
- Bougandoura N, Bendimerad N. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. Nepeta (L.). Revue « Nature & Technologie ». B. Sci Agron Biol 2013;09:14-9.
- Bahorun T, Grinier B, Troitin F, Brunet G, Pin T, Luncky M, et al. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. Arzneimittel-Forschung 1996;46(11):1086-9.
- Mansouri A, Embarek G, Kokkalou E, Kefalas P. Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). Food Chem 2005;89:411-20.
- Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. J Sci Food Agric 1998;76:270-6.
- Agrawal S, Kulkarni GT, Sharma VN. A comparative study of the antioxidant activity of methanolic extracts of *Terminalia paniculata* and *Madhuca longifolia*. Free Rad Antiox 2011;1:62-8.
- Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH), for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J Sci Technol 2004;26(2):211-9.
- Tepe B, Sokmen M, Akpulat HA, Sokmen A. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. Food Chem 2006;95:200-4.
- Kartal N, Sokmen M, Tepe B, Daferera D, Polissiouc M, Sokmen A. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. Food Chem 2007;100:584-9.
- Le K, Chiu F, Ng K. Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. Food Chem 2007;105:353-63.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility test. VI<sup>th</sup>ed. Wayne, PA: Approved Standard, M2-A6; 1997.
- Rebecca N, John DK, Deo O, John K. Antibacterial activity and phytochemical screening of eleven plants used as poultry ethnomedicines in Southern Uganda. Agricu J 2011;6(6):303-9.
- Ramzi AAM, Salah AAA, Sidqi H, Faisal MNA, Sama AZA, Ulrike L. Antimicrobial, Antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some yemeni medicinal plants. ECAM. 2010;7(3):323-30.
- Chanda S, Rakholiya K, Dholakia K, Baravalia Y. Antimicrobial, antioxidant, and synergistic properties of two nutraceutical plants: *Terminalia catappa* L and *Colocasia esculenta* L. Turk J Biol 2013;37:81-91.
- Benavente-Garcia O, Castillo J, Marin FR, Ortuno A, Del Rio JA. Uses and properties of Citrus flavonoids. J Agric Food Chem 1997;45:4505-15.
- Maisarah AM, Nurul Amira B, Asmah R, Fauziah O. Antioxidant analysis of different parts of *Carica papaya*. Int Food Res J 2013;20(3):1043-8.
- Metiner K, Özkan O, Seyyal AK. Antibacterial effects of ethanol and acetone Extract of *Plantago major* L. on gram positive and gram negative bacteria. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2012;18(3):503-5.
- Özge K. Investigation of antioxidant and antimicrobial effects of *Plantago major* leaves. Thesis of master of science. Department of Biochemistry, Middle East Technical University, Turkey; 2011.
- Mehni AM, Shahdadi F. Phenolic compounds and antiradical properties of methanolic extracts of *Citrullus colocynthis* and *Plantago major* in Iran. Int J Biosci 2014;4(3):224-8.
- Souri E, Amin G, Farsam H, Barazandeh Tehrani M. Screening of antioxidant activity and phenolic content of 24 medicinal plant extracts. Daru 2008;16(2):83-7.
- Rice-Evans C, Nicholas Miller, George Paganga. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci 1997;2(4):152-9.
- Victor N, Ma Luisa V, Gabriela R, Xavier L. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. J Ethnopharmacol 1996;53(3):143-7.
- Sharifa AA, Neoh YL, Iswadi MI, Khairul O, Abdul Halim M, Jamaludin M, et al. Effects of methanol, ethanol and aqueous extract of *Plantago major* on Gram positive bacteria, Gram negative bacteria and yeast. Ann Microsc 2008;8.

37. Marwan KQ, Nezek SK, Arshad MA. Antibacterial activity of some plant extracts against clinical pathogen. *Int J Microbiol Immunol Res* 2013;1(5):53-6.
38. Chang-Ho J, Young-Il B, Ki-Hwan S, Jine-shang C. DPPH radical scavenging effect and antimicrobial activities of plantain (*Plantago asiatica L.*) extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2004;33(10):1601-5.
39. Motamadi H, Drabpour E, Gholipour M, Seyyed Nejad SM. The antibacterial effect of ethanolic and methanolic extracts of *Plantago ovata* and *Olivaria decumbens* endemic in Iran against some pathogenic bacteria. *Int J Pharmacol* 2010;6(2):117-22.
40. Kesatebrhan Haile Asressu. Antimicrobial activity and phytochemical screening of crude extracts of medicinal plants grown in eastern Ethiopia. *Int J Pharm Bio Sci* 2013;4(4):326-33.

## ملخص

أنجزت هذه الدراسة طبقاً لمخبرين: المحور الأول يخص دراسة النشاطية المضادة للأوكسدة و النشاطية ضد ميكروبية للمستخلصات العضوية والمائية لنبتي *Plantago major L.* و *Carthamus caeruleus L.* أما المحور الثاني فتم فيه محاولة تحديد البنية الكيميائية للحزيمات الفلافونويدية التي أظهرت نشاطية ضد تأكسدية وضد ميكروبية كبيرة. أظهرت نتائج التقدير الكمي الإجمالي لعديدات الفينول الكلية بطريقة Folin-Ciocalteu و الفلافونويدات بطريقة trichlorure d'aluminium أن مستخلصات المذيب العضوي Acétate d'éthyle لكل من جذور وأوراق نبات وأوراق نبات غنية بالمركبات الفينولية، حيث بلغت  $5.53 \pm 99$ ،  $4.46 \pm 316$  و  $2.42 \pm 114$  ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك/مغ مستخلص على التوالي. أما بالنسبة للفلافونويدات فكانت  $0.16 \pm 8.71$ ،  $0.83 \pm 13$  و  $0.06 \pm 5.48$  ميكروغرام مكافئ كارستين/مغ مستخلص على التوالي.

بينت النتائج المتحصل عليها بكمياتها الرقيقة أن بعض هذه المركبات لديها نشاطية ضد تأكسدية وضد ميكروبية عالية. من جهة أخرى أظهرت هذه المستخلصات نشاطية إزاحية عالية لجذر DPPH أكبر من نشاطية، حيث قدر التركيز الممارس للفعل التمثلي بـ  $0.05 \pm 18$  مكر وغرام/مل،  $0.26 \pm 9.6$  مكر وغرام/مل و  $12.87 \pm 0.27$  ميكروغرام/مل على التوالي.

كما تثبت هذه المستخلصات أكسدة  $\beta$ -carotène وحمض oléique بقيمة  $87.28\%$ ،  $82.24\%$  و  $70.48\%$ . على العكس من ذلك أبدى المستخلص المائي قدرة تمخبل كبيرة تجاه أيونات الحديد. في هذه الدراسة أيضاً تم تقييم النشاطية ضد بكتيرية. أظهرت النتائج المتحصل عليها نشاطية مختلفة حسب المستخلصات وتراوحت أقطار التثبيط بين 8 ملم و 27 ملم، وكانت مستخلصات Acétate d'éthyle ذات نشاطية قاتلة تجاه كل من *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus*، *Escherichia coli* و *Acinetobacter baumannii*. بالإضافة إلى ذلك تمت دراسة التأثير التآزري للمنتجات النباتية مع المضاد الحيوي gentamicine. تراوحت أقطار التثبيط بين 13.5 ملم و 26 ملم للمستخلصين معاً وبين 26 ملم و 40 ملم مع المضاد الحيوي. أظهر أيضاً بعض المركبات النقية حسب المظهر بكمياتها الرقيقة قدرات ضد بكتيرية وضد تأكسدية واعدة.

**الكلمات المفاتيح:** *Carthamus caeruleus L.*، *Plantago major L.*، مضادات الأوكسدة، مضادات البكتيريا، مضادات فطرية، عديدات الفينول.

## Résumé :

Notre étude s'articule autour de deux axes dont le premier est consacré à l'étude des activités antioxydantes et antimicrobienne des extraits organiques et aqueux issus de *Carthamus caeruleus L.* et *Plantago major L.*; le second, concerne l'élucidation structurale des molécules flavoniques isolées des deux genres botaniques et ayant montré une activité significative. Les résultats de l'estimation quantitative des polyphénols totaux obtenus par la méthode de Folin-Ciocalteu et des flavonoïdes totaux par la méthode au trichlorure d'aluminium, ont montré que les fractions organiques acétate d'éthyle sont riches en ces composés par rapport aux extraits aqueux. Les taux en polyphénols correspondaient à  $99.94 \pm 3.53$ ،  $316.11 \pm 4.46$  et  $114.45 \pm 2.42$  mg EAG/g d'extrait pour les fractions Ac1, AcF et AcP; et ceux des flavonoïdes étaient de  $8.71 \pm 0.16$ ،  $28.13 \pm 0.38$  et  $5.48 \pm 0.06$  µg EQ/mg d'extrait. Ces fractions ont la capacité de piéger le radical DPPH avec une IC<sub>50</sub> de  $6.18 \pm 0.05$ ،  $9.6 \pm 0.26$  et  $12.87 \pm 0.27$  µg/ml pour les fractions AcF, AqF et AcP, une activité supérieure à celle du standard de référence (BHT), et d'inhiber également l'oxydation couplée de l'acide oléique et du  $\beta$ -carotène avec une AAR de 87.28%, 82.24% et 70.48 % pour les fractions AcF, Ac1 et AcP. De plus, ormis tous les extraits testés, seuls les extraits aqueux ont une activité chélatrice du fer avec l'IC<sub>50</sub> de  $0.164 \pm 0.002$ ،  $0.173 \pm 0.003$  et  $1.02 \pm 0.02$  mg/ml pour les fractions Aq1, AqF et AqP. Par ailleurs, les tests antimicrobiens ont montré des effets variables des extraits testés vis-à-vis des souches bactériennes et les zones d'inhibition variaient de 8 à 27 mm ; et de 13.3 à 25 mm pour les souches fongiques (*Fusarium Var coeruleum*, *Fusarium oxysporum albidinis*, *Aschochyta rabiei* et *Candida albicans*). Les fractions acétate d'éthyle sont bactéricides vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* et *Bacillus cereus*. Par contre, les fractions aqueuses sont bactériostatiques vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Acinetobacter baumannii*. Des effets synergiques ont été aussi mis en évidence non seulement entre les extraits des deux plantes vis-à-vis des souches bactériennes testées (zones d'inhibition de 13.5 à 26 mm), mais également, avec un antibiotique standard : la gentamicine (Zones d'inhibition de 26 à 40 mm). L'évaluation du contenu phénolique de différents extraits des deux plantes étudiées par chromatographie sur couches minces a permis de montrer que les extraits acétate d'éthyle (Ac1) des racines et (AcF) feuilles de *Carthamus caeruleus L.*, et (AcP) des feuilles de *Plantago major L.* sont riches en composés phénoliques. Certaines molécules pures isolées des deux plantes présentent un potentiel antibactérien et antioxydant très significatif.

**Mots clés :** *Carthamus caeruleus L.* ; *Plantago major L.* ; Antioxydants ; antibactériens ; antifongiques ; polyphénols.