

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE FERHAT Abbas-SETIF
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Biochimie

Mémoire
Présenté Pour l'obtention du Diplôme de

MAGISTER en BIOCHIMIE

Option: Biochimie et physiologie expérimentale

Par

BENBRINIS Soumia

THEME

**Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne des
extraits de *Santolina chamaecyparissus***

Devant le jury:

Président	Pr. SENATOR Abderrahmane	Université de Sétif
Rapporteur	Pr. BOURICHE Hamama	Université de Sétif
Examineur	Pr. ARRAR Lekhmici	Université de Sétif
Examineur	Dr. ZERROUG Mohamed Mihoub	Université de Sétif

Année universitaire 2011-2012

Dédicace

*En guise de reconnaissance envers mon **DIEU** le **Tout Puissant***

Je dédie ce modeste travail à la communauté scientifique

Espérant qu'il lui sera utile.

Remerciements

Louange à DIEU, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux de m'avoir aidé à finir ce modeste travail de recherche.

*Merci infiniment à mon encadreur **Pr. BOURICHE Hamama** qui a dirigé ce travail et veillé à ce qu'il soit mené à terme. Je tiens surtout à vous remercier pour vos conseils qui m'ont été de grande utilité.*

*Grand et respectueux remerciement va au **Pr. SENATOR Abderrahmane** d'avoir accepté de présider le jury de mon mémoire. Je vous remercie surtout pour votre entretien, vos conseils ainsi que vos précieuses discussions.*

*Merci aux membres du jury **Pr. ARRAR Lekhmici** et **Dr. ZERROUG Mohamed Mihoub** pour leur présence nécessaire et utile au sein du jury.*

*De très précieux remerciements vont au **Pr. GHARZOULI Kamel** qui n'a pas hésité de me venir humblement en aide, et de ne m'avoir jamais privé de son savoir.*

*Je n'oublie pas de remercier vivement les membres de l'équipe laborantine, en particulier **KADA Seoussen** et **MEZITI Asma** pour leur aide et soutien morale ainsi que ma collègue **SAIDI Asma** qui a partagé avec moi la vie quotidienne au sein du laboratoire. Je remercie aussi tous mes collègues de la promotion 2009-2010 et les étudiants de master et je leur souhaite beaucoup de réussite.*

*Finalement, je tiens à remercier mes très **chers parents**, mes **frères** et ma **sœur** pour leur soutien morale et physique, ainsi que tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidé dans ma tâche.*

Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante et l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux (E.Aq) et l'extrait méthanolique (E.Met) de la partie aérienne de *Santolina chamaecyparissus*, une plante médicinale de la pharmacopée traditionnelle de l'Algérie. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant les tests de DPPH, chélation, blanchissement du β -carotène, peroxydation de l'acide linoléique et le test du pouvoir réducteur. Dans un premier temps, la teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins des deux extraits a été effectuée. L'extrait méthanolique a montré une richesse en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins avec des valeurs de $105.88 \pm 11.67 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait, $20.99 \pm 6.08 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait et $114.82 \pm 13.39 \mu\text{g EAT/mg}$ d'extrait respectivement. Ces valeurs sont supérieures à celles de l'extrait aqueux. Par ailleurs, les deux extraits ont montré une très forte activité anti-radicalaire vis-à-vis du radical DPPH même supérieure à celle du BHT. L'E.Aq et l'E.Met ont montré également une forte activité chélatrice avec des EC_{50} de $61,47 \pm 3,93 \mu\text{g/ml}$ et $197,88 \pm 33,47 \mu\text{g/ml}$ respectivement. Ces activités chélatrices demeurent inférieures à celle du chélateur standard (EDTA). De plus, E.Aq et E.Met ont inhibé la peroxydation couplée de l'acide linoléique/ β -carotène à 80% et 88% respectivement. Ces valeurs sont proches à celles des antioxydants standards utilisés. De même, les deux extraits ont exercé des effets inhibiteurs de la peroxydation lipidique de 66% et 64% respectivement dans le test de peroxydation de l'acide linoléique. En outre, les deux extraits possèdent un pouvoir réducteur important concentration-dépendant. L'effet antibactérien de l'E.Aq et l'E.Met a été évalué par le test de diffusion sur l'agar vis-à-vis de huit souches bactériennes. Les résultats révèlent que seul l'E.Met a exercé un effet antibactérien considérable seulement sur *Enterococcus faecalis* et *Pseudomonas aeruginosa* avec des zones d'inhibition de 8 mm et 8,5 mm respectivement. En conclusion, l'E.Met de *Santolina chamaecyparissus* possède une excellente activité antioxydante et un faible effet antibactérien tandis que l'E.Aq exerce un puissant effet antioxydant et non pas d'effet antibactérien.

Mots clés: Stress oxydatif, *Santolina chamaecyparissus*, antibactérien, antioxydant, polyphénols.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم الفعالية المضادة للأوكسدة و المضادة للبكتيريا للمستخلص المائي و الميثانولي لنبته المستعملة في الطب التقليدي في الجزائر. في بادئ الأمر تم تقدير محتوى *Santolina chamaecyparissus* المستخلص من المركبات متعددة الفينول و الفلافونويدات و الدباغ. بينت النتائج أن المستخلص الميثانولي غني بهذه المركبات و قدر ذلك بـ 11.67 ± 105.88 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك/مغ مستخلص و 6.08 ± 20.99 ميكروغرام مكافئ كارستين/مغ مستخلص و 13.39 ± 114.82 ميكروغرام مكافئ حمض التانيك/مغ مستخلص على التوالي. هذه القيم أعلى من القيم المتحصل عليها مع المستخلص المائي. من جهة أخرى أظهر كل من المستخلص المائي و الميثانولي نشاطية إزاحية جد عالية لجذر DPPH أكبر من نشاطية BHT. كما أظهر المستخلصان قدرة تمخبل كبيرة اتجاه الأيونات و قدر التركيز الممارس لـ 50% من الفعل التمخلي بـ 3.93 ± 61.47 ميكروغرام/مل و 33.47 ± 197.88 ميكروغرام/مل، على التوالي. كما ثبت المستخلص المائي و الميثانولي اكسدة بيتا كاروتين بقيم 88% و 80%، على التوالي وهذه القيم قريبة من القيم المتحصل عليها مع مضادات الأوكسدة المستعملة في هذه الدراسة. كما أبدى كلا المستخلصين فعلا مشبها للأوكسدة الليديية بقيم 66% و 64%، على التوالي. إضافة إلى ذلك يملك المستخلصان قدرة مرجعة مهمة تعتمد على التركيز. في هذه الدراسة تم أيضا تقييم الفعل المضاد للبكتيريا للمستخلصين ضد 8 سلالات بكتيرية و أظهرت النتائج أن المستخلص الميثانولي يثبط فقط سلالاتي *Enterococcus* و *Pseudomonas aeruginosa* و *faecalis* وقدرت أقطار مساحات التثبيط بـ 8.5 مم و 8 مم، على التوالي. كخلاصة يمكن القول أن المستخلص الميثانولي لنبته *Santolina Chamaecyparissus* يملك فعالية كبيرة مضادة للأوكسدة و فعالية ضعيفة ضد البكتيريا في حين يملك المستخلص المائي فعالية عالية مضادة للأوكسدة و لا يبدي أي فعل مضاد للبكتيريا.

الكلمات المفتاح: الجذور الحرة، الإجهاد التأكسدي، مضادات الأوكسدة، مضادات البكتيريا، عديدات

الفينول

Abstract

The aim of this study is to evaluate antioxidant and antibacterial activities of aqueous (Aq.E) and methanolic (Met.E) extracts of *Santolina chamaecyparissus*, a medicinal plant from traditional pharmacopoeia of Algeria. Antioxidant activity was evaluated using the DPPH, chelation, β -caroten bleaching, linoleic acid peroxidation and reducing power tests. Firstly, polyphenols, flavonoids and tannins content was determined. Results showed that Met.E is rich in polyphenols, flavonoids and tannins with values of $105.88 \pm 11.67 \mu\text{g EAG/mg}$, $20.99 \pm 6.08 \mu\text{g EQ/mg}$ and $114.82 \pm 13.39 \mu\text{g EAT/mg}$ respectively. These values are higher than that obtained with Aq.E. On the other hand, both extracts showed a very strong antiradical activity against DPPH radical, even higher than that of BHT. Moreover, Aq.E and Met.E exhibited a strong chelator activity with EC_{50} values of $61,47 \pm 3, 93 \mu\text{g/ml}$ and $197,88 \pm 33,47 \mu\text{g/ml}$, respectively. These values are still lower than that of EDTA. In addition, Aq.E and Met.E inhibited the linoleic acid/ β -caroten coupled peroxidation with 80% and 88% respectively. These values are close to that of standard antioxidants. Moreover, the extracts inhibited linoleic acid peroxidation with 66% and 64% respectively in linoleic acid peroxidation test. In addition, both extracts showed a strong concentration-dependant reducing power. Antibacterial effect of Aq.E and Met.E was evaluated by agar diffusion assay toward eight bacterial strains. Results revealed that Met.E exerted significant effect only on *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* with inhibition zones of 8 mm et 8,5 mm respectively. In conclusion, Met.E of *Santolina chamaecyparissus* has an excellent antioxidant activity and a weak antibacterial one, while Aq.E exerts a very strong antioxidant effect and none antibacterial one.

Key words: oxydatif Stress, *Santolina chamaecyparissus*, antibacterial, antioxidant, polyphenols.

Liste des Abréviations

ERO: Espèces réactives oxygénées

ATCC: American Type Culture Collection

BHT: Butylated hydroxytoluene

BHA: Butylated hydroxyanisole

DPPH: 2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl

EDTA: Ethylene diamine tetraacetic

GPx : Glutathion peroxydase

SOD: Superoxyde dismutase

CAT: Catalase

GSH: Glutathion

NOS: Oxyde nitrique synthase

Liste des Figures

- Figure 1.** Principales sources endogènes d'espèces réactives oxygénées.
- Figure 2.** Les pathologies associées aux espèces réactives oxygénées.
- Figure 3.** Espèces réactives oxygénées et systèmes de protection permettant de limiter leur effet toxique.
- Figure 4.** Oligoéléments nécessaires aux activités des enzymes antioxydantes.
- Figure 5.** Structures de quelques flavonoles (Kaempférol, Quercétine et Myricétine).
- Figure 6.** Sites possibles de la fixation de Fe^{3+} aux cycles A et C des flavonoles.
- Figure 7.** Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques.
- Figure 8.** Aspect morphologique de la plante *Santolina chamaecyparissus*.
- Figure 9.** Droite d'étalonnage de l'acide gallique.
- Figure 10.** Droite d'étalonnage de la quercétine.
- Figure 11.** Droite d'étalonnage de l'acide tannique.
- Figure 12.** Activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus* et des anti-oxydants standards (BHT et Trolox) vis-à-vis du radical DPPH.
- Figure 13.** Activités chélatrices des extraits aqueux et méthanolique de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus* et de l'EDTA vis-à-vis du fer ferreux, exprimées en pourcentage de chélation.
- Figure 14.** Cinétique de blanchissement du β -carotène en présence et en absence des extraits de *Santolina chamaecyparissus* et du BHT et BHA.
- Figure 15.** Activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Santolina chamaecyparissus*, de BHT et de BHA dans le système acide linoléique/ β -carotène.
- Figure 16.** Cinétique de la peroxydation de l'acide linoléique en présence et en absence des extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus* et du BHT.
- Figure 17.** Activité inhibitrice de la peroxydation de l'acide linoléique des extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus* et du BHT.

Figure 18. Pouvoir réducteur des extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus* et du BHT.

Figure 19. Photographies des zones d'inhibition de la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* induites par l'extrait méthanolique de *S. chamaecyparissus* (A) et par la gentamicine, GM (B), et de la zone d'inhibition de la croissance de *Enterococcus faecalis* induite par l'extrait méthanolique de *S. chamaecyparissus* (C).

Liste des Tableaux

Tableau 1. Principaux mécanismes d'action des antibiotiques.

Tableau 2. Principaux composés phénoliques ayant une activité antimicrobienne.

Tableau 3. Teneur des extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus* en polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins.

Tableau 4. Les valeurs des EC₅₀ des extraits de *S. chamaecyparissus* et des antioxydants standards (BHT et Trolox).

Tableau 5. Les valeurs EC₅₀ et l'activité chélatrice des extraits de *S. chamaecyparissus* et de l'EDTA.

Tableau 6. Les EC₅₀ des extraits de *S. chamaecyparissus* et du BHT.

Tableau 7. Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne induites par les extraits aqueux (3mg/disque) et méthanolique (3mg/disque) de *S. chamaecyparissus* et par la gentamicine (10µg/disque).

Sommaire

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction	1
I. Stress oxydant.....	3
I.1. Espèces réactives de l'oxygène	3
I.1.1. Production des espèces réactives oxygénées.....	4
I.1.2. Sources des espèces réactives oxygénées.....	5
I.1.3. Conséquences biologiques des espèces réactives oxygénées.....	7
I.2. Implications pathologiques du stress oxydatif	9
I.3. Les antioxydants.....	10
I.3.1. Antioxydants enzymatiques	11
I.3.2. Antioxydants non enzymatiques	12
II. Infections bactériennes et antibiothérapie	17
II.1. Modes d'action des antibiotiques.....	17
II.2. Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques	19
II.3. Activités antimicrobiennes des polyphénols.....	20
III. La plante <i>Santolina chamaecyparissus</i> L.....	23
III.1. Classification de la plante <i>Santolina chamaecyparissus</i>	23
III.2. Aspect botanique	24
III.4. Composition chimique.....	24
III.3. Usage traditionnel.....	26
III.5. Propriétés biologiques	26

PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIEL ET METHODES.....	27
I. Matériel	27
I.3. Réactifs.....	27
I.4. Solutions de travail.....	28
II. Méthodes.....	29
II.1. Extraction.....	29
II.2. Dosage des polyphénols totaux.....	29
II.3. Dosage des flavonoïdes.....	30
II.4. Dosage des tannins.....	31

II.5. Activité antioxydante	32
II.5.1. Test de DPPH.....	32
II.5.2. Chélation du fer ferreux	33
II.5.3. Blanchissement du β -carotène	33
II.5.4. Peroxydation de l'acide linoléique.....	34
II.5.5. Pouvoir réducteur.....	34
II.6. Activité antibactérienne: test de diffusion sur l'agar	35
II.7. Analyses statistiques	36
RESULTATS ET DISCUSSION.....	37
RESULTATS.....	37
I. Préparation des extraits et dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins	37
II. Activité antioxydante des extraits de <i>Santolina chamaecyparissus</i>	38
II.1. Effet antiradicalaire.....	38
II.2. Effet chélateur du fer ferreux.....	40
II.3. Effet sur le blanchissement du β -carotène	42
II.4. Effet sur la peroxydation de l'acide linoléique	42
II.5. Pouvoir réducteur.....	45
III. Activité antibactérienne	47
DISCUSSION.....	49
I. Préparation des extraits de <i>Santolina</i> <i>chamaecyparissus</i>	49
II. Dosage des polyphénols totaux , des flavonoïdes et des tannins.....	50
III. Activités antioxydantes.....	52
III.1. Activité anti-radicalaire	52
III.2. Activité chélatrice.....	53
III.3. Activité inhibitrice de la peroxydation lipidique	55
III.4. Activité réductrice	57
IV. Activité antibactérienne: méthode de diffusion sur l'agar	58
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	61
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	62

Introduction

Les espèces réactives oxygénées (ERO) sont impliquées dans des processus physiologiques à des faibles quantités. Cependant, l'excès de la production des ERO peut devenir toxique pour les composants majeurs de la cellule, les lipides, les protéines et les acides nucléiques, et donne lieu au stress oxydatif qui sera impliqué dans diverses pathologies à savoir les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), le diabète, les cancers, les maladies inflammatoires, le vieillissement, etc. Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes pour éliminer ou minimiser le dommage oxydatif. Selon le type, les antioxydants peuvent agir en réduisant ou en dismutant les ERO, en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant les métaux de transition libres ou en générant des molécules biologiques antioxydantes d'importance. Sous certaines conditions, ces systèmes antioxydants ne peuvent pas fonctionner efficacement. Cependant, la dysfonction antioxydante qui en résulte peut être manipulée par la supplémentation en antioxydants exogènes alimentaires, soit naturels ou de synthèse. L'utilisation de ces derniers est restreinte en raison des effets indésirables sur la santé humaine.

Par ailleurs, la maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques ce qui a constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale.

Cependant, il y a une préoccupation concernant les effets indésirables des molécules synthétiques destinées à la lutte contre le stress oxydant et les infections bactériennes. Il semble donc important de trouver une alternative à l'utilisation des antioxydants synthétiques et des antibiotiques classiques. Les remèdes à base de plantes constituent une alternative dans les systèmes de soins primaires et donc, une voie prometteuse pour le développement des médicaments traditionnellement améliorés. Récemment, beaucoup de chercheurs s'intéressent aux plantes médicinales pour leur richesse en antioxydants naturels à savoir les polyphénols, les flavonoïdes, les tannins, etc. qui possèdent des activités antioxydantes et antimicrobiennes. De ce fait, l'exploitation de nouvelles molécules bioactives ayant des effets secondaires limités ou inexistantes depuis des sources naturelles et leur adoption comme une alternative thérapeutique aux molécules synthétiques sont devenues des objectifs prioritaires pour les recherches scientifiques et les industries alimentaires et pharmaceutiques.

Le présent travail a été entrepris afin d'évaluer les activités antioxydante et antibactérienne des extraits de la partie aérienne de *Santolina chamaecyparissus*, une plante largement utilisée en médecine traditionnelle en Algérie.

Les objectifs de la présente étude sont :

- Préparation des extraits méthanolique et aqueux de la partie aérienne de la plante *Santolina chamaecyparissus*.
- Evaluation de la teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins des extraits aqueux et méthanolique de *Santolina chamaecyparissus*.
- Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de *santolina chamaecyparissus* par les tests de DPPH, chélation du fer ferreux, blanchissement du β -carotène, peroxydation de l'acide linoléique et le test du pouvoir réducteur.
- Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits de *Santolina chamaecyparissus* vis-à-vis huit souches par le test de diffusion sur l'agar.

I. Stress oxydant

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes de l'organisme en faveur des premiers, ce qui conduit à des dommages cellulaires irréversibles (Pincemail *et al.*, 1999). Le stress oxydatif est un fonctionnement de l'organisme qui est normal tant qu'il ne dépasse pas certaines limites. En effet, tous les organismes vivants qui consomment de l'oxygène produisent des radicaux libres qui sont de petites substances chimiques très oxydées par le contact avec l'oxygène, et dont nos cellules savent normalement très bien se débarrasser. Le stress oxydatif devient anormal lorsque les cellules sont soit dépassées par la quantité de radicaux libres à éliminer, soit ne disposent pas de ressources antioxydantes (vitamines, oligoéléments, enzymes) suffisantes pour les éliminer.

I.1. Espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives oxygénées (ERO) incluant les radicaux libres comme le radical hydroxyl (OH^\cdot), le radical superoxyde (O_2^\cdot) et sa forme protonnée (HO_2^\cdot), le radical peroxy (ROO^\cdot) et les espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) sont des molécules hautement réactives (Chu *et al.*, 2010).

Dans tous les systèmes vivants aérobies, ces espèces sont produites habituellement par voie endogène durant le métabolisme cellulaire (Kumari et Kakkar, 2008). Les ERO sont aussi produites dans des circonstances pathologiques intrinsèques telles que le dysfonctionnement de la mitochondrie et l'involution thymique favorisant l'inflammation chronique (Montagnier, 2009). Des facteurs exogènes à savoir les polluants environnementaux, les radiations, les solvants organiques, le tabac ainsi que les agents pathogènes sont aussi incriminés dans la production des ERO (Ansari, 1997).

Les espèces réactives du nitrogène incluent le radical monoxyde d'azote (NO^\cdot), l'anion peroxy nitrite (ONOO^-), le radical dioxyde d'azote (NO_2^\cdot) et d'autres oxydes d'azote sont produits par la réaction du monoxyde d'azote avec O_2^\cdot (Wiseman et Halliwell, 1996; Simon *et al.*, 2000).

I.1.1. Production des espèces réactives oxygénées

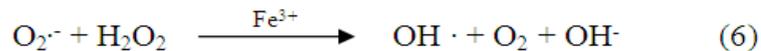
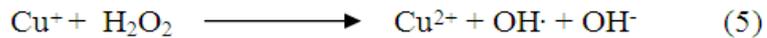
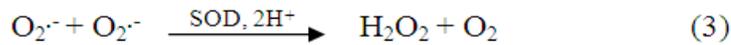
La majeure partie de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente conduisant à la production d'eau (réaction 1). Cette réaction est catalysée par la cytochrome oxydase, accepteur final d'électrons présent dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons située dans la membrane interne mitochondriale (Gardès-Albert *et al.*, 2003).



Toutefois, cette chaîne de transport peut laisser fuir une certaine proportion d'électrons qui vont réduire l'oxygène. C'est ainsi qu'environ 2% de l'oxygène subit une réduction monoélectronique (réaction 2) conduisant à la formation du radical superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ au niveau de l'ubiquinone (Cadenas et Davies, 2000).



Le radical superoxyde est soumis à une réaction de dismutation catalysée par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) pour former le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (réaction 3). Le H_2O_2 peut traverser les membranes biologiques et former le plus puissant des espèces réactives, le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), par interaction avec les métaux de transition comme Fe^{2+} (réaction 4) et Cu^+ (réaction 5) via la réaction de Fenton. Le H_2O_2 et $\text{O}_2^{\cdot-}$ donnent aussi naissance au radical hydroxyle (réaction 6) via une réaction dite de Haber et Weiss (Gardès-Albert *et al.*, 2003; Ahsan *et al.*, 2003).

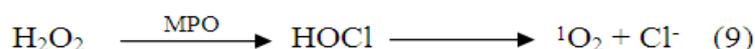


La concentration de H_2O_2 est régulée par des enzymes telles que la catalase (CAT) présente dans les peroxysomes et la glutathion peroxydase (GPx) essentiellement localisée dans le cytosol. La catalase accélère la réaction de dismutation de H_2O_2 en oxygène et en eau

(réaction 7), tandis que la glutathion peroxydase accélère la réaction d'oxydation du glutathion (GSH) par l'eau oxygénée (réaction 8) (Gardès-Albert *et al.*, 2003).



L'eau oxygénée est aussi convertit par la myeloperoxydase (MPO), dans les neutrophiles, en acide hypochloreux (HOCl), un très fort oxydant qui agit comme agent bactéricide dans les cellules phagocytaires (réaction 9). La réaction de HOCl avec H_2O_2 résulte en la production de $^1\text{O}_2$ (Ahsan *et al.*, 2003).



D'autre part, le monoxyde d'azote (NO^\bullet) est une petite molécule générée dans les tissus biologiques par l'oxyde nitrique synthase (NOS) lors du métabolisme de l'arginine en citruline (Guzik *et al.*, 2003). le monoxyde d'azote est un radical réactif abondant qui agit comme une importante molécule de signalisation dans une large gamme de processus physiologiques incluant la transmission nerveuse, la régulation de la pression sanguine, les mécanismes de défense, la relaxation des muscles lisses et la régulation immunitaire (Bergendi *et al.*, 1999). Le monoxyde d'azote peut réagir avec l'anion superoxyde (réaction 10) pour former le peroxynitrite (ONOO^-) qui peut à son tour générer des composés toxiques tels que le dioxyde d'azote (réaction 11) (Halliwell, 1997).



I.1.2. Sources des espèces réactives oxygénées

Les ERO sont produites par différentes sources tant endogènes (figure 1) qu'exogènes :

a) La mitochondrie est la source majeure de la production cellulaire de l'anion superoxyde, principalement du à la réduction partielle de NADH déshydrogénase et la réduction partielle de l'ubiquinone/ubisemiquinone/ubiquinol par le complexe I et III respectivement (Roede et Jones, 2010). Par ailleurs, les peroxysomes semblent être les sources endogènes majeures des

ERO (principalement H_2O_2) via la β -oxydation des acides gras (Beckman and Ames, 1998; Gulcin *et al.*, 2006).

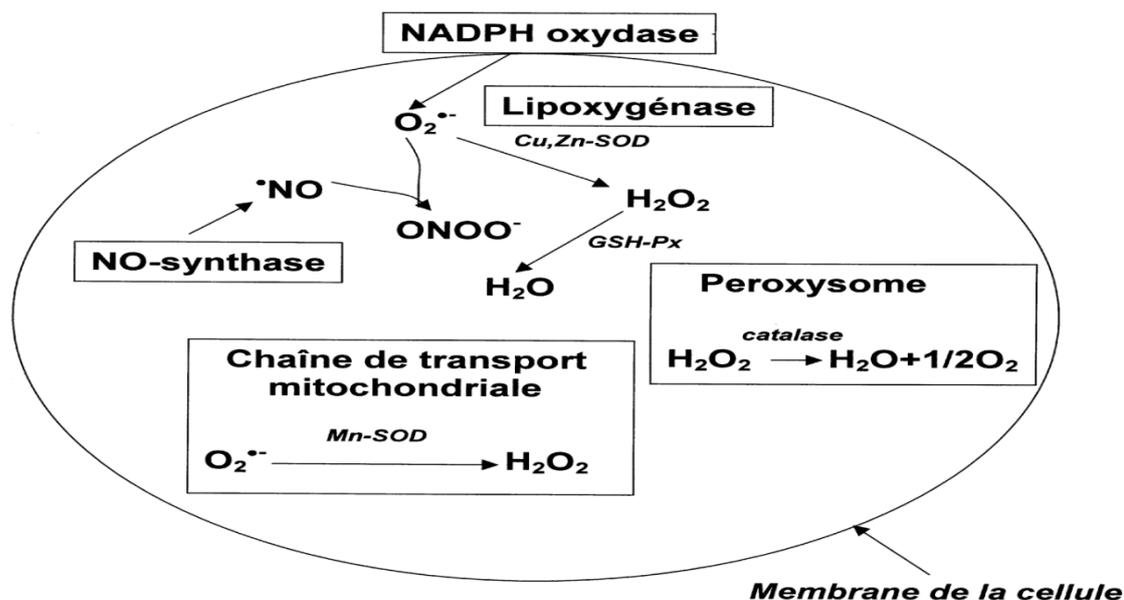


Figure 1. Principales sources endogènes d'espèces réactives oxygénées. GSH-Px: glutathion peroxydase, SOD: superoxyde dismutase (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2002).

b) L'inflammation est par ailleurs une source importante d'ERO. Rodrigo et ses collaborateurs (2011) ont rapporté que lors des processus inflammatoires, les neutrophiles activés produisent l'anion superoxyde via l'action de la NADPH oxydase liée à la membrane sur l'oxygène moléculaire. Les neutrophiles produisent aussi le radical de monoxyde d'azote qui est à l'origine d'une molécule plus réactive, le peroxyde d'azote ($ONOO^{\bullet}$), un puissant oxydant qui peut se décomposer pour former le radical hydroxyle (voir la réaction 11).

c) Plusieurs systèmes enzymatiques produisent les ERO au cours des réactions biochimiques. Le cytochrome P450 peut réduire directement O_2 en $O_2^{\bullet-}$ en causant le stress oxydatif (Goepfert *et al.*, 1995). Le cytochrome P450 peut aussi prendre une voie alternative appelée "cycles redox" dans lesquels un substrat accepte un électron du cytochrome P450 et le transfère à l'oxygène générant l'anion superoxyde (Beckman and Ames, 1998).

d) Au cours du catabolisme des purines, la xanthine oxydoréductase catalyse l'hydroxylation oxydative de l'hypoxanthine en xanthine et par la suite de la xanthine en acide urique en produisant l'anion superoxyde (Vorbach *et al.*, 2003; Chan, 2003).

e) Durant le métabolisme de l'acide arachidonique, les lipooxygénases et les cyclooxygénases génèrent des ERO (Ahsan *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004). De plus, dans des conditions normales, l'oxyde nitrique synthase convertit l'arginine en citruline et en monoxyde d'azote (Guzik *et al.*, 2003).

f) Les métaux toxiques (chrome, vanadium, cuivre) et aussi le fer libres génèrent en présence de H_2O_2 les radicaux $HO\cdot$ par la réaction de Fenton. La plupart des métaux de transition, en particulier le fer et le cuivre, sont des cofacteurs essentiels aux enzymes. Dans leur forme libre, ces ions peuvent, dans les systèmes biologiques, faciliter le transfert d'électrons aux macromolécules susceptibles comme les protéines, les lipides et l'ADN (Zadak *et al.*, 2009).

g) Les facteurs environnementaux tels que le tabagisme, les radiations UV, les médicaments, les réactifs chimiques, les solvants industriels et la pollution sont des sources exogènes des ERO qui peuvent causer l'oxydation des composants biologiques (Zadak *et al.*, 2009).

1.1.3 Conséquences biologiques des espèces réactives oxygénées

La surproduction des ERO est responsable des lésions directes des molécules biologiques ainsi que des lésions cytotoxiques et mutagènes par les produits libérés, notamment lors de l'oxydation des lipides.

L'anion radicalaire superoxyde comme le monoxyde d'azote ne sont pas très réactifs, mais constituent des précurseurs d'autres espèces plus réactives. Les radicaux hydroxyles sont au contraire les plus dommageables pouvant s'attaquer à toutes les molécules biologiques à savoir l'ADN, les protéines et les lipides (Gardès-Albert *et al.*, 2003; Ahsan *et al.*, 2003). En fait, Verdan et ses collaborateurs (2011) ont rapporté que la réaction de Fenton productrice de radicaux hydroxyles est la cause primaire de la mort cellulaire par l'endommagement de l'ADN.

Par ailleurs, la réactivité du peroxyde d'hydrogène réside dans sa capacité de traverser facilement les membranes cellulaires des organites dans le cytoplasme et par conséquent il oxyde un nombre élevé de composés et structures cellulaires (Gião *et al.*, 2010).

a) Peroxydation lipidique

Parmi les cibles les plus susceptibles à l'action des ERO sont les acides gras polyinsaturés comme l'acide linoléique et l'acide arachidonique. L'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir d'une molécule d'acide gras polyinsaturé initie le processus de la peroxydation

lipidique. Un atome d'hydrogène est pris d'une deuxième molécule d'acide gras polyinsaturé résultant en un nouveau radical libre (Ahsan *et al.*, 2003). Ces radicaux peuvent déclencher une chaîne de réactions de peroxydation au niveau des acides gras des phospholipides membranaires, conduisant à l'altération de la membrane et la perte de l'organisation de sa structure de bicouche lipidique qui est nécessaire à la fonction des enzymes liées et des récepteurs (Evans, 2000). Dans une première étape de la peroxydation, les acides gras se transforment en peroxydes lipidiques puis sous l'action des métaux de transition ils se décomposent en une série de sous-produits à savoir les aldéhydes et les hydrocarbures. La malonedialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéanal (HNE) sont des exemples d'aldéhydes résultants de la peroxydation lipidique et sont utilisés comme marqueurs suivis lors de la détection de peroxydation lipidique chez les patients (Pincemail *et al.*, 1999). Les ERO ainsi que la MDA et le HNE peuvent aussi oxyder les lipoprotéines de faible densité (LDL), riches en acides gras polyinsaturés causant un nombre de changements structuraux et fonctionnels (Aruoma, 1999). Ces LDL modifiées sont reconnues par les macrophages au sein desquels elles s'accumulent en formant des cellules spumeuses. En s'accumulant dans l'espace interstitiel, ces cellules contribuent au développement de l'athérosclérose (Pincemail *et al.*, 1999).

b) Oxydation des protéines

Les structures (primaire, secondaire et tertiaire) et les fonctions des protéines sont aussi altérées par les ERO. Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. L'oxydation protéique catalysée par les ions métalliques conduit à l'addition de groupes carbonyles, la formation des liaisons croisées et la fragmentation des chaînes peptidiques. Les produits de la peroxydation lipidique peuvent réagir avec le groupement sulphydryle de la cystéine ou avec les acides aminés basiques (histidine, lysine) affectant leurs caractéristiques biologiques (Ahsan *et al.*, 2003). Le dommage oxydatif des protéines peut affecter la fonction des récepteurs, des enzymes et des protéines de transport, etc., et peut même générer de nouveaux antigènes qui provoquent des réponses immunitaires (Aruoma, 1999; Favier, 2003). Les produits du dommage oxydatif des protéines peuvent contribuer au dommage secondaire comme l'inactivation des enzymes de réparation de l'ADN et la perte de fidélité des ADN polymérases (Aruoma, 1999).

D'autre part, la surproduction des espèces réactives du nitrogène conduit aux réactions de nitrosylation des protéines et par conséquent à l'altération de leurs structures et l'inhibition de leurs fonctions (Valko *et al.*, 2007).

c) Oxydation de l'ADN

Le dommage oxydatif aux acides nucléiques inclue l'addition des bases et des groupes de sucres, cassures au niveau de la simple et double hélice ainsi que la formation des liaisons croisées avec d'autres molécules (Beckman et Ames, 1998). La thymine et la guanine sont plus susceptibles aux modifications suivies de la cytosine et l'adénine. La thymine glycol est le produit d'oxydation majeur, et sa présence dans l'urine sert d'indicateur du dommage de l'ADN. La réduction de la guanine résulte de l'ouverture de sa structure cyclique formant le formamidopyrimidine. Son oxydation, cependant, conduit à la formation du 8-hydroxy-2' déoxyguanosine, un produit majeur dont la présence dans l'urine sert de bio-marqueur du dommage oxydatif de l'ADN et qui est capable d'induire des mutations spécifiques conduisant au développement du cancer (Pincemail *et al.*, 1999).

d) Oxydation des glucides

Le glucose peut s'oxyder en présence des ions métalliques conduisant à la libération des cétoaldéhydes, H_2O_2 et OH^\cdot qui peuvent entraîner la coupure des protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde. Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (Favier, 2003).

I.2. Implications pathologiques du stress oxydatif

Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreuses pathologies (figure 2) comme facteur déclenchant ou associé à des complications (Favier, 2003). Il peut être associé à l'athérosclérose, l'asthme, l'arthrite, la cataractogénèse, l'hyperoxie, l'hépatite, l'attaque cardiaque, les vasospasmes, les traumatismes, les accidents vasculaires cérébraux, les pigments d'âge, les dermatites, les dommages de la rétine, les parodontites et les cancers (Cohen *et al.*, 2000; Packer et Weber, 2001). Néanmoins, la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des radicaux (Favier, 2003)

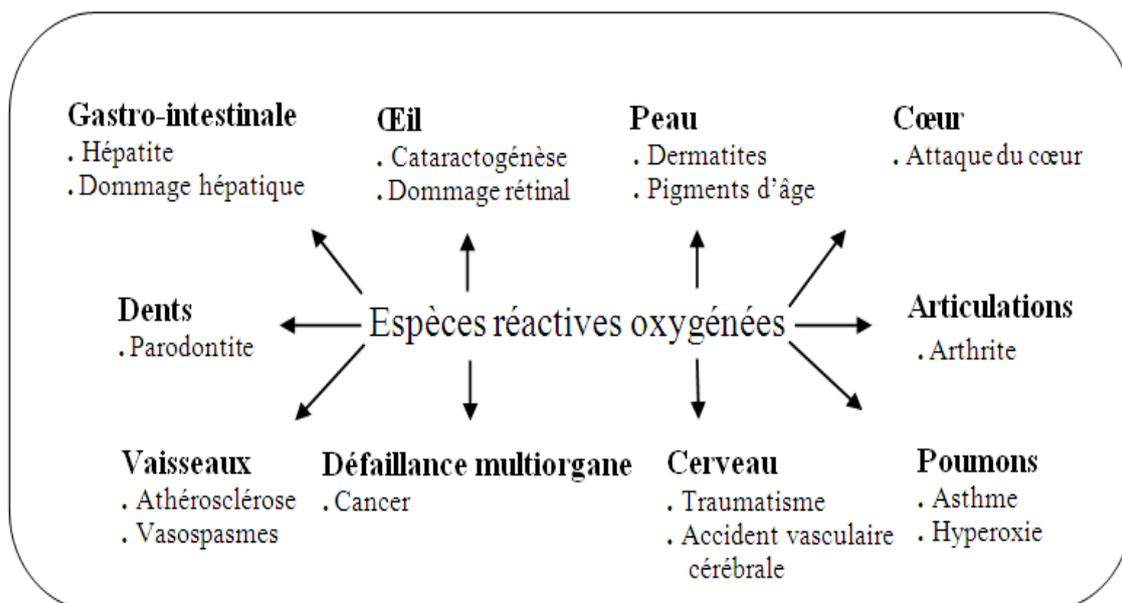


Figure 2. Les pathologies associées aux espèces réactives oxygénées (Lee *et al.*, 2004).

I.3. Les antioxydants

Pour contourner les dommages causés par les ERO, la cellule fait appel à des systèmes de défense appelés antioxydants (figure 3). Un antioxydant est défini comme toute substance ayant la capacité de retarder, prévenir ou réparer un dommage oxydatif d'une molécule cible (Halliwell et Gutteridge, 2007). Ainsi, les antioxydants servent à contrôler le niveau des espèces réactives pour minimiser le dommage oxydatif (Tang et Halliwell, 2010).

I.3.1. Antioxydants enzymatiques

Les superoxyde dismutases (SODs) sont une classe d'enzymes apparentées qui catalysent la dégradation de l'anion superoxyde en O_2 et H_2O_2 . Les cellules humaines possèdent une enzyme SOD mitochondriale ayant le manganèse dans son site actif (MnSOD) ainsi qu'une enzyme SOD cytosolique et une SOD extracellulaire ayant le cuivre et le zinc (Cu-ZnSOD) comme coenzymes (Favier, 2003). Due à sa relative stabilité, le H_2O_2 produit par les SODs est régulé enzymatiquement par les catalases et les peroxydases (Blokhina *et al.*, 2003). Les catalases sont des enzymes localisées dans les peroxysomes et catalysent la conversion du H_2O_2 en H_2O et O_2 . Tandis que les glutathion peroxydases éliminent le H_2O_2 par son utilisation dans l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) et requièrent le sélénium dans leur site actif pour cette activité (Aruoma, 1999). La glutathion

réductase, qui est une enzyme contenant le FAD, génère GSH à partir de GSSG via le NADPH comme source de pouvoir réducteur (Aruoma, 1999).

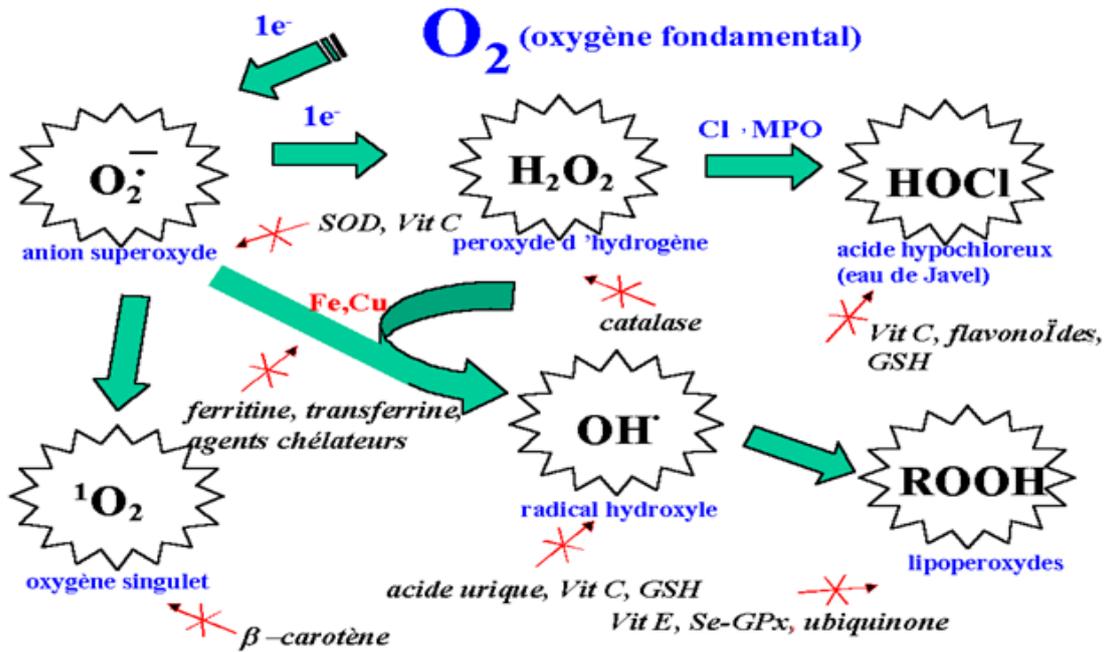


Figure 3. Espèces réactives oxygénées et systèmes de protection permettant de limiter leur effet toxique. GSH: glutathion, Cl^- : anion chlorure, MPO: myéloperoxydase, SOD: superoxyde dismutase, Se-GPx: glutathion peroxydase sélénio-dépendante (Pincemail *et al.*, 1999).

Ces enzymes sont le principal système de protection car elles détruisent non seulement H_2O_2 , mais aussi les peroxydes organiques toxiques formés par l'oxydation des acides gras ou du cholestérol. Cependant, d'autres enzymes antioxydantes comme les peroxyredoxines, la glutathion transférase, les thioredoxines réductases et les thioredoxines peroxydases sont impliquées dans la défense antioxydante de l'organisme et utilisent le NADPH comme donneur d'équivalent réducteur, celui-ci constitue avec le glutathion les plaques tournantes de la défense antioxydante (Favier, 2003).

I.3.2. Antioxydants non enzymatiques

I.3.2.1. Le glutathion

Le glutathion est un tripeptide dont la fonction thiol lui confère un rôle d'antioxydant, voire, de réducteur (donneur d'électron ou d'atome H), qu'il exerce vis-à-vis de nombreuses espèces oxydées, et en particulier vis-à-vis de l'eau oxygénée (voir la réaction 8) et des radicaux

hydroxyles tel que montré dans la réaction 12 (Gardès-Albert *et al.*, 2003). Toutefois, le rôle protecteur de GSH semble provenir de sa capacité à réagir avec les radicaux (réaction 13). Dans ce cas, un phénomène de "réparation" des radicaux R· en produits réduits RH se produit (Lal, 1994).



I.3.2. 2. L'acide ascorbique

L'ascorbate (vitamine C) est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés aussi bien hautement réactifs tels que les radicaux OH· que très peu réactifs tels que les radicaux O₂·-. Sa capacité de donation d'électrons dans une large gamme de réactions enzymatiques et non enzymatiques le qualifie de meilleur agent de détoxification des radicaux oxygénés dans la phase aqueuse (Blokhina *et al.*, 2003). En réagissant avec ces divers radicaux, l'ascorbate (AscH) est oxydé en radical ascorbyle (Asc·) qui est relativement inerte vis-à-vis des molécules biologiques. De plus, l'ascorbate est muni d'une propriété importante: la réparation de deux autres antioxydants, le glutathion (GSH) et l'α-tocophérol (α-TH) à partir de leurs formes radicalaires (réactions 14 et 15). L'ascorbate est recyclé, tout au moins en partie, par dismutation du radical ascorbyle (Gardès-Albert *et al.*, 2003).



I.3.2.3. Le α-tocophérol

Parmi les tocophérols naturels, le α-tocophérol (vitamine E) est le plus efficace *in vivo*. Son rôle essentiel est de capter les radicaux lipidiques peroxydes (LOO·), alkoxy (LO·) et alkyl (L·) qui propagent les chaînes de peroxydation lipidique. La réaction entre les radicaux lipidiques et le α-tocophérol (α-TH) se passe au niveau de l'interphase membrane-eau ou ce dernier perd un atome d'hydrogène et se transforme en radical α-tocophéryle (α-T·), tandis que le radical peroxyde est réduit en une molécule d'hydroperoxyde (réaction 16) (Blokhina *et al.*, 2003). Le recyclage de la vitamine E par des systèmes réducteurs dont le plus important est

l'ascorbate (voir la réaction 15) lui permet de jouer son rôle d'antioxydant à plusieurs reprises (Gardès-Albert *et al.*, 2003)



I.3.2.4. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes tel que le β -carotène constituent une vaste famille de composés qui sont généralement des bons capteurs de radicaux hydroxyles et peroxydes ce qui les rend susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique. En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capter l'oxygène singulet, $^1\text{O}_2$, ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire. L'ensemble de ces propriétés antioxydantes permet d'expliquer, en partie, les bénéfices apportés par les régimes alimentaires basés sur une consommation de fruits, de légumes, de thé et d'autres produits végétaux (Gardès-Albert *et al.*, 2003).

I.3.2.5. Les oligoéléments

Les oligoéléments ou les éléments-trace (zinc, sélénium, cuivre, manganèse) constituent des cofacteurs nécessaires aux activités des enzymes antioxydantes (figure 4). D'autres constituants de l'alimentation, comme les vitamines du groupe B, le chrome ou le magnésium agissent comme des antioxydants indirects via la régulation de l'homocystéinémie (vitamines du groupe B), l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (chrome) ou la lutte contre l'inflammation (magnésium).

La synthèse du glutathion, un des antioxydants le plus important de l'organisme, dépend fortement de l'apport nutritionnel en acides aminés tels que la méthionine (Roussel, 2009).

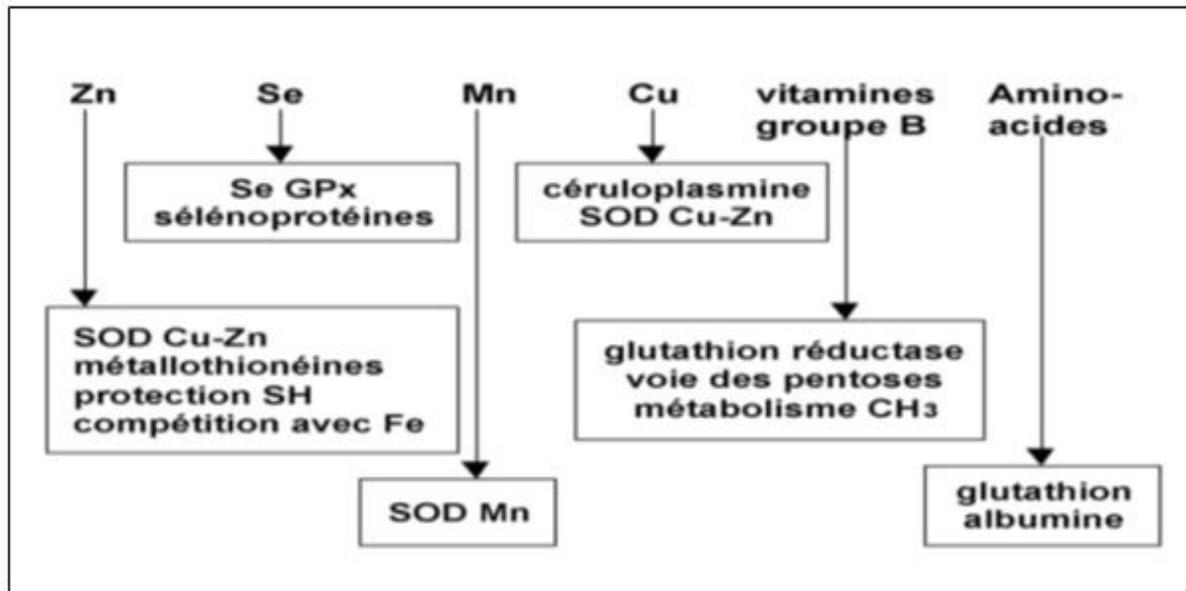


Figure 4. Oligoéléments nécessaires aux activités des enzymes antioxydantes (Roussel, 2009).

I.3.2.6. Les protéines plasmatiques

Les transferrines sont des protéines plasmatiques douées d'activité antioxydante car elles possèdent une capacité de fixation importante au fer. Elles se trouvent saturées à 30% en ce métal de transition de sorte qu'il n'est pas possible de trouver du fer libre dans le sang de sujets sains.

Dans des cas pathologiques, le fer peut être libéré de ces protéines de transport (ferritine, lactoferrine) et se retrouver dans le sang sous une forme libre capable d'initier des réactions productrices de ERO (Pincemail *et al.*, 1999).

I.3.2.6. Les polyphénols

Plusieurs études épidémiologiques ont montré qu'il y a un rapport inverse entre la prise d'aliments riches en polyphénols (les fruits et les légumes) et le risque des maladies liées à l'âge comme les maladies neurodégénératives (Hu, 2003; Bubonja-Sonje *et al.*, 2011). Cette relation est souvent attribuée aux puissantes activités anti-oxydantes des flavonoïdes et d'autres polyphénols associées à leurs propriétés redox permettant d'éliminer les effets d'espèces réactives de l'oxygène (Ketsawatsakul *et al.*, 2000) ainsi que de chélater les différents métaux de transition (Gulcin *et al.*, 2010).

Les flavonoïdes sont de puissants antioxydants vis-à-vis des radicaux libres dus à leur propriété de donation d'atomes d'hydrogène disponibles dans les substituants hydroxyles de leurs groupes phénoliques (Sandhar *et al.*, 2011). Leur capacité de donation d'hydrogène augmente avec l'augmentation de l'hydroxylation de leurs cycles phénoliques. Cette caractéristique structurale peut être observée dans les flavonoles comme le kaempférol quercétine et myricétine ou l'activité antioxydante est croissante en fonction du nombre des groupements OH dans la molécule (figure 5) (Le *et al.*, 2007).

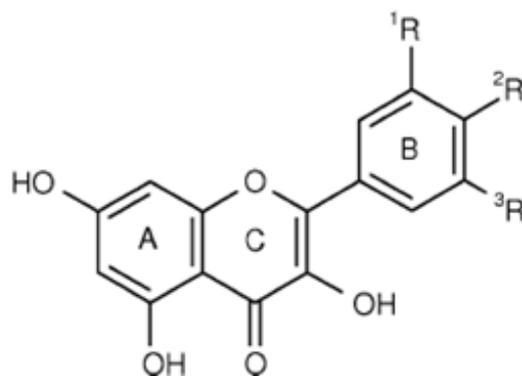


Figure 5. Structures de quelques flavonoles. Kaempférol: ${}^2R=OH$, ${}^1R = {}^3R = H$; Quercétine: ${}^1R= {}^2R=OH$, ${}^3R=H$; Myricétine: ${}^1R= {}^2R= {}^3R=OH$.

En outre, les polyphénols agissent contre la peroxydation lipidique de deux façons: par la protection des lipides cibles contre les initiateurs de l'oxydation ou par stabulation de la phase de propagation. Dans le premier cas, les antioxydants dits préventifs entravent la formation des ERO ou éliminent les espèces réactives responsables de l'initiation de l'oxydation comme O_2^- , 1O_2 et $OH\cdot$. Dans le second cas, les antioxydants dits briseurs de chaîne perdent généralement un atome d'hydrogène en faveur des radicaux propagateurs de l'oxydation ($LOO\cdot$) pour stopper la propagation de la peroxydation (Laguerre, 2007) selon la réaction ci-dessous.



Les flavonoïdes exercent des effets antioxydants aussi par la chélation des ions métalliques. Il a été postulé par Verdan et ses collaborateurs (2011) que la quercétine et myricétine forment des complexes avec les différents métaux (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , etc.) via les groupements hydroxyle des trois cycles: les groupes hydroxyles du cycle B ainsi que les groupes 3-

hydroxy-4-céto et 5-hydroxy-4-céto des cycles A et C. Néanmoins, les deux groupes 3-hydroxy et 5-hydroxy sont particulièrement intéressants car ils sont en compétition pour la fixation du métal (figure 6).

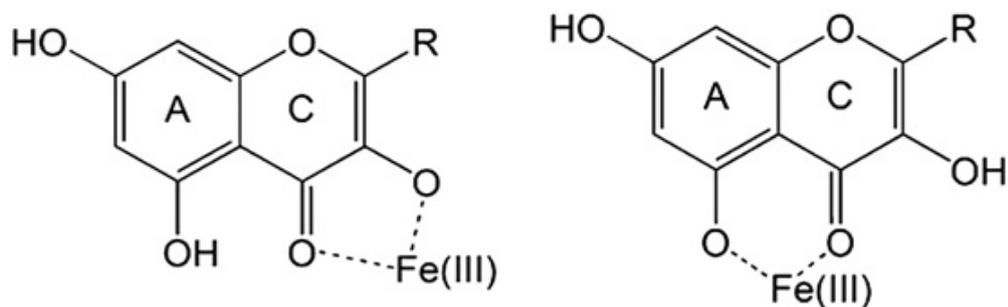


Figure 6. Sites possibles de la fixation de Fe^{3+} aux cycles A et C des flavonoles. Le métal peut se fixer à la position 3-hydroxy-4-céto (gauche) ou la position 5-hydroxy-4-céto (droite) (Verdan *et al.*, 2011).

En plus, les flavonoïdes sont des inhibiteurs des enzymes impliquées dans la production des ERO. En effet, Sandhar et ses collaborateurs (2011) ont rapporté que les flavonoles quercétine, kaempferol et galangine, ainsi que le flavone apigénine sont des inhibiteurs des enzymes du cytochrome P450 impliquées dans la production des ERO.

II. Infections bactériennes et antibiothérapie

Les infections bactériennes sont causées par différents micro-organismes et sont la cause des maladies les plus fatales et des épidémies les plus répandues. De nombreux antibiotiques sont développés pour les traiter, cependant leur utilisation abusive est à l'origine de l'apparition de la multirésistance bactérienne.

Un antibiotique est une substance antibactérienne produite par des micro-organismes (champignons et bactéries) ou de synthèse chimique capable d'inhiber la multiplication ou détruire les micro organismes (Yala *et al.*, 2001). Les antibiotiques peuvent être classés selon l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action (Yala *et al.*, 2001) . La classification des antibiotiques selon leurs mécanismes d'action est cependant la plus répandue.

II. 1. Modes d'action des antibiotiques

Les agents antimicrobiens détruisent les bactéries en s'attaquant directement à leurs structures essentielles (paroi cellulaire, ribosomes, membrane plasmique et ADN) et/ou en perturbant leurs métabolismes et par conséquent leurs fonctions (Tortora *et al.*, 2003).

Les modes d'action majeurs des antibiotiques incluent l'interférence avec la synthèse de la paroi cellulaire (β -lactames), l'inhibition de la synthèse protéique (macrolides et aminoglycosides), l'interférence avec la synthèse de l'acide nucléique (fluoroquinolones) et l'inhibition d'une voie métabolique (Tenover, 2006). L'action sur la membrane est aussi un mécanisme antibactérien très répandu. Les polymixines induisent l'augmentation de la perméabilité membranaire causant la perte du contenu de la cellule bactérienne (Storm, 1997), tandis que le lipopeptide cyclique daptomycine agit, apparemment, par l'insertion de sa queue lipidique à l'intérieur de la membrane, causant sa dépolarisation et éventuellement la mort bactérienne (Carpenter et Chambers, 2004). Le tableau 1 résume les principaux modes d'action des antibiotiques.

Tableau 1. Principaux mécanismes d'action des antibiotiques (Prescott *et al.*, 2003).

Antibiotique	Mécanisme d'action
	Inhibition de la synthèse de la paroi
Pénicilline	Active les enzymes lytiques de la paroi.
Ampicilline	Inhibe les enzymes de transpeptidation impliquées dans le pontage des chaînes polysaccharidiques du peptidoglycane de la paroi bactérienne.
Vancomycine	Se fixe directement sur la terminaison D-Ala- D-Ala et inhibe la transpeptidation.
Bacitracine	Inhibe la synthèse du peptidoglycane en interférant avec l'action des transporteurs lipidiques qui transfèrent les précurseurs de ce polymère à travers la membrane cellulaire.
	Inhibition de la synthèse protéique
Streptomycine	Se fixe à la sous unité 30S du ribosome bactérien pour inhiber la synthèse protéique et provoquer des erreurs dans la lecture de l'ARNm.
Gentamicine	
Chloramphénicol	Se fixe à la sous unité 50S du ribosome et empêche la formation des liaisons peptidiques par l'inhibition de la peptidyl-transférase.
Erythromycine	Se fixe à la sous unité 50S du ribosome et inhibe l'élongation de la chaîne peptidique.
	Inhibition de la synthèse des acides nucléiques
Ciprofloxacine et autres quinolones	Inhibe l'ADN gyrase bactérienne et donc interfère avec la réplication de l'ADN, la transcription et autres activités impliquant l'ADN.
	Destruction de la membrane cellulaire
Polymyxine B	Se fixe à la membrane cellulaire et perturbe sa structure et ses propriétés de perméabilité.
	Antagonisme métabolique
Sulfamide	Inhibe la synthèse de l'acide folique par compétition avec l'acide p-aminobenzoïque.

II.2. Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques

Les bactéries peuvent devenir résistantes aux antibiotiques via différents mécanismes (figure 7). Elles peuvent acquérir des gènes codant des enzymes, telles que les β -lactamases, qui détruisent l'agent antibactérien avant qu'il produise un effet. En plus, elles peuvent acquérir des pompes d'efflux qui extrudent l'agent antibactérien de la cellule avant qu'il n'atteigne le site de sa cible. Par ailleurs, les bactéries peuvent acquérir plusieurs gènes pour une voie métabolique qui aboutit à la production de parois cellulaires altérées ne contenant plus de sites de fixation des agents antimicrobiens, ou encore acquérir des mutations qui limitent l'accès des agents antimicrobiens aux sites intracellulaires des cibles via la régulation négative des gènes codant les porines. Finalement, la résistance peut être acquise via l'échange génétique entre les bactéries, voire, la transformation (incorporation de segments d'ADN libérés dans le milieu extérieur par une autre bactérie après la lyse cellulaire), la conjugaison (échange des gènes de résistance entre deux bactéries via le contact physique) ou la transduction (transfert des gènes de résistance entre les bactéries via les bactériophages) (Tenover, 2006).

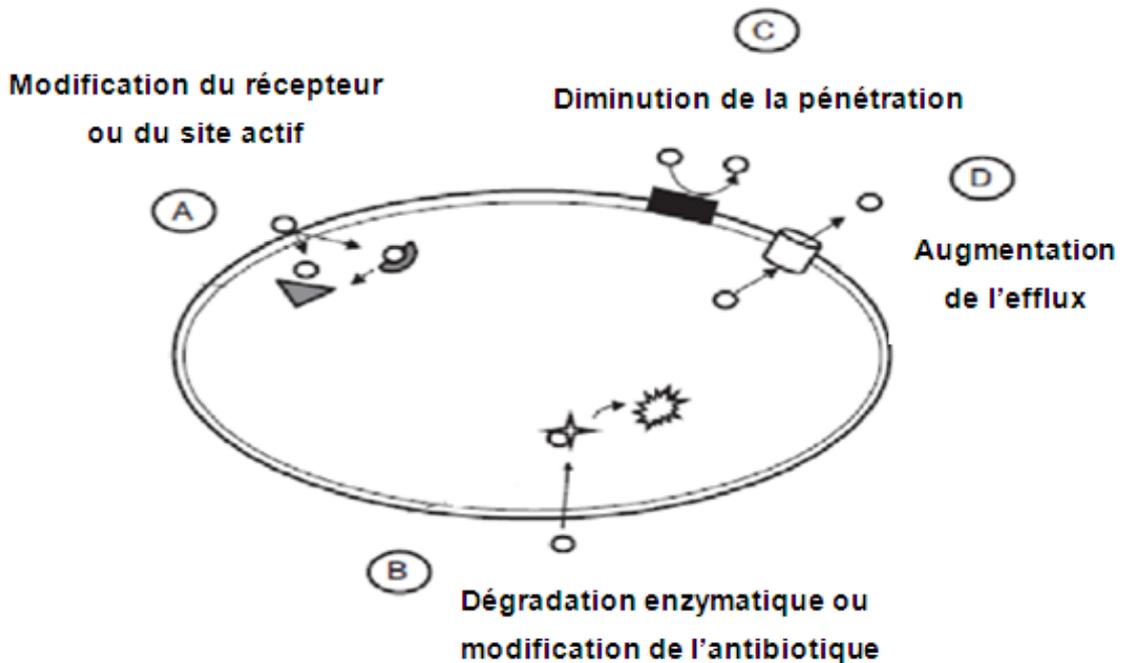


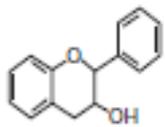
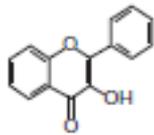
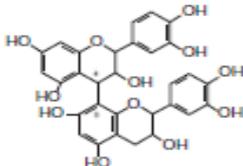
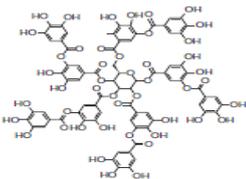
Figure 7. Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques. O : la substance antibiotique, U : récepteur, V : récepteur modifié, □ : pompe d'efflux, ✦ : enzyme, ☼ : dégradation de l'antibiotique (Hemaiswarya *et al.*, 2008).

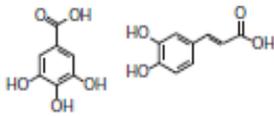
II.3. Activités antimicrobiennes des polyphénols

Les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement du à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité (Cowan, 1999). Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés et plus ils sont inhibiteurs des microorganismes (Scalbert, 1991).

Les flavane-3-ols, les flavonols et les tannins ont reçu plus d'attention du à leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols (tableau 2), à leur capacité de supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne telle que l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte et la neutralisation des toxines bactériennes ainsi qu'à leur capacité d'établir une synergie avec certains antibiotiques (Daglia, 2011). La quercétine et la naringénine sont rapportés être des inhibiteurs de *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus nervous*, *Staphylococcus epidermis* et *Saccharomyces cerevisiae* (Sandhar *et al.*, 2011). En outre, la morine-3-O-lyxoside, morine-3-O-arabinoside et la quercétine-3-O-arabinoside possèdent une action bactériostatique sur les bactéries pathogènes contaminant les denrées alimentaires y compris *Bacillus stearothermophilus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enteric*, *Staphylococcus aureus* et *Vibrio cholera*. Les flavonones ayant un groupement de sucre ont aussi montré une activité antimicrobienne, tandis que certaines flavonolignanes n'ont montré aucune activité inhibitrice envers les microorganismes (Sandhar *et al.*, 2011).

Tableau 2. Principaux composés phénoliques ayant une activité antimicrobienne (Daglia, 2011).

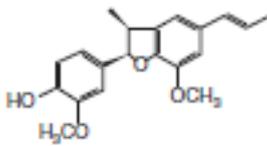
Composés phénoliques et leurs structures	Microorganismes sensibles	Exemples
 <p>Flavane-3-ol</p>	Bactéries	<i>V.cholerae</i> , <i>S.mutans</i> , <i>C.jejuni</i> , <i>C.perfringes</i> , <i>E.coli</i> , <i>B.Cereus</i> , <i>H.pylori</i> , <i>S.aureus</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>A.naeslundii</i> , <i>P.oralis</i> , <i>P.gingivalis</i> , <i>P.melaninogenica</i> , <i>F.nucleatum</i> , <i>C.pneumonia</i>
 <p>Flavonole</p>	Virus	Adénovirus, Entérovirus, Flu virus.
	Champignons	<i>Candida albicans</i> , <i>Microsporium gypseum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> .
 <p>Tannins condensés</p>	Bactéries	<i>S.mutans</i> , <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> .
	Virus	Virus de l'influenza A, type -1 herpes simplex virus (HSV).
 <p>Tannins hydrolysables</p>	Bactéries	Différentes souches de: <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Helicobacter</i> , <i>E.coli</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Lysteria</i> .
	Virus	Le virus Epstein-Barr, les virus Herpes HSV-1 et HSV-2.
	Champignons	<i>Candida parapsilosis</i> .



Bactéries

S.aureus, *L.monocytogenes*, *E.coli*,
P.aeruginosa.

Acides phénoliques



Bactéries

Différentes souches de
Mycobacterium tuberculosis.

Néolignane

Les mécanismes responsables de la toxicité des polyphénols envers les microorganismes incluent l'inhibition enzymatique par les composés oxydés, probablement via la réaction avec les groupes sulfhydryle ou par les interactions non spécifiques avec les protéines (Mason et Wasserman, 1987). L'hydrophobicité des polyphénols tels que les flavonoles est aussi un critère de toxicité qui leur permet de s'insérer dans les phospholipides membranaires et exercer leurs effets antibactériens à l'intérieur de la cellule (Daglia, 2011). La déstabilisation de la membrane cytoplasmique et la rendre perméable, l'inhibition des enzymes bactériennes extracellulaires, l'action directe sur le métabolisme bactérien et la privation des substrats requis pour la croissance bactérienne, spécialement les micronutriments minéraux essentiels comme le fer et le zinc (via la propriété de chélation des métaux) sont des mécanismes adaptés par les proanthocyanidines dans l'inhibition des bactéries (Daglia, 2011).

III. La plante *Santolina chamaecyparissus* L.

Santolina chamaecyparissus L. (*S. chamaecyparissus*), appelée communément la santoline, est une plante vivace appartenant à la famille des Astéracées (composées). En Algérie, elle est connue sous le nom de « Jaada ». Il s'agit d'un sous-arbrisseau qui présente un goût amer et une odeur très forte. Très florifère, la santoline a un parfum proche de la lavande d'où son nom de "Lavande-Coton", et ressemble à un mini cyprès d'où son nom de "Petit Cyprès". Les anciens l'utilisaient pour ses pouvoirs antimites ce qui lui a valu aussi le nom de "Garde-robe". Appelée encore "Aurone femelle" ou "camomille de Mahon", elle faisait partie au Moyen-âge des plantes officinales et a été longtemps cultivée dans les jardins dits de curé. La santoline est originaire de la Méditerranée du sud (le Sud d'Europe et le Nord d'Afrique) (Kisiel *et al.*, 2003). Plus précisément, elle provient des coteaux arides de la région méditerranéenne, des Alpes-Maritimes aux Pyrénées-Orientales, Corse, Espagne, Italie, Dalmatie et l'Afrique septentrionale. Assez rustique, la santoline supporte les embruns, le vent, la sécheresse et ne craint aucune maladie ayant comme seul ennemi l'humidité stagnante.

III.1. Classification de la plante *Santolina chamaecyparissus*

Règne : Plantae

Embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Asteridae Gamopétales

Ordre : Astérales

Division : Magnoliophyta

Famille : Asteraceae

Genre : *Santolina*

Espèce : *Santolina chamaecyparissus* L. (Barrero *et al.*, 1999)

III.2. Aspect botanique

La santoline est un sous-arbrisseau très décoratif et très aromatique de 20 à 60 cm de hauteur, possède de très nombreuses tiges ligneuses très ramifiées qui se développent en touffes denses. Les rameaux minces dressés et pubescents sont couverts de petits poils et munis de feuilles blanchâtres, velues, pubescentes, pennatifides, sessiles, découpées en lobes très courts ne dépassant pas 2 mm sur 2 rangs de part et d'autre de l'axe, subcylindriques ou obovales. Les capitules bombés d'un jaune vif, dépourvus de ligules, larges de 8 à 10mm, sont solitaires au sommet des rameaux (figure 8A, B et C). Les corolles en tube dilaté à la base et coiffant l'ovaire, sur un réceptacle muni d'écailles étroites et obtuses, sont entourées d'un involucre glabre à bractées portant une nervure saillante sur le dos. Les fruits à 4 angles sont dépourvus d'aigrettes (Giner Pons et Rios canavate, 2000).

III.4. Composition chimique

Le genre *Santolina* est représenté par plus de 10 espèces largement distribuées dans la région Méditerranéenne (Derbesy *et al.*, 1989). Plusieurs espèces ont été investiguées phytochimiquement et un nombre de composés acétyléniques (Christensen, 1992), d'huiles essentielles (Sala *et al.*, 2000), de coumarines (Ferrari *et al.*, 2005) et de flavonoïdes (Giner Pons et Rios Canavate, 2000) ont été identifiés. Il paraît que les composés phytochimiques les plus répandus dans différentes espèces de ce genre ayant des activités pharmacologiques sont des sesquiterpènes de type eudesmane, de type germacrane et de type farnesane (Sanz *et al.*, 1991; Barrero *et al.*, 1999), des tri-terpènes de type dammarane (Giner Pons et Rios Canavate, 2000), des hétérocycles acétylènes (Ferrari *et al.*, 2005) et des acétylènes de type éther spiroketalenol (Barrero *et al.*, 1999; Ferrari *et al.*, 2005). Les monoterpènes irréguliers fréquemment rencontrés dans les huiles de *Santolina* sont: artemisia cétone qui présente plus de 60% de la composition chimique de l'huile, artemisia alcool, artemisia triène, santolina triène, santolina alcool, yomogi alcool, chrysanthémyle alcool et parfois lavandulol (Pala-Paul *et al.*, 1999; Cherchi *et al.*, 2001) . Des flavones comme l'apigénine, la lutéoline ainsi que leurs glucosides (glucoronides et ramnoglucosides), des flavanes méthoxylés comme le pectolinarinine, hispiduline, nepétine et jacosidine et des flavonoles méthoxylés en position 7 glucosyl ont été aussi isolés à partir de *S. chamaecyparissus* (Giner Pons et Rios Canavate, 2000).

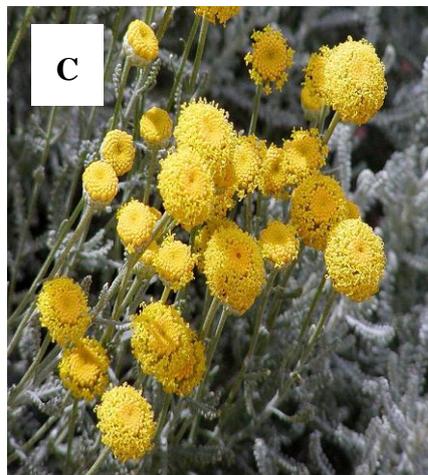
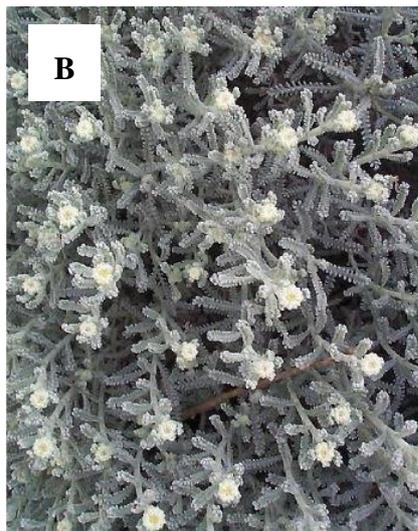


Figure 8. Aspect morphologique de la plante *Santolina chamaecyparissus*, **A:** l'aspect en sous arbrisseau à touffes denses, **B:** le feuillage, **C:** les fleurs.

III.3. Usage traditionnel

Elle est largement utilisée en médecine folklorique grâce à ses propriétés antispasmodiques, analgésiques, désinfectantes, anti-inflammatoires, bactéricides et fongicides (Da Silva, 2004). En infusion, les fleurs et les feuilles sont utilisées comme vermifuges pour les enfants et pour traiter la mauvaise digestion ainsi que les problèmes menstruels (Grosso *et al.*, 2009). L'infusion de la santoline a aussi une action insectifuge sur les pucerons, les acariens et les chenilles. La poudre de la santoline est utilisée localement pour soulager les douleurs liées aux piqûres des insectes. Quand elle est appliquée sur les plaies, elle accélère la cicatrisation (Ahuja *et al.*, 2005; Lopez *et al.*, 2008). La santoline est largement utilisée dans les cas de maux de tête, maux de ventre, comme dépurative, tranquillisante et digestive pour les moutons (Akerreta *et al.*, 2007).

III.5. Propriétés biologiques

La plante *S. chamaecyparissus* est très prisée en phytothérapie notamment grâce à son importante teneur en composés bioactives qui lui donnent des propriétés médicinales non négligeables (Da Silva, 2004). Les extraits de cette plante ont produit une réduction significative de l'activité spontanée chez les souris et ont montré un effet analgésique (Giner *et al.*, 1988). Ils ont inhibé les contractions induites par différents agonistes incluant l'histamine et la sérotonine chez le muscle lisse isolé, comme ils ont induits des effets anti-inflammatoires dans les essais de l'œdème de la patte induit par la carrageenane (Giner *et al.*, 1989). Par ailleurs, la plante s'est révélée une bonne source de composés inhibiteurs de l'activité de la phospholipase A₂ aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Sala *et al.*, 2000). La santoline est aussi utilisée en phytothérapie pour traiter les différents types de dermatites (Da Silva, 2004). Par ailleurs, son huile essentielle a des propriétés antifongiques (Suresh *et al.*, 1997) et est utilisée en parfumerie et en cosmétique.

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

La plante *Santolina chamaecyparissus* (*S. chamaecyparissus*) a été récoltée au mois de juin 2010 de la région de Hammam Essoukhna, Sétif. L'identification a été faite par Pr. Laour Houssine (laboratoire de biologie végétale, université de Sétif). La partie aérienne est nettoyée, séchée à l'ombre et à température ambiante puis stockée à l'abri de la lumière jusqu'à l'utilisation.

I.2. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans l'essai antibactérien sont: les bactéries à Gram⁻ (*Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922) et les bactéries à Gram⁺ (*Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 et *Listeria monocytogenes* ATCC 15313). Elles proviennent du laboratoire de microbiologie de l'hôpital universitaire de Tlemcen, et sont conservées à 4°C dans des tubes à essais contenant le milieu solide Mueller Hinton jusqu'à l'utilisation.

I.3. Réactifs

Les réactifs chimiques utilisés dans cette étude sont : 2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl (DPPH), Ferrosine [3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1, 2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid sodium salt], β -carotène, Tween 20, Tween 40, DMSO, acide trichloracétique (TCA), EDTA, thiocyanate de potassium (KCN), FeCl₃, butylated hydroxyanisole (BHA), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman- 2-carboxylic acid (Trolox), réactif de Folin-Ciocalteu, acide gallique, acide tannique, quercétine, ferricyanide de potassium [K₃Fe(CN)₆] et Na₂CO₃ proviennent de Sigma (Allemagne). Chlorure ferreux (FeCl₂), Acide linoléique et 2, 6 di-tert-butyl-4-methyl phenol (BHT) proviennent de Fluka (France). Les sels utilisés pour la préparation des tampons ainsi que les solvants sont obtenus de Panreac, Riedel-de Haén et Prolabo.

I.4. Solutions de travail

- L'acide gallique (200 µg/ml): préparé dans l'eau distillée.
- Carbonate de sodium Na_2CO_3 (7,5 %) : préparé dans l'eau distillée.
- Réactif de Folin : dilué au 1/10 avec de l'eau distillée.
- Quercétine (100 µg/ml) : préparée dans le méthanol.
- AlCl_3 (2%) : préparé dans le méthanol.
- Acide tannique (2mg/ml) : préparé dans le méthanol.
- Solution de DPPH (0,1mM): préparée dans l'éthanol.
- BHT (2mg/ml) : préparé dans le méthanol.
- Trolox (10 µg/ml) : préparé dans l'éthanol.
- Solution de FeCl_2 (0,6mM): préparée dans l'eau distillée (test de chélation du fer ferreux).
- Ferrosine (5 mM): préparée dans le méthanol 80%.
- FeCl_2 : (0,6mM): préparée dans l'eau distillée (test de chélation du fer ferreux).
- EDTA (100 µg/ml) : préparé dans l'eau distillée.
- β -carotène (0,5 mg/ml) : préparée dans le chloroforme.
- BHA (2mg/ml): préparé dans le méthanol.
- Thiocyanate de potassium (30%) : préparé dans l'eau distillée.
- FeCl_2 (0,4%) : préparé dans de l'HCl 3,5% (test de peroxydation de l'acide linoléique).
- FeCl_3 (0,1%) : préparé dans l'eau distillée.
- TCA (10%) : préparé dans le tampon PBS (0.2M, pH 6,6).
- $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})$ 1% : préparé dans le tampon PBS (0.2M, pH 6,6).

II. Méthodes

II.1. Extraction

II.1.1. Préparation de l'extrait aqueux

L'extrait aqueux de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus* est préparé selon la méthode de Ljubuncic et ses collaborateurs (2005) avec légères modifications. Brièvement, 30 g de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus* sont mis à bouillir dans 300 ml d'eau distillée pendant 20 min. Après filtration, l'extrait récupéré est soumis à une centrifugation. La solution obtenue est lyophilisée (lyophilisateur PHYWE chrisa) pour obtenir une poudre jaune qui est conservée à -32°C jusqu'à son utilisation.

II.1.2. Préparation de l'extrait méthanolique

L'extrait méthanolique de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus* est préparé selon la méthode de Motamed et Naghibi (2010). Une quantité de 30 g de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus* est mis à macérer dans 300 ml méthanol/eau (8 : 2, V/V) sous agitation pendant 24 heures, à l'ombre et à température ambiante. L'extrait récupéré par filtration est soumis à une évaporation du méthanol sous pression réduite à 45°C dans un rotavapeur (BÜCHI). La solution obtenue est séchée pour obtenir une poudre brune foncée qui est conservée à -32°C jusqu'à son utilisation.

II.2. Dosage des polyphénols totaux

Le contenu en polyphénols totaux des extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus* est estimé par la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par Li et ses collaborateurs (2007). Un volume de 200 µl des solutions d'extraits à différentes concentrations sont ajoutées à 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (10%). Après 4 min, 800 µl de carbonates de sodium (75 g/l) sont additionnés. Le mélange est laissé réagir 2 heures à température ambiante, puis la lecture est faite à 765 nm. L'acide gallique (20-140 µg/ml) est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage (figure 9) à partir de laquelle la concentration des polyphénols totaux des extraits est calculée. Le résultat est exprimé en µg d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg d'extrait).

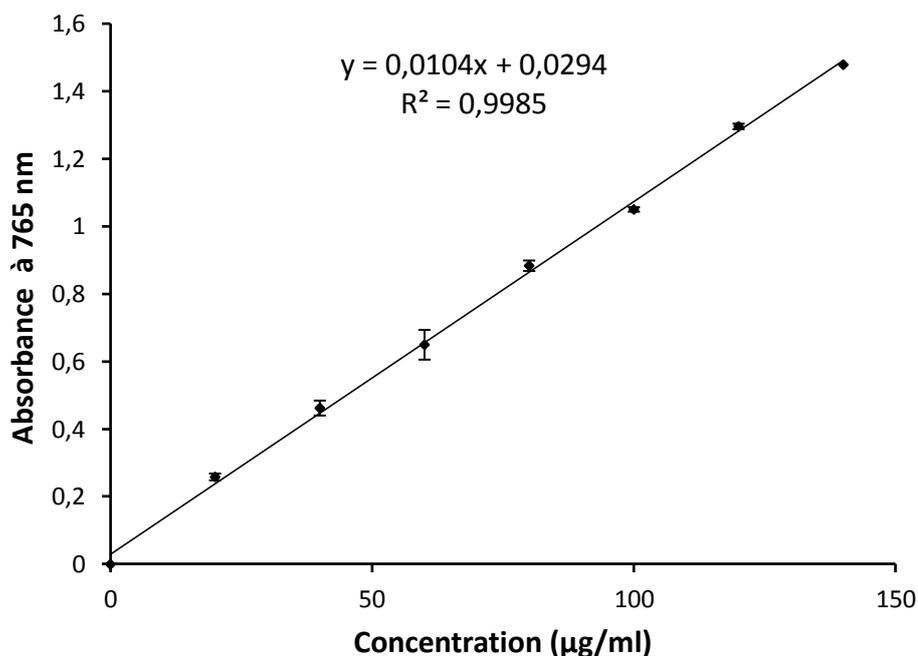


Figure 9. Droite d'étalonnage de l'acide gallique

II.3. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun *et al.* 1996) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus*. Un millilitre de la solution d'ALCl₃ (2%) est ajouté à 1 ml de la solution de l'échantillon (extraits ou standard) contenant différentes concentrations. Le mélange est laissé réagir pendant 10 min puis la lecture est faite à 430 nm. La concentration des flavonoïdes dans les extraits est calculée à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (2-14 µg/ml) et exprimée en microgramme d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait) (figure 10).

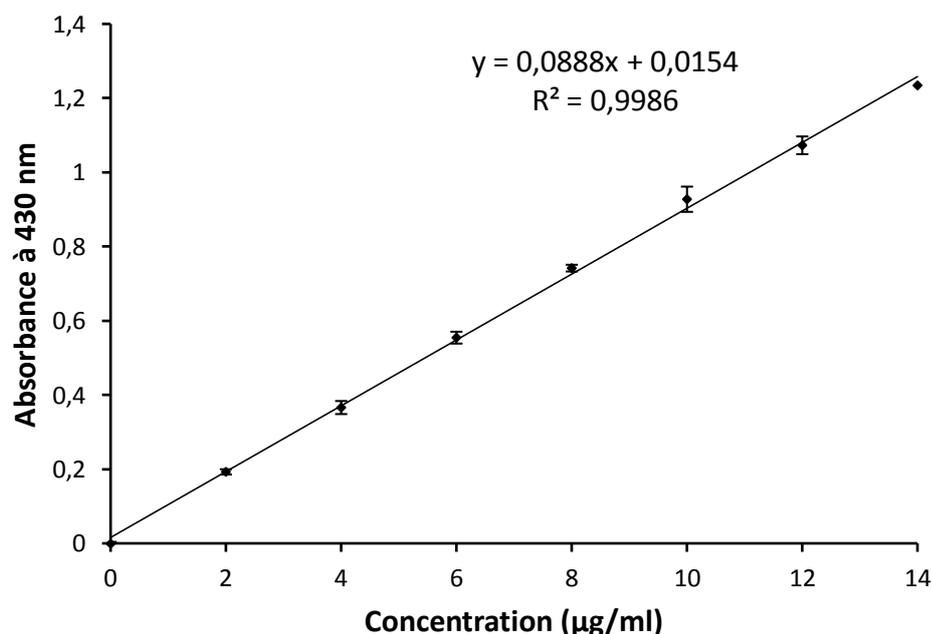


Figure 10. Droite d'étalonnage de la quercétine

II.4. Dosage des tannins

La détermination de la teneur en tannins des extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus* est faite par le test de précipitation de l'hémoglobine en utilisant le sang frais des ovins suivant la méthode décrite par Gharzouli et ses collaborateurs (1999). Brièvement, un volume de sang hémolysé est mélangé avec un volume d'échantillon (extraits ou acide tannique) à différentes concentrations. Le mélange est laissé réagir pendant 20 min à température ambiante, puis soumis à une centrifugation 4000 rpm pendant 10 min à 4°C. La lecture du surnageant est faite à 576 nm contre l'eau distillée. Une gamme d'étalonnage est établie avec l'acide tannique (100-550 µg/ ml) (figure 11). La teneur en tannins des extraits est exprimée en microgramme d'équivalents d'acide tannique par milligramme d'extrait. Le taux de précipitation de l'hémoglobine des deux extraits est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux de précipitation (\%)} = [(Ac-At)/Ac] \times 100$$

Ac : absorbance du contrôle.

At : Absorbance du test.

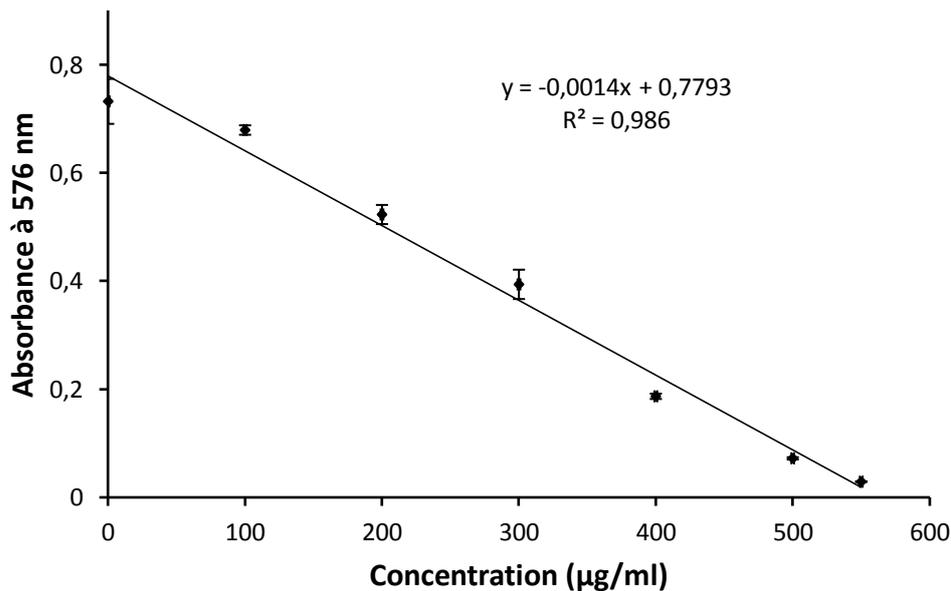


Figure 11. Droite d'étalonnage de l'acide tannique

II.5. Activité antioxydante

II.5.1. Test de DPPH

L'effet scavenger des extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus* vis-à-vis du radical DPPH est évalué selon la méthode décrite par Que et ses collaborateurs (2006). Un volume de 2 ml de la solution de DPPH (0.1mM) est mélangé avec 2 ml des solutions d'extraits ou des antioxydants standards (BHT, Trolox) à différentes concentrations. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm. Le pourcentage de l'activité anti-radicalaire est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = \frac{[Ac - At]}{Ac} \times 100$$

Ac : absorbance du contrôle.

At : Absorbance du test.

La concentration effectrice (EC_{50}) définie comme la concentration de l'échantillon qui produit 50% d'effet piègeur du radical DPPH est déterminée.

II.5.2. Chélation du fer ferreux

La capacité chélatrice des extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus* est déterminée selon la méthode de Le et ses collaborateurs (2006) qui est basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-Ferrosine après le traitement des échantillons avec les ions Fe²⁺. Cinq cent microlitres des solutions d'extraits ou du chélateur standard (EDTA) à différentes concentrations sont additionnées à 100 µl de FeCl₂ (0.6 mM) et 900 µl de méthanol. Après 5 min d'incubation, cent microlitres de ferrosine (5 mM) sont ajoutés, et le mélange est agité et laissé réagir pendant 10 min pour permettre la complexation du fer résiduel. L'absorbance du complexe Fe²⁺-ferrosine est mesurée à 562 nm. L'activité chélatrice est exprimée en pourcentage en utilisant l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité chélatrice (\%)} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Ac : absorbance du contrôle.

At : Absorbance du test.

Pour une caractérisation meilleure de l'efficacité des extraits, la concentration effectrice (EC₅₀) définie comme la concentration de l'échantillon qui produit 50% d'effet chélateur ainsi que l'activité chélatrice exprimée en mg d'équivalent d'EDTA/g d'extrait sont calculées.

II.5.3. Blanchissement du β-carotène

La capacité des extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus* de prévenir le blanchissement du β-carotène est déterminée selon la méthode décrite par Bougateg et ses collaborateurs (2009). Brièvement, 0,5 mg de β-carotène dans 1 ml de chloroforme est mélangée avec 25 µl d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Le chloroforme est évaporé sous pression réduite à 45°C au rotavapeur, ensuite 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés et le mélange obtenu est agité vigoureusement. Le milieu réactionnel contient 2.5 ml de l'émulsion de β-carotène/acide linoléique et 0.5 ml des solutions d'extraits ou des antioxydants de référence (BHT, BHA). Le mélange est placé dans un bain-marie et incubé à 50°C pendant 2 heures. L'oxydation de l'émulsion précédente est suivie par la mesure de l'absorbance de chaque échantillon juste après sa préparation (t = 0 min) et à des intervalles de 15 min jusqu'à la fin de l'expérience (t = 120 min) à 470 nm. Le contrôle négatif contient 0.5 ml d'eau distillée à la place de l'extrait aqueux, et de 0,5 ml de méthanol à la place de

l'extrait méthanolique et des antioxydants standards. L'activité antioxydante (AA%) est exprimée en pourcentage d'inhibition par rapport au contrôle négatif selon l'équation suivante:

$$\text{Activité antioxydante \%} = [1 - (\text{At}_0 - \text{At}_{120}) \text{ test} / (\text{At}_0 - \text{At}_{120}) \text{ contrôle}] \times 100$$

At₀: absorbance au temps t = 0.

At₁₂₀: absorbance au temps t = 120 min.

II.5.4. Peroxydation de l'acide linoléique

L'activité antioxydante totale des extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus* est déterminée selon la méthode de thiocyanate ferrique décrite par Gulcin et ses collaborateurs (2005) avec légères modifications. Premièrement, une émulsion de l'acide linoléique est préparée en mélangeant 0,028 g d'acide linoléique, 0,028 g de Tween 20 et 10 ml de solution tampon phosphate (0,04 M, pH 7.0). Le milieu réactionnel contient 600 µl de solutions d'extraits ou de l'antioxydant standard (BHT) à une concentration bien définie (50µg/ml) et 600 µl de l'émulsion de l'acide linoléique. Le contrôle négatif contient tous les réactifs sauf l'échantillon à tester (extraits ou antioxydant standard) qui est remplacé par un volume égale de la solution tampon. Après agitation, le mélange est incubé à 25°C à l'obscurité. La lecture est faite après 15 min d'incubation puis chaque 24 heures pendant 96 heures, en mélangeant 1ml d'éthanol, 20 µl KCN, 20 µl d'échantillon et 20 µl de FeCl₂ et après 3min, l'absorbance est lue à 500 nm contre un blanc d'éthanol. Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique est calculé selon l'équation suivante:

$$\% \text{ d'inhibition de peroxydation} = [(\text{Ac} - \text{At}) / \text{Ac}] \times 100$$

Ac : absorbance du contrôle.

At : Absorbance du test.

II.5.5. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus* est déterminé selon la méthode de Topçu et ses collaborateurs (2007) avec quelques modifications. Différentes concentrations d'extraits ou de l'antioxydant standard (BHT) sont mélangées avec 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6.6) et 2,5 ml de ferricyanide de potassium [$K_3Fe(CN)_6$] (1%). Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 2,5 ml de TCA (10%), 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de $FeCl_3$ (0,1%) sont additionnés et l'absorbance est lue à 700 nm contre un blanc qui contient tous les réactifs sauf le $FeCl_3$. La valeur EC_{50} est la concentration de l'échantillon qui correspond à une absorbance égale à 0,5 et est calculée à partir du graphe de l'absorbance en fonction de la concentration de l'échantillon.

II.6. Activité antibactérienne: test de diffusion sur l'agar

L'activité antibactérienne des extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus* est évaluée par la technique de diffusion sur l'agar (méthode des disques) selon la méthode décrite par Falleh et ses collaborateurs (2008) vis-à-vis de huit souches bactériennes (à Gram⁻: *Citrobacter freundii*, *Salmonella typhimurium*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomona aeruginosa* et *Escherichia coli* et à Gram⁺: *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* et *Listeria monocytogenes*). Les différentes espèces bactériennes sont d'abord repiquées par la méthode des stries dans des boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller Hinton, puis incubées à 37 °C pendant 24 h. Une ou plusieurs colonies de chaque culture pure sont prélevées et transférées dans l'eau physiologique à une turbidité équivalente à 0,5 McFarland. Un prélèvement à partir de cet inoculum sert à ensemercer de nouvelles boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller Hinton par technique d'écouvillonnage. Des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre, stériles, sont chargés de 15 µl des extraits aqueux ou méthanolique (3mg par disque) et placés à la surface de ces boîtes. Les disques des contrôles négatifs sont imprégnés d'eau distillée et de DMSO. Des disques standards contenant l'antibiotique de référence (gentamycine, 10 µg par disque) servent de contrôles positifs. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24h. Les résultats sont exprimés en diamètres des zones d'inhibition produites autour des disques.

II.7. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne \pm SD. Les valeurs EC₅₀ (concentration effective à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)]. les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification sont faites par le test ANOVA univarié suivi du test de Tukey. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05.

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS

I. Préparation des extraits et dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins

La décoction de 30 g de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus* a donné 3 g d'extrait aqueux (10%) qui a l'aspect d'une poudre fine hygroscopique jaune, tandis que la macération de la même quantité dans le méthanol a donné 3,78 g (12,6%) d'extrait cristallin de couleur brune foncée.

La teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins des extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus* est déterminée en utilisant les méthodes de Folin-Ciocalteu, de trichlorure d'aluminium et la méthode de précipitation de l'hémoglobine respectivement. Les résultats montrent que l'extrait méthanolique est plus riche en polyphénols, en flavonoïdes et en tannins que l'extrait aqueux (tableau 3) avec des facteurs de 1.43, 1.64 et 2.77 respectivement.

Les capacités des extraits de *S. chamaecyparissus* et de l'acide tannique à faire précipiter l'hémoglobine sont calculées en termes de pourcentage. Les résultats montrent que l'acide tannique induit une précipitation totale de l'hémoglobine à une concentration de 550 µg/ml. L'extrait aqueux a des effets tannants de 6%, 8% et 11% à des concentrations de 1 mg/ml, 1.5 mg/ml et 2 mg/ml respectivement. A ces concentrations, l'extrait méthanolique exerce des effets tannants de 13%, 26% et 43% respectivement.

Tableau 3. Teneur des extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus* en polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins.

Extrait	Polyphénols ^(a)	Flavonoïdes ^(b)	Tannins ^(c)
Extrait aqueux	73,84 ± 5,49	12,81 ± 0,71	41,43 ± 13,66
Extrait méthanolique	105,88 ± 11,67	20,99 ± 6,08	114,82 ± 13,39

^(a) µg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait.

^(b) µg d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait.

^(c) μg d'équivalent d'acide tannique par milligramme d'extrait.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 à 4 essais \pm SD.

II. Activité antioxydante des extraits de *Santolina chamaecyparissus*

II.1. Effet antiradicalaire

Les résultats obtenus montrent que les extraits aqueux et méthanolique de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus* ont une activité antiradicalaire concentration dépendante (figure 12).

Un effet antiradicalaire maximal de 91% est exercé par les extraits méthanolique et aqueux à des concentrations de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivement. Le BHT, utilisé comme antioxydant standard à montré un effet maximal de 93% envers le radical DPPH à une concentration de 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$, tandis que le Trolox à exercé un effet maximal de 97% à une concentration de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Les concentrations qui piègent 50% des radicaux libres ou concentrations effectrices (EC_{50}) sont calculées et représentées dans le tableau 4. Les différences entre les extraits et les antioxydants standards (BHT et Trolox) et entre les extraits eux-mêmes sont statistiquement significatives ($p < 0,05$).

Tableau 4. Les valeurs des EC_{50} des extraits de *S. chamaecyparissus* et des antioxydants standards (BHT et Trolox). Les valeurs représentent la moyenne de trois essais \pm SD.

Echantillon	EC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Extrait aqueux	22,64 \pm 0,82
Extrait méthanolique	16,65 \pm 3,18
BHT	71,96 \pm 1,23
Trolox	3,23 \pm 0,03

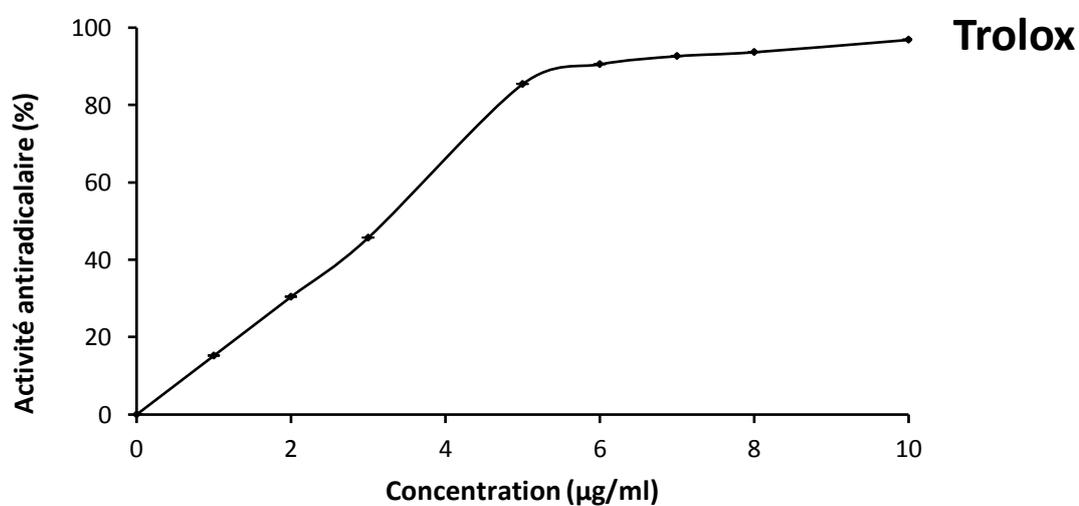
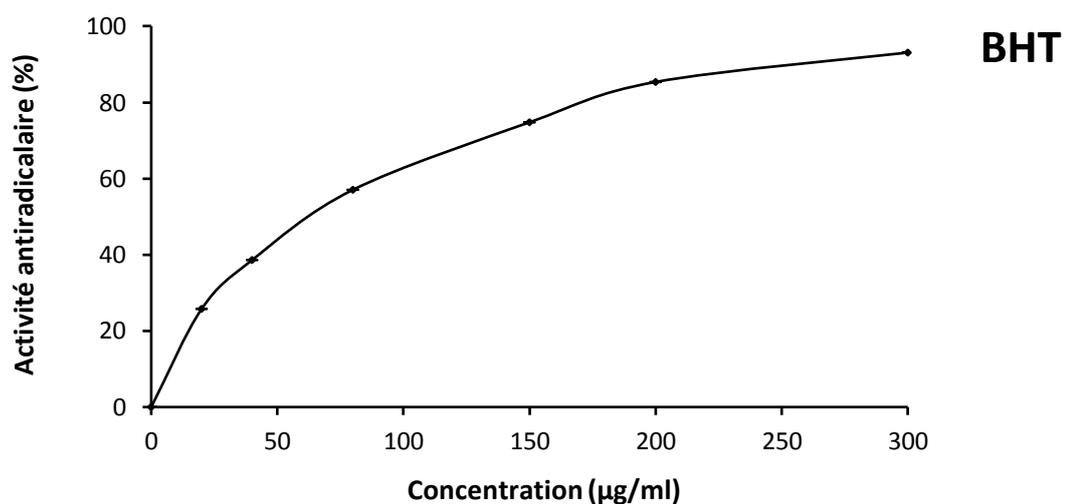
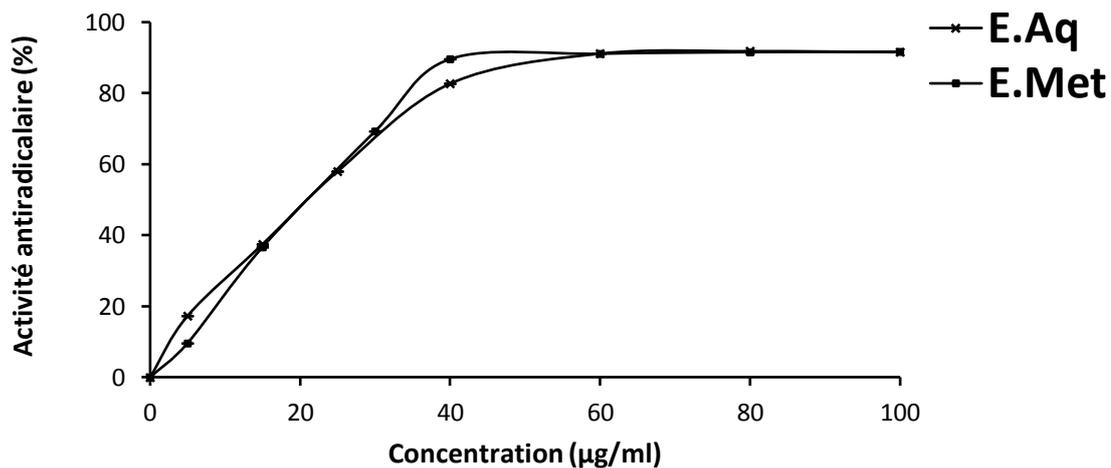


Figure 12. Activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique (E.Met) et de l'extrait aqueux (E.Aq) de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus* et des anti-oxydants standards (BHT et Trolox) vis-à-vis du radical DPPH. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD.

II.2. Effet chélateur du fer ferreux

Les résultats montrent que les extraits de *S. chamaecyparissus* exercent un effet chélateur concentration dépendant (figure 13). Des effets chélateurs maximaux de 94% et 92% sont atteints par les extraits aqueux et méthanolique à des concentrations de 200 µg/ml et 450 µg/ml respectivement. L'EDTA exerce un effet chélateur de 100% à une concentration de 14 µg/ml. Les différences entre l'extrait aqueux, méthanolique et l'EDTA sont statistiquement significatives ($p < 0,05$).

Le tableau 5 résume les concentrations effectrices à 50% (EC_{50}) et l'activité des extraits en termes d'équivalents d'EDTA.

Tableau 5. Les valeurs EC_{50} et l'activité chélatrice en termes d'équivalents d'EDTA des extraits de *S. chamaecyparissus* et de l'EDTA. Les valeurs représentent la moyenne de trois essais \pm SD.

Echantillon	EC_{50} (µg/ml)	Activité chélatrice (mg E-EDTA/g d'extrait)
Extrait aqueux	$61,47 \pm 3,93$	$82,44 \pm 6,77$
Extrait méthanolique	$197,88 \pm 33,47$	$26,18 \pm 4,57$
EDTA	$5,05 \pm 0,09$	---

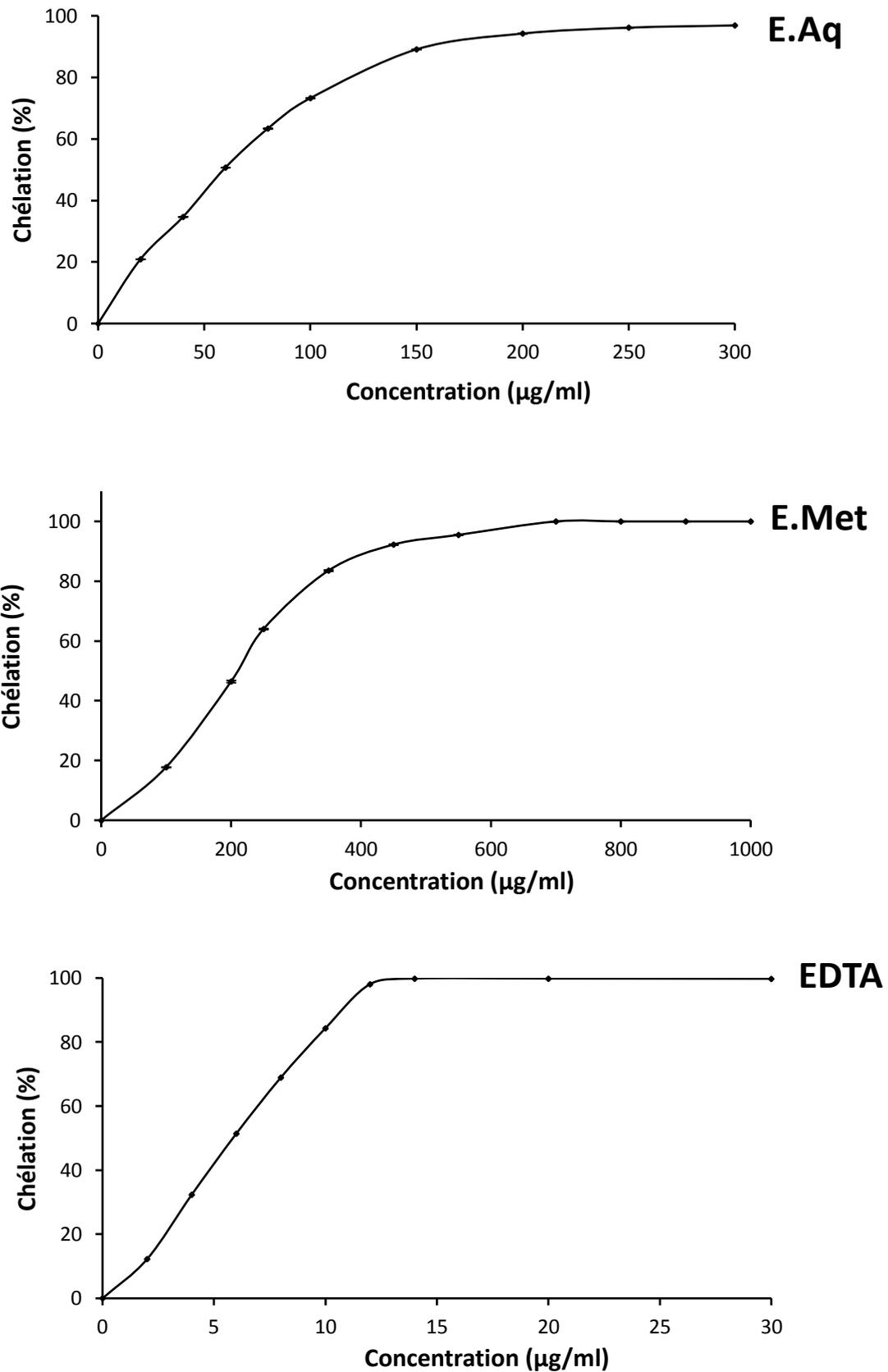


Figure 13. Activités chélatrices des extraits aqueux (E. Aq) et méthanolique (E . Met) de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus* et de l'EDTA vis-à-vis du fer ferreux, exprimée en pourcentage de chélation. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD.

II.3. Effet sur le blanchissement du β -carotène

La figure 14 représente les cinétiques de blanchissement du β -carotène en présence et en absence des extraits de *S. chamaecyparissus* ainsi que du BHT et BHA. Les absorbances initiales des contrôles négatifs aqueux et méthanolique sont 0,970 et 1,007 atteignant, après 120 min, des valeurs minimales de 0,025 et 0,031 respectivement indiquant une peroxydation totale du β -carotène, tandis que les absorbances des extraits aqueux et méthanolique varient de 0,933 et 0,924 au temps 0 à des valeurs finales de 0,823 et 0,837 respectivement indiquant une forte activité antioxydante par rapport au contrôles négatifs. Cependant, les absorbances du BHT et du BHA restent stables tout au long des 120 minutes.

Les résultats montrent que les extraits aqueux et méthanolique ont presque les mêmes activités antioxydantes de 80% et 88% respectivement (figure 15). Cependant, ces valeurs sont significativement ($p < 0,05$) inférieures à celles du BHT (100%) et du BHA (98%).

II.4. Effet sur la peroxydation de l'acide linoléique

La figure 16 montre la cinétique de la peroxydation de l'acide linoléique en présence et en absence des extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus* et du BHT. Les absorbances sont stables tout au long de 96 heures, indiquant une forte activité antioxydante par rapport au contrôle négatif.

A une concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$, les extraits aqueux et méthanolique exercent des effets inhibiteurs de la peroxydation de 66% et 64% respectivement au temps 96 heures. Ces valeurs sont statistiquement similaires à celle du BHT qui exerce un effet inhibiteur de 68% à la même concentration (figure 17).

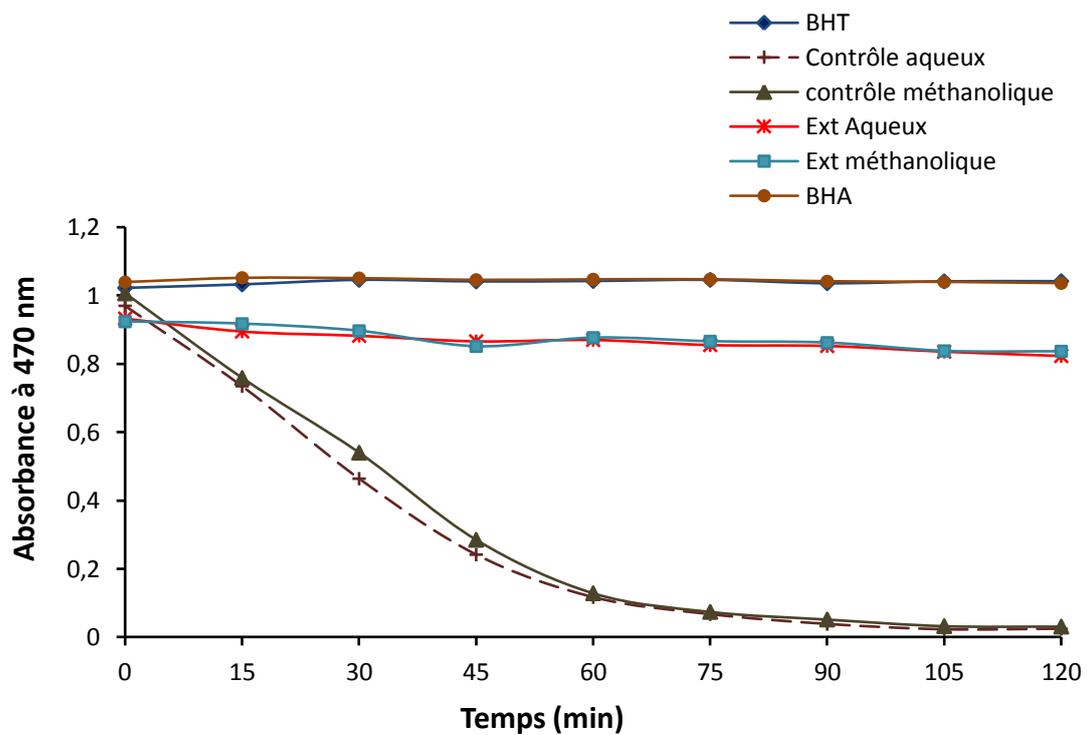


Figure 14. Cinétique de blanchissement du β -carotène à 470 nm en présence et en absence des extraits de *Santolina chamaecyparissus* et de BHT et BHA. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD.

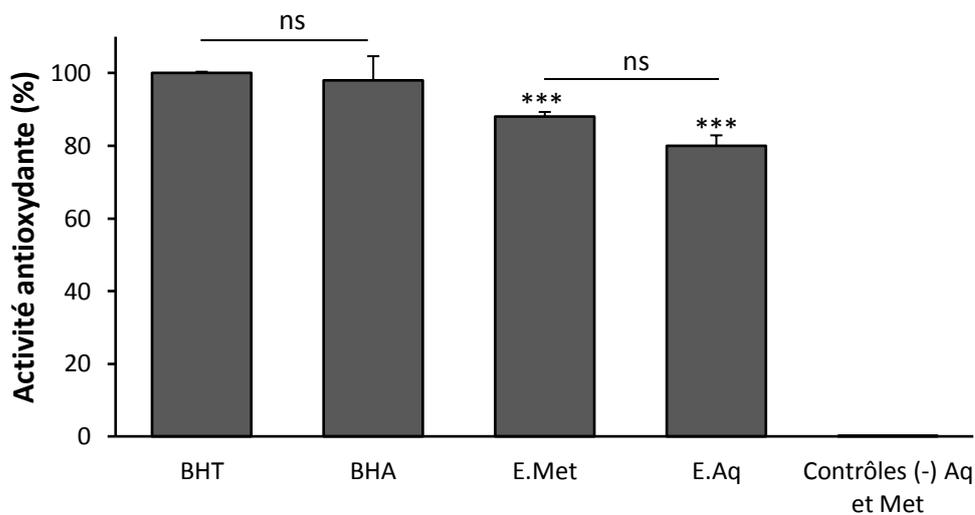
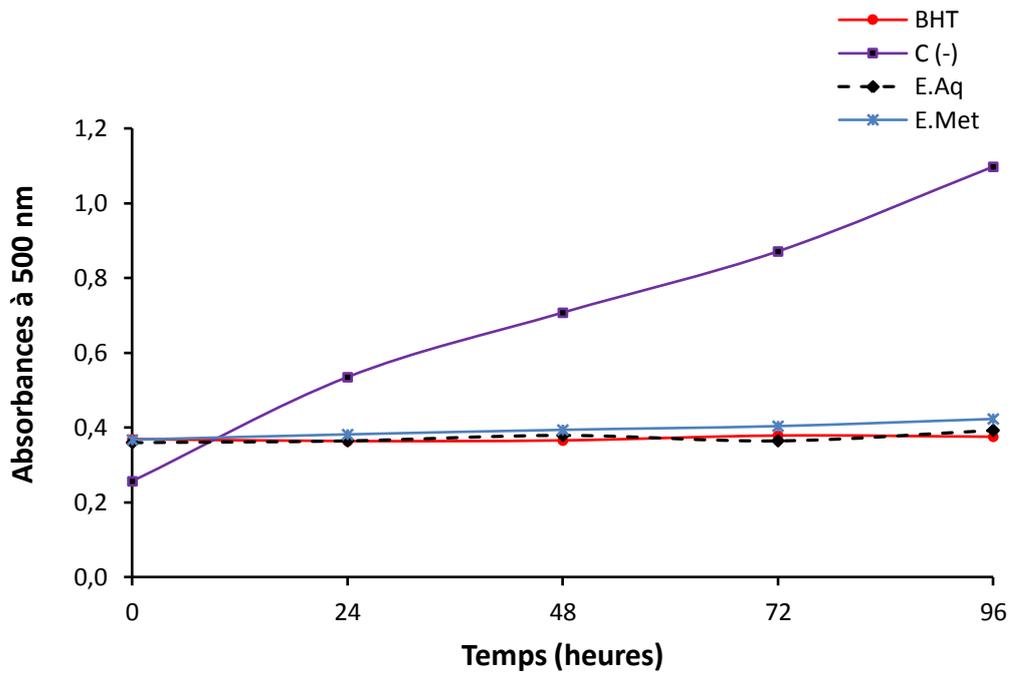


Figure 15. Activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Santolina chamaecyparissus*, de BHT et de BHA dans le système β -carotène/acide linoléique. Les valeurs sont la moyenne de trois essais \pm SD. La comparaison est réalisée avec le BHT; *** : $P \leq 0,0001$, ns: non significatif.



Figure

16. Cinétique de la peroxydation de l'acide linoléique en présence et en absence des extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus* et du BHT à 500 nm. Les valeurs représentent la moyenne de trois essais \pm SD.

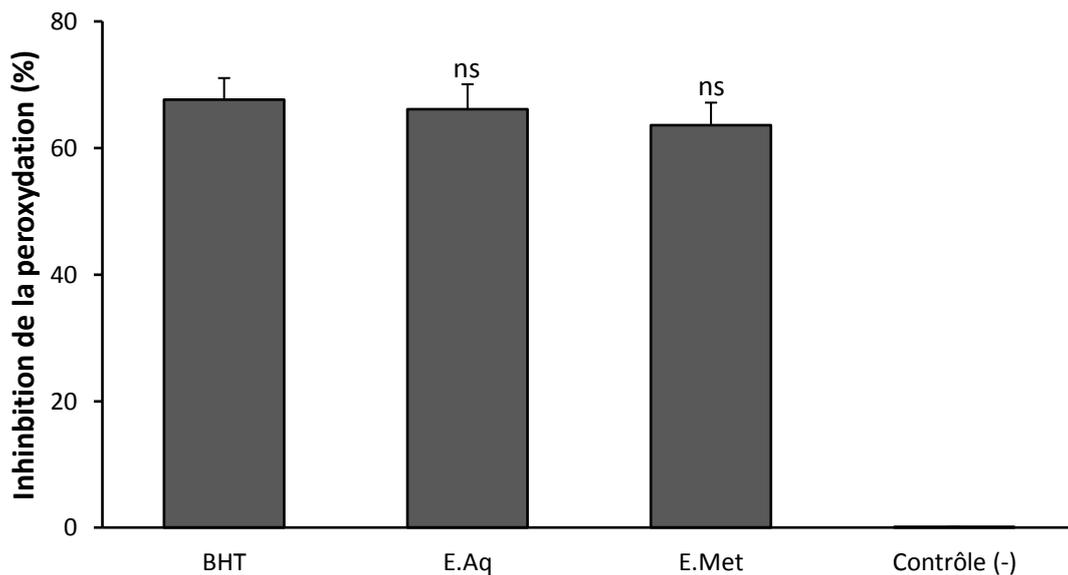


Figure 17. Activité inhibitrice de la peroxydation de l'acide linoléique des extraits aqueux (E. Aq) et méthanolique (E. Met) de *S. chamaecyparissus* et du BHT au temps 96h et à une concentration de 50 μ g/ml. Les valeurs représentent la moyenne de trois mesures \pm SD; ns: non significatif.

II.5. Pouvoir réducteur

Les résultats montrent que les deux extraits de *S. chamaecyparissus* possèdent un pouvoir réducteur remarquable ($p < 0,05$), concentration-dépendant et similaire à partir de 60 $\mu\text{g/ml}$ jusqu'à 150 $\mu\text{g/ml}$, tandis que le BHT montre une activité réductrice maximale à 50 $\mu\text{g/ml}$ (figure 18). Les EC_{50} sont représentées dans le tableau 6.

Tableau 6. Les EC_{50} des extraits de *S. chamaecyparissus* et du BHT. Les valeurs représentent la moyenne de trois essais \pm SD.

Echantillon	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Extrait aqueux	$66,58 \pm 6,06$
Extrait méthanolique	$67,84 \pm 0,84$
BHT	$17,74 \pm 2,56$

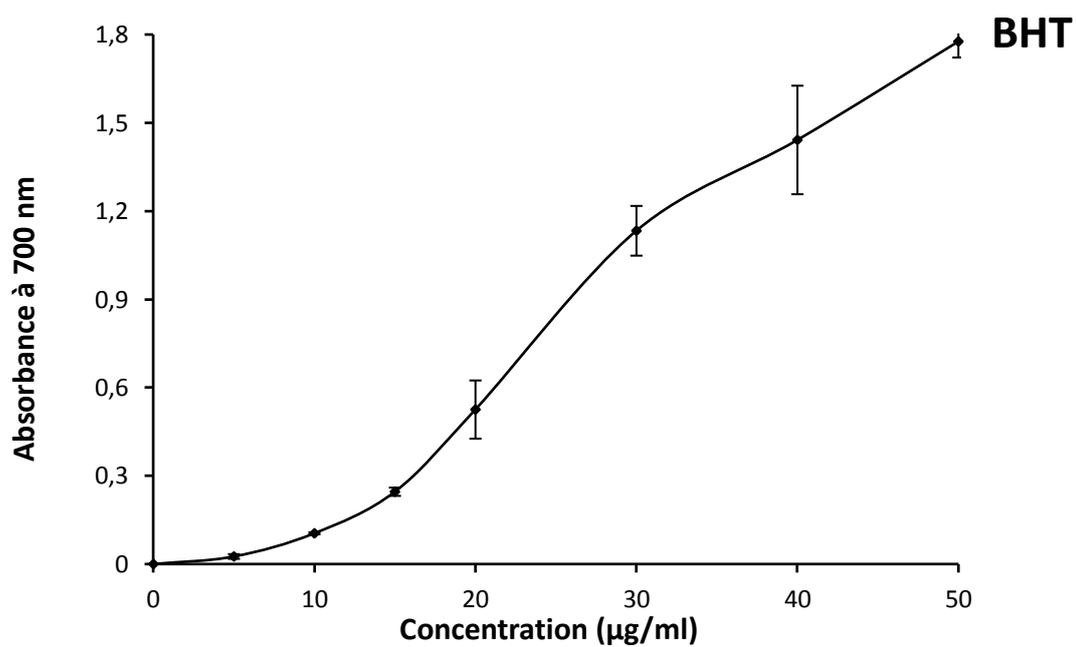
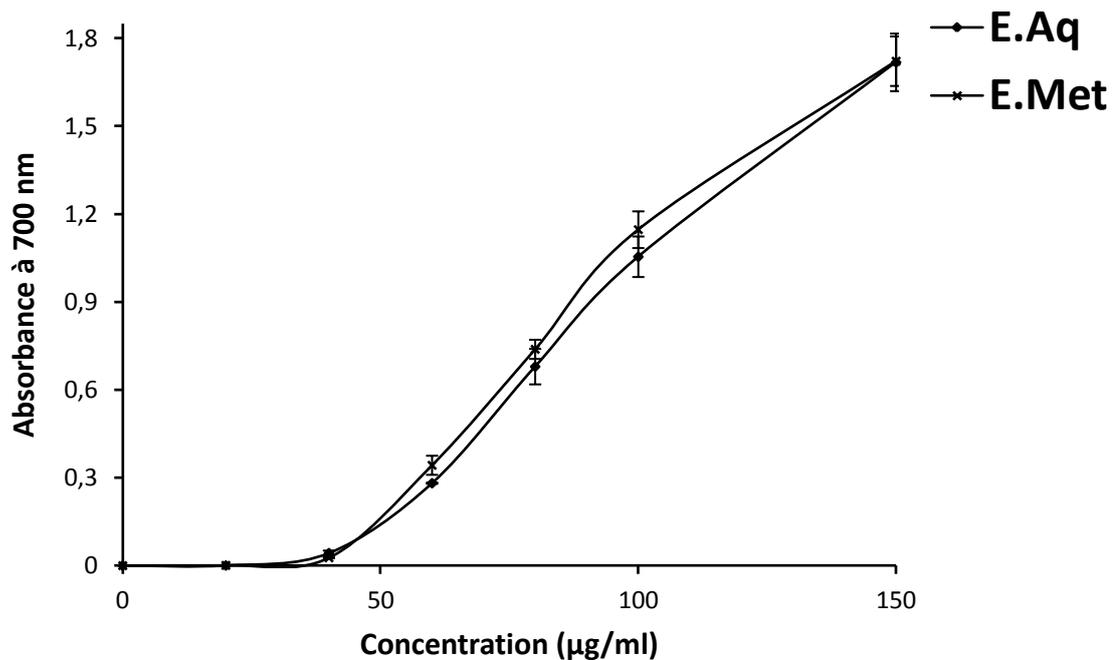


Figure 18. Pouvoir réducteur des extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus* et du BHT à 700 nm. Les valeurs représentent la moyenne de trois essais \pm SD.

III. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus* est testée vis-à-vis de huit souches bactériennes via la méthode de diffusion sur l'agar. Les résultats révèlent que l'extrait méthanolique de *S. chamaecyparissus* exerce un effet antibactérien considérable seulement sur *Enterococcus faecalis* et *Pseudomonas aeruginosa* avec des zones d'inhibition de 8 mm et 8,5 mm respectivement (tableau 7).

Cet effet demeure faible par rapport à celui de la gentamicine, utilisée comme antibiotique de référence (figure 19). L'extrait aqueux n'a, cependant, produit aucun effet vis-à-vis de toutes les souches testées.

Tableau 7. Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne induites par les extraits aqueux (3mg/disque) et méthanolique (3mg/disque) de *S. chamaecyparissus* et par la gentamicine (10µg/disque).

Microorganismes	Diamètres des zones d'inhibitions (mm)			
	Contrôle négatif	Gentamicine	E.Aq	E.Met
<i>pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	25	0	8,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922,	0	21	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	0	15	0	0
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	0	11	0	0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876,	0	18	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	0	30	0	8
<i>Lysteria monocytogenes</i> ATCC 15313	0	11	0	0
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	0	13	0	0

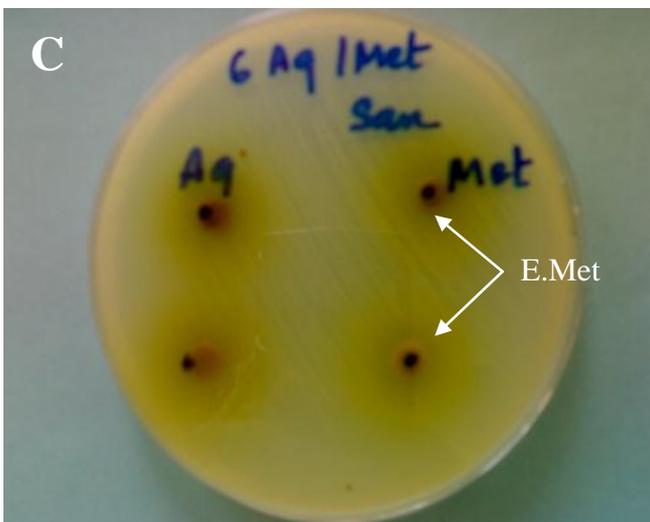
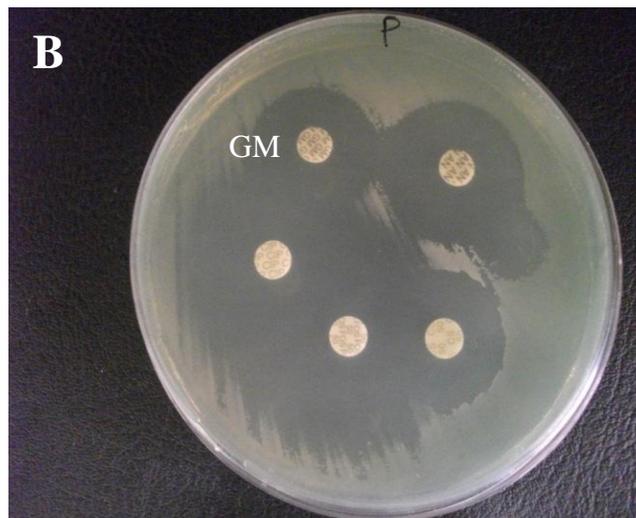
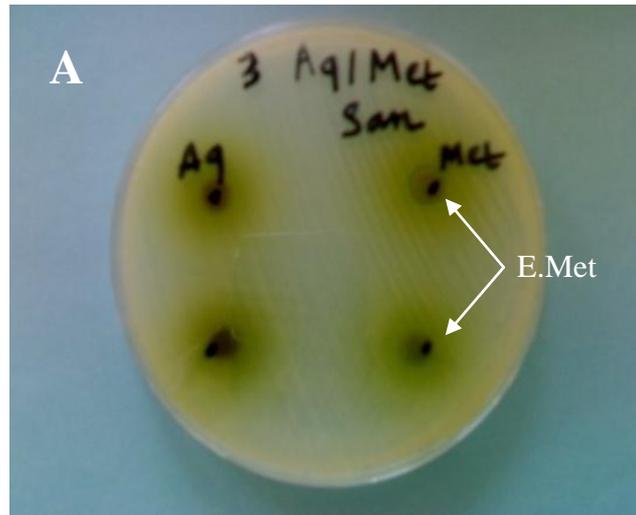


Figure 19. Photographies des zones d'inhibition de la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* induites par l'extrait méthanolique de *S. chamaecyparissus* (A) et par la gentamicine, GM (B), et de la zone d'inhibition de la croissance de *Enterococcus faecalis* induite par l'extrait méthanolique de *S. chamaecyparissus* (C). Les résultats sont représentés en duplicata.

DISCUSSION

Plusieurs antioxydants de synthèse tels que le BHT et le BHA sont largement utilisés comme additifs alimentaires pour prévenir la détérioration des aliments. Bien que ces antioxydants synthétiques montrent une activité antioxydante plus puissante que celle des antioxydants naturels comme l'acide ascorbique et l' α -tocophérol (Bougatef *et al.*, 2009), il y a une préoccupation concernant leurs effets néfastes sur la santé, car ils peuvent être impliqués dans les dommages hépatiques et la carcinogénèse (Gulcin *et al.*, 2005).

De même, le traitement par les antibiotiques classiques est associé à plusieurs effets indésirables tel que l'augmentation du risque de saignement associé au linézolide, l'émergence importante d'espèces bactériennes résistantes ainsi que les inconvénients associés au traitement avec les antibiotiques incompatibles avec l'administration externe du patient comme le prolongement du séjour à l'hôpital et l'exposition aux infections nosocomiales (Song, 2008).

Ce sont les raisons pour lesquelles, la recherche scientifique s'est focalisée récemment sur l'investigation de nouveaux agents antioxydants et antibactériens d'origine végétale particulièrement les polyphénols (acides phénoliques, flavonoïdes et tannins) qui peuvent être des alternatives aux substances synthétiques (Bougatef *et al.*, 2009). Dans ce cadre s'inscrit ce travail qui consiste à tester les activités antioxydantes et l'activité antibactérienne de la plante *Santolina chamaecyparissus*.

I. Préparation des extraits de *Santolina chamaecyparissus*

Les études précédentes montrent que le méthanol et l'eau ainsi que leur mélange à différents ratios sont les solvants les plus utilisés pour une haute récupération de composés phénoliques (Sahreen *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2010; Bouzid *et al.*, 2011) et l'obtention d'une meilleure activité antioxydante (Barros *et al.*, 2010). Ces deux solvants ont été utilisés dans cette étude pour obtenir les extraits à partir de la partie aérienne de la santoline.

L'extraction aqueuse et l'extraction hydroalcoolique ont été faites après avoir séché la plante à l'ombre et l'avoir rendu en poudre. En fait, l'utilisation d'un matériel sec est recommandée du moment que les flavonoïdes (particulièrement les glycosides) peuvent être soumis à une dégradation enzymatique quand le matériel végétal est frais ou non séché (Marston et Hostettmann, 2006). De plus, les fermentations microbiennes causées par l'humidité peuvent être la cause de cette dégradation (Seidel, 2005). Le séchage de la plante à l'obscurité prévient les transformations chimiques telles que l'isomérisation et la dégradation causées par les

radiations ultraviolettes de la lumière solaire (Jones et Kinghorn, 2005). L'utilisation de la poudre à la place de la plante entière a pour but d'améliorer l'extraction du fait de rendre l'échantillon plus homogène, augmenter la surface du contact avec le solvant et faciliter sa pénétration à l'intérieur des cellules qui ne sont pas détruites après le broyage.

Le rendement de l'extraction hydroalcoolique (12,6%) est relativement supérieur à celui de l'extraction aqueuse (10%). Les solvants alcooliques sont capables d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction d'un plus grand nombre de molécules polaires, de moyenne et de faible polarité (Seidel, 2005). De plus, le déroulement de la macération sous agitation pendant un temps étalé (24 h) et à température ambiante permet, respectivement, l'épuisement du solvant en composés extraits et la prévention de leur altération ou modification probable par la température élevée. Néanmoins, l'extraction aqueuse est faite par décoction à température élevée pendant 20 min. En fait, Su et ses collaborateurs (2006) ont rapporté que le rendement des extractions aqueuses augmente avec la température. Cela est expliqué par le fait que l'eau à haute température provoque la perturbation des cellules facilitant la pénétration du solvant et la solubilisation des molécules (Albano et Miguel, 2010). La chaleur peut, cependant, conduire à la dégradation des molécules thermolabiles (Seidel, 2005), c'est la raison pour laquelle, la décoction a été effectuée pendant un temps réduit.

II. Dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins

Les composés phénoliques comme les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins sont considérés comme les contributeurs majeurs à la capacité anti-oxydante des plantes (Li *et al.*, 2007). Ces composés possèdent aussi diverses activités biologiques telles que les activités anti-inflammatoire, antibactérienne, antivirale, antiallergique, antithrombotique et vasodilatatrice qui peuvent être reliées à leur activité anti-oxydante (Gulcin *et al.*, 2010). C'est la raison pour laquelle, les dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus* ont été effectués dans cette étude.

Le dosage des polyphénols totaux est fait par la méthode de Folin-Ciocalteu. Cette méthode est considérée comme la meilleure méthode de détermination du taux des polyphénols totaux des extraits de plantes (Djeridane *et al.*, 2010) car elle est standardisée, simple, reproductible et les interférences avec la matrice de l'échantillon qui est souvent coloré sont minimisés à la grande longueur d'onde d'absorption (765 nm) utilisée (Huang *et al.*, 2005). Les flavonoïdes comme

composés les plus intéressants des polyphénols sont aussi déterminés dans ce travail par la méthode du trichlorure d'aluminium.

En outre, la détermination de la teneur en tannins des extraits aqueux et méthanolique de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus* est faite par le test de précipitation de l'hémoglobine. Ce dosage est basé sur la précipitation de l'hémoglobine du sang hémolysé par les tannins des extraits entraînant une perte de coloration du surnageant qui reflète la teneur en tannins.

Les résultats montrent que les composés polyphénoliques sont abondants dans la partie aérienne de la santoline. Djeridane et ses collaborateurs (2006) ont trouvé que cette abondance est caractéristique de la famille des astéracées. Cela pourrait être relié aux conditions climatiques dures des endroits où elles poussent (température élevée, grande exposition au soleil, la sécheresse et la salinité) qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires comme les polyphénols (Falleh *et al.*, 2008).

L'extrait méthanolique est plus riche en polyphénols que l'extrait aqueux ce qui réfère le plus probable à la solubilité relative des polyphénols présents dans la santoline dans le méthanol et l'eau respectivement. En fait, la solubilité des polyphénols est gouvernée par le type de solvant utilisé, leur degré de polymérisation ainsi que de leur interaction avec d'autres constituants et la formation de complexes insolubles. Pour une plus haute récupération de polyphénols, le méthanol est le solvant approprié (Falleh *et al.*, 2008). Selon Seidel (2005), l'eau et le méthanol sont deux solvants polaires qui extraient particulièrement les flavonoïdes glycosylés et les tannins. Tandis que les flavonoïdes aglycones sont extraits par les alcools ou les mélanges eau-alcool (Marston et Hostettmann, 2006). Cela explique en grande partie la richesse de l'extrait méthanolique de la santoline par rapport à l'extrait aqueux. Néanmoins, ceci n'est pas toujours le cas, car Ozen et ses collaborateurs (2011) ont trouvé que l'extrait aqueux de *Thymus praecox* était plus riche en polyphénols que l'extrait méthanolique. Cela est expliqué par la présence d'un grand nombre de molécules solubles dans l'eau et non solubles dans l'alcool.

Par ailleurs, les valeurs des taux de précipitation de l'hémoglobine des extraits aqueux et méthanolique de la santoline montrent que l'extrait méthanolique contient des tannins de poids moléculaire relativement élevé par rapport à l'extrait aqueux. En effet, la capacité des polyphénols de former des complexes avec les protéines est gouvernée par leur poids moléculaire et fait intervenir des liaisons hydrogène entre les atomes d'oxygène des

groupements peptidiques et les groupements hydroxyles des polyphénols (McManus *et al.*, 1981; Hagerman et Butler, 1989).

III. Activités antioxydantes de la partie aérienne de *S. chamaecyparissus*

Le potentiel antioxydant des polyphénols est désormais munis d'un grand intérêt du à son effet chimioprotecteur contre les maladies dégénératives telles que les maladies neurologiques et cardiovasculaires ainsi qu'à son effet inhibiteur de la peroxydation lipidique des denrées alimentaires (Bubonja-Sonje *et al.*, 2011).

Les processus oxydatifs sont multiples et la nature de l'activité antioxydante peut être multiforme et attribuée à différents mécanismes tels que le piégeage des radicaux libres, la chélation des ions métalliques de transition, la prévention de l'initiation d'une chaîne de réactions productrice des ERO et la décomposition des peroxydes (Ozen, 2009). Ainsi, la combinaison de plusieurs tests antioxydants complémentaires est utile afin d'évaluer le potentiel antioxydant des extraits (Ksouri *et al.*, 2009).

III.1. Activité anti-radicalaire

L'activité anti-radicalaire est très importante du au rôle délétère des radicaux libres dans le domaine alimentaire et dans les systèmes biologiques (Gulçin *et al.*, 2010). La méthode du radical de DPPH, utilisée dans la présente étude, est une procédure commune dans laquelle l'activité antioxydante de l'échantillon étudié est estimée par le degré de décoloration de la solution de DPPH. Ce chromogène violet est facile à utiliser, a une grande sensibilité, permet l'analyse rapide de l'activité antioxydante d'un grand nombre d'échantillons et donne des résultats reproductibles (Gulçin *et al.*, 2010).

Les résultats obtenus avec ce test montrent que les extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus* ont des valeurs d'EC₅₀ trop faibles de l'ordre de 22 µg/ml et 16 µg/ml respectivement ce qui se traduit par d'excellents effets antiradicalaires. La comparaison de ces valeurs avec celles des antioxydants standards, montrent que les deux extraits sont actifs que le BHT. Ces résultats suggèrent que les extraits de *S. chamaecyparissus* contiennent des agents piégeurs de radicaux libres agissant comme antioxydants primaires. L'action de ces antioxydants est supposée être due à leur capacité de donation d'atomes d'hydrogène ou d'électrons dérivée principalement de l'hydroxyle du cycle A des flavonoïdes (Le *et al.*, 2007). L'extrait méthanolique de la santoline est plus riche en polyphénols que l'extrait aqueux et sa capacité de piéger les radicaux DPPH est plus élevée. Cela montre qu'il y a une corrélation

entre le contenu en polyphénols et l'activité antioxydante des extraits de la santoline, et pourrait indiquer que les polyphénols sont responsables de cette activité. Cette corrélation a été rapportée par plusieurs auteurs. Falleh et ses collaborateurs (2008) ont montré qu'il existe une corrélation très significative entre la teneur en polyphénols (polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins condensés) et l'activité scavenger des radicaux DPPH de l'extrait méthanolique de *Cynara cardunculus*, une plante de la famille des astéracées. Ranilla et ses collaborateurs (2010) ont rapporté aussi que les polyphénols contribuent significativement à l'activité antioxydante des extraits obtenus de *Tagetes minuta* et *Galinsoga parviflora* appartenant à la famille des astéracées. Kintzios et ses collaborateurs (2010) ont trouvé que les extraits méthanoliques de quelques plantes médicinales ont des effets piègeurs de radicaux DPPH plus grands que ceux de leurs extraits aqueux. Ces mêmes auteurs ont rapporté que l'activité antioxydante exhibée par les extraits méthanoliques est due à la présence de substances phénoliques telles que l'acide rosmarinique, acides phénoliques, flavonoïdes, sesquiterpènes, triterpènes et xanthones. En outre, les extraits aqueux sont supposés contenir des composés polaires tels que les flavonoïdes et les glycosides qui peuvent être responsables de leur activité antioxydante. En effet, des flavones comme l'apigénine, le luteoline et leurs glucosides (glucoronides et ramnoglycosides), des flavanes méthoxylés comme le pectolinariginine, hispiduline, nepétine et jaceosidine et les flavonoles méthoxylés en position 7 glucosyl sont présents dans *S. chamaecyparissus* (Giner Pons et Rios Canavate, 2000).

Kosar et ses collaborateurs (2003) ont investigué les composés doués d'effet scavenger des radicaux libres dans les extraits aqueux de quelques plantes. Ils ont trouvé que les agents piègeurs de radicaux libres les plus importants étaient l'acide rosmarinique et l'acide carnosique parmi tous les polyphénols identifiés. Considérant que le méthanol est un des meilleurs solvants pour l'extraction de l'acide carnosique, et que l'eau et le méthanol sont les meilleurs pour l'extraction de l'acide rosmarinique (Baskan *et al.*, 2007), ces deux composés pourraient être responsables en partie de l'activité antiradicalaire des extraits de la santoline. Les flavonoïdes et les acides phénoliques sont plus efficaces dans le piégeage des radicaux libres après l'extraction par les solvants modérés ou hydrophiles (Albano et Miguel, 2010).

III.2. Activité chélatrice

Parmi les espèces d'ions métalliques, les ions Fe^{2+} sont les prooxydants les plus puissants à cause de leur réactivité élevée (Gulcin *et al.*, 2010). Ils catalysent la décomposition des hydroperoxydes en radicaux alkoxy et peroxy, amplifiant la peroxydation des lipides (Pincemail *et al.*, 1999). Ils peuvent aussi contribuer à des réactions de type Fenton génératrices

de radicaux OH^\cdot . Ainsi, les chélateurs efficaces des ions ferreux peuvent fournir une protection contre le dommage oxydatif par la chélation de ces ions (Gulcin *et al.*, 2010). Il a été rapporté que les agents chélateurs qui forment des liaisons σ avec le métal agissent comme des antioxydants secondaires qui réduisent le potentiel redox des ions métalliques et par conséquent stabilisent leur forme oxydée (Gulcin *et al.*, 2005). La chélation du fer ferreux par les extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus* a été évaluée dans cette étude par la méthode de la ferrosine. Cette dernière forme un complexe avec les ions Fe^{2+} libres. C'est la raison pour laquelle une diminution de l'absorbance du complexe Fe^{2+} -ferrosine indique la présence d'antioxydants chélateurs (Le *et al.*, 2007).

En fait, la réaction est affectée à la fois par les constantes de formation des deux complexes: antioxydant- Fe^{2+} et ferrosine- Fe^{2+} et donc par la compétition entre les deux chélateurs. Ainsi, un faible chélateur sera sérieusement sous-estimé lors d'une détermination quantitative. Néanmoins, cette réaction sert d'essai convenable pour la détermination de l'activité chélatrice d'un agent antioxydant (Le *et al.*, 2007).

Les profils de l'activité chélatrice des extraits de *S. chamaecyparissus* montrent une cinétique non linéaire concentration dépendante. Cela pourrait être dû à la nature complexe des extraits contenant un nombre de différents chélateurs de fer, avec différentes affinités, en compétition avec la ferrosine.

Les valeurs d' EC_{50} obtenues (0,07 mg/ml et 0,20 mg/ml) avec l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique de la santoline indiquent que les deux extraits possèdent de très fortes activités chélatrices. La comparaison de ces résultats avec celles trouvées avec d'autres plantes éclaire l'importance de la capacité des extraits étudiés d'établir des liaisons avec les ions ferreux. En effet, l'étude menée par Le et ses collaborateurs (2007) montre que la concentration effectrice de l'extrait éthanolique des fruit de *Lycium barbarum* est très élevée (10 mg/ml). De plus, Ksouri et ses collaborateurs (2009) ont trouvé que les extraits méthanoliques de *Tamarix gallica* ont d'excellents effets antioxydants malgré qu'ils exhibent des effets chélateurs avec des valeurs d' EC_{50} de 8,3 mg/ml et 6 mg/ml. Par ailleurs, Chan et ses collaborateurs (2007) ont montré que l'infusion du thé vert, connu par son potentiel antioxydant, a donné une activité chélatrice d'environ 42% à une concentration de 3,3mg/ml. Tandis que des effets chélateurs maximaux de 94% et 92% sont produits par les extraits aqueux et méthanolique de la santoline à des concentrations de 0,2 mg/ml et 0,45 mg/ml respectivement.

L'activité chélatrice élevée de l'extrait aqueux par rapport à l'extrait méthanolique peut être expliquée par la solubilité des agents chélateurs dans l'eau. Les résultats de Sahreen et ses

collaborateurs (2010) montrent que les extraits des plantes induisent des effets chélateurs directement proportionnels à la polarité de leurs solvants. En effet, les mucilages sont des polysaccharides solubles dans l'eau et insolubles dans l'alcool et sont caractérisés par leurs propriétés chélatrices (Watanabe, 2008). Les acides aminés et les acides organiques sont aussi doués de capacités de séquestration des métaux de transition (Wong *et al.*, 2006). Les groupements hydrosolubles possèdent un caractère nucléophile élevé qui leur confère la capacité chélatrice (Ozen *et al.*, 2011).

L'activité de chélation des ions métalliques est aussi attribuée à quelques flavonoïdes (Le *et al.*, 2007) et acides phénoliques (Capecka *et al.*, 2005). Les flavonoïdes exercent des effets antioxydants aussi par la chélation des ions métalliques. Verdan et ses collaborateurs (2011) ont rapporté que les effets antioxydants des flavonoles (quercétine, myricétine et morine) sont dus en partie à leurs capacités de fixer différents métaux (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} et Zn^{2+}) à plusieurs sites. Il a été rapporté par ces auteurs que la quercétine et myricétine forment des complexes avec le Fe^{2+} via les groupements hydroxyle des trois cycles: les groupes hydroxyles du cycle B ainsi que les groupes 3-hydroxy-4-céto et 5-hydroxy-4-céto des cycles A et C. Les deux groupes 3-hydroxy et 5-hydroxy sont particulièrement intéressants car ils sont en compétition pour la fixation du métal.

III.3. Activité inhibitrice de la peroxydation lipidique

L'oxydation des lipides dans les aliments pose de sérieux problèmes pour l'industrie alimentaire car elle entraîne des altérations qualitatives (rancissement) et nutritionnelles (perte de vitamines). Elle est à l'origine des mauvais goûts, odeurs et produits toxiques (peroxydes, aldéhydes) qui touchent aussi bien aux valeurs nutritionnelles des aliments qu'à la santé des consommateurs (Gulcin *et al.*, 2010). L'oxydation lipidique peut aussi avoir lieu *in vivo* et elle est associée à plusieurs pathologies à savoir les maladies cardiovasculaires, le vieillissement et le cancer (Ramarathnam *et al.*, 1995). Ainsi, il est très important de chercher des inhibiteurs de la peroxydation lipidique aussi bien dans les denrées alimentaires que dans l'organisme (Bougatef *et al.*, 2009). Dans la présente étude, deux tests de peroxydation lipidique sont effectués, le test de blanchissement du β -carotène et le test de peroxydation de l'acide linoléique pour évaluer l'activité inhibitrice de l'oxydation lipidique de l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux de *S. chamaecyparissus*.

Le test du β -carotène est largement utilisé pour mesurer l'activité antioxydante des composés bioactifs du moment que le β -carotène est extrêmement susceptible aux radicaux libres

résultant de l'oxydation de l'acide linoléique (Kumazawa *et al.*, 2002). Cela est dû à l'aptitude des caroténoïdes à neutraliser les radicaux libres tout en perdant leur coloration, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à 470 nm (Barros *et al.*, 2007). L'importance de ce test, réside dans l'utilisation du β -carotène comme agent colorant dans les boissons, ainsi sa décoloration sera nettement à l'origine de la réduction de la qualité de ces produits (Bougatef *et al.*, 2009). D'autre part, l'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique des extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus* est déterminé aussi par la méthode de thiocyanate ferrique dans un système contenant l'acide linoléique. Durant l'oxydation de l'acide linoléique, les peroxydes sont formés et sont à l'origine de l'oxydation des ions Fe^{2+} en Fe^{3+} . Ces derniers forment un complexe avec l'ammonium thiocyanate qui a un maximum d'absorption à 500 nm indiquant l'oxydation de l'acide linoléique (Gulcin *et al.*, 2005). La peroxydation lipidique *in vivo* est une altération oxydative des acides gras polyinsaturés dans les membranes cellulaires catalysée par les radicaux libres (Bougatef *et al.*, 2009). Ainsi, l'acide linoléique pourrait servir comme modèle d'acides gras trouvés dans les membranes.

Durant la peroxydation lipidique, les antioxydants agissent de différentes façons à savoir le balayage des radicaux libres, la décomposition des peroxydes et la chélation des ions métalliques. Souvent, plus d'un seul mécanisme est impliqué pour avoir un effet en synergie (Moure *et al.*, 2001).

Les résultats obtenus montrent que les extraits aqueux et méthanolique de la santoline exercent un très bon effet sur la peroxydation lipidique. En effet, le blanchissement du β -carotène a été ralenti fortement en présence des deux extraits. Ces résultats suggèrent que les extraits de *S. chamaecyparissus* ont une capacité considérable de réagir avec les radicaux libres pour les convertir en espèces non réactives et interrompre la chaîne de réactions radicalaires. Cela reflète aussi la solubilité des composés antioxydants des deux extraits dans l'huile et l'eau, voire les émulsions. Les composés qui possèdent cette caractéristique peuvent être utilisés dans les systèmes alimentaires (Moure *et al.*, 2001). Maggi et ses collaborateurs (2009) ont trouvé que les huiles essentielles de *Achillea ligustica* (astéracées) possèdent une activité inhibitrice de la peroxydation lipidique due à la présence d'un taux élevé de composés oxygénés (alcools). Ces mêmes auteurs rapportent aussi que l'activité antioxydante d'un composé est très souvent reliée à la présence de portions facilement oxydables telles qu'un groupement hydroxyle sur un hydrocarbure. Les flavonoïdes inhibent la peroxydation lipidique en un stade précoce par l'activité scavenger des radicaux peroxydes comme ils peuvent interrompre une chaîne de réactions radicalaires par la propriété de donation d'hydrogène (Sandhar *et al.*, 2011).

En outre, les effets des deux extraits de la santoline sont très proches de ceux du BHT et BHA qui ont été choisis dans ce travail pour la comparaison, du fait qu'ils sont le plus souvent utilisés dans la conservation des produits alimentaires.

Les extraits aqueux et méthanolique de *S.chamaecyparissus* ont exercé des effets inhibiteurs de la peroxydation lipidique statistiquement très significatifs par rapport au contrôle négatif. Ces résultats indiquent clairement que les extraits de *S.chamaecyparissus* possèdent un excellent effet antioxydant par la méthode de thiocyanate ferrique. Ces données révèlent que la puissante activité inhibitrice de la peroxydation lipidique des deux extraits de la santoline est bien due à leur excellente activité antiradicalaire prouvée par le test de DPPH. Cette capacité de modifier la peroxydation lipidique induite par les radicaux libres est reliée non seulement aux caractéristiques structurales des agents antioxydants mais aussi à leur capacité d'interagir avec et pénétrer dans les bicouches lipidiques (Antonella *et al.*, 1995). Il a été montré que la structure et la lipophilie des polyphénols sont des facteurs décidant la propriété antioxydative, probablement affectant la profondeur de l'incorporation de ces composés dans la phase lipidique de la membrane (Djeridane *et al.*, 2010).

Le puissant effet antioxydant des extraits de la santoline dans ce test peut être aussi dû à leur capacités chélatrices. Il est possible que lors de la lecture spectrophotométrique des résultats de ce test, et au moment de l'ajout de la solution de FeCl_2 (source des ions Fe^{2+}), les extraits ont chélaté les ions ferreux avant qu'ils ont interagit avec les peroxydes formés de la peroxydation de l'acide linoléique pour former les ions ferriques. Ces derniers étant à l'origine de la formation du complexe chromophore avec le thiocyanate indiquant un état de peroxydation lipidique.

III.4. Activité réductrice

La capacité de donation d'électrons dans une réaction d'oxydoréduction peut être aussi utilisée dans la mesure de l'activité antioxydante d'un composé. Cette capacité de donation d'électrons est appelée pouvoir réducteur.

Le pouvoir réducteur des extraits de *S. chamaecyparissus* est mesuré dans cette étude par la réduction directe de $\text{Fe}^{3+}(\text{CN})_6$ en une forme ferreuse $\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6$ qui est déterminée par la détection spectrophotométrique du complexe $(\text{Fe}^{3+})_4[\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6]_3$ ayant une forte absorption à 700 nm (Le *et al.*, 2007). La couleur jaune du milieu réactionnel change en vert dont l'intensité est en fonction du pouvoir réducteur de l'échantillon étudié (Zou *et al.*, 2004).

Les valeurs d' EC_{50} obtenus dans ce test montrent que les extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus* possèdent de très fortes capacités réductrices bien qu'elles sont inférieures à

celle du BHT. Cela démontre leur propriété de donation d'électrons et par conséquent leur capacité de neutraliser les radicaux libres. Les flavonoïdes sont des principaux donateurs d'électrons (Le *et al.*, 2007).

Les effets antioxydants des extraits aqueux et méthanolique de la santoline sont statistiquement similaires dans les deux tests de peroxydation lipidique ainsi que dans le test du pouvoir réducteur, leurs teneurs en polyphénols sont cependant significativement différentes. Cela pourrait indiquer qu'il n'existe pas de corrélation entre leur contenu en polyphénols et leurs activités antioxydantes dans ces tests. En fait, Albano et Miguel (2010) ont rapporté que cette corrélation n'est pas toujours existante. Ozen et ses collaborateurs (2009) ont trouvé que l'extrait méthanolique de *Thymus praecox* était le plus actif dans le test du pouvoir réducteur que tous les autres extraits testés dans leur étude à savoir les extraits aqueux, éthanolique, acétonique et hexanique. L'extrait méthanolique était cependant le plus pauvre en polyphénols. De plus, Tuberoso et ses collaborateurs (2009) ont trouvé que l'extrait hydroalcoolique de *Achillea ligustica* (astéracées) a montré une teneur plus faible en polyphénols totaux que d'autres extraits de cette plante mais il a exhibé l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique la plus élevée.

En revanche, Ksouri et ses collaborateurs (2009) ont trouvé qu'il y a une forte corrélation entre le contenu en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits méthanoliques des fleurs et des feuilles de *Tamarix gallica* et leurs activités antioxydantes. Ces auteurs réfèrent l'activité antioxydante des extraits de cette plante à la présence d'un nombre de molécules identifiées à savoir des acides phénoliques et des flavonoïdes. Cependant, ils ont trouvé que cette corrélation ne s'applique pas à la teneur en tannins.

IV. Activité antibactérienne: méthode de diffusion sur l'agar

L'activité antibactérienne des extraits aqueux et méthanolique de *S. chamaecyparissus* a été évaluée dans cette étude par la technique de diffusion sur l'agar (méthodes des disques) vis-à-vis de huit souches bactériennes après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C. Cette méthode permet de tester différents composés contre un seul microorganisme (Rios et Recio, 2005). Le choix des souches bactériennes testées dans la présente étude était basé sur le caractère de multirésistance envers les antibiotiques classiques.

Les résultats obtenus dans le présent travail montrent que l'extrait aqueux de *S.chamaecyparissus* n'a aucun effet inhibiteur envers la croissance de toutes les souches bactériennes testées. La méthode d'extraction aqueuse ainsi que la quantité d'extrait mise dans

les disques (3mg) pourraient être à l'origine de ces résultats. En fait, Il a été rapporté que les huiles essentielles des plantes, et non leurs extraits, ont la plus grande efficacité dans le traitement des pathologies infectieuses (Rios et Recio, 2005). En fait, les huiles essentielles ont l'avantage de ne pas engendrer une résistance bactérienne du à leur contenu en un large spectre de composés bioactifs (Maggi *et al.*, 2009). Plusieurs études ont rapporté aussi que les extraits aqueux de différentes plantes de la famille des astéracées ne présentent aucune activité antibactérienne, alors que les extraits organiques et les huiles essentielles de ces plantes inhibent très significativement la croissance des souches testées (Candan *et al.*, 2003; Sokmen *et al.*, 2004). Selon Candan et ses collaborateurs (2003), les substances hydrosolubles exercent un effet plus faible comparé à celui des substances non hydrosolubles. Cela réfère probablement à la capacité des molécules liposolubles de s'intercaler dans les membranes des cellules bactériennes et les endommager.

Il a été rapporté que les composés responsables de l'action antibactérienne semblent vraisemblablement être les diterpénoïdes phénoliques, qui sont les composés principaux de la fraction apolaire des extraits des plantes (Fernandez-Lopez *et al.*, 2005). Ces composés sont de nature hautement lipophile est par conséquent sont extraits par des solvants de faible polarité tel que le chloroforme (Albano et Miguel, 2010). Ceci pourrait expliquer l'absence de l'activité antibactérienne dans l'extrait aqueux ainsi que la modeste activité de l'extrait méthanolique envers les deux souches *Enterococcus faecalis* et *Pseudomona aeruginosa*. Bouzid et ses collaborateurs (2011) ont trouvé que l'extrait méthanolique de *Crataegus monogyna* renferme une quantité appréciable de polyphénols (notamment les flavonoïdes, les tanins, les acides phénoliques, les terpènes et les pectines) mais il n'a montré qu'une faible activité antibactérienne.

Il a été montré par Falleh et ses collaborateurs (2008) que l'extrait méthanolique des feuilles de *C. cardunculus* (astéracées) était actif contre quatre souches utilisées dans notre étude à savoir *Echerichia coli*, *Enterococcus feacalis*, *Lysteria monocytogenes* et *Pseudomonas aeruginosa*. Cette activité est reliée à la présence de composés antibiotiques ou des toxines métaboliques qui sont absents dans les extraits de la santoline dans la limite de la quantité utilisée dans chaque disque (3mg).

D'autre part, les flavonoïdes glycosylés ont une activité antioxydante inférieure à celle des flavonoïdes aglycones (Bouzid *et al.*, 2011). Du moment que les deux extraits ont les mêmes capacités antioxydantes, et que les flavonoïdes aglycones sont insolubles dans l'eau tandis que les flavonoïdes glycosylés sont aussi bien solubles dans l'eau que dans les solutions

hydroalcooliques (Marston et Hostettmann, 2006), on pourrait déduire que les deux extraits contiennent des flavonoïdes glycosylés responsables de cette activité

Les conditions de séchage et de broyage de la santoline peuvent être aussi à l'origine de l'absence de l'activité antibactérienne. Il est rapporté par Seidel (2005) que si la plante est connue par son contenu en composés volatiles ou thermolabiles, il est conseillé de congeler le matériel végétal le plutôt possible après sa collection. Il est aussi recommandé de le broyer subséquemment dans un mortier avec le nitrogène liquide car le broyage est aussi à l'origine de la génération de chaleur responsable de la perte des molécules volatiles ainsi que la décomposition et l'oxydation des molécules thermolabiles (Jones et Kinghorn, 2005). Donc, la faible activité de l'extrait méthanolique pourrait être due à la faible fraction d'huiles essentielles qui s'est solubilisée dans le méthanol, la grande proportion étant perdue à cause des conditions de séchage et d'extraction.

Finalement, l'activité d'un extrait est probablement due à la présence de synergie entre un nombre de composants, qui, lorsqu'ils sont séparés deviennent inactifs individuellement (Sarker *et al.*, 2005). Cela est interprété par le fait que les plantes produisent une variété énorme de petites molécules antibiotiques ayant un large spectre de structures telles que les terpénoïdes, les glycostéroïdes, les flavonoïdes et les polyphénols. Cependant, la plupart de ces petites molécules ont une faible activité antibiotique par rapport aux antibiotiques communs produits par les bactéries et les champignons.

Conclusion et Perspectives

Les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins ainsi que les effets antioxydants et l'effet antibactérien des extraits aqueux et méthanolique de la partie aérienne de *Santolina chamaecyparissus* ont été évalués dans le présent travail.

Les résultats montrent que les deux extraits sont riches en composés polyphénoliques avec la prédominance de ces derniers dans l'extrait méthanolique en raison de leur solubilité plus élevée dans le méthanol.

Par ailleurs, les deux extraits possèdent une activité antioxydante importante *in vitro*. Ils montrent une inhibition très importante vis-à-vis du radical DPPH, une forte activité chélatrice vis-à-vis du fer ferreux, un excellent effet inhibiteur de la peroxydation lipidique et un puissant pouvoir réducteur.

En outre, seul l'extrait méthanolique de *S. chamaecyparissus* a montré une activité antibactérienne relativement faible vis-à-vis de deux souches à savoir *Enterococcus faecalis* et *Pseudomonas aeruginosa* tandis que l'extrait aqueux ne possède aucun effet antibactérien vis-à-vis des souches testées.

La plante *Santolina chamaecyparissus* est une source prometteuse d'agents antioxydants mais de faibles agents antibactériens ce qui est expliqué par la nature des composés présents dans cette plante. D'autres études concernant l'identification des molécules bioactives, la confirmation de la capacité antioxydante de *Santolina chamaecyparissus* par des tests *in vivo* ainsi que l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de cette plante et des extraits vis-à-vis d'autres souches bactériennes sont nécessaires.

Références Bibliographiques

Ahsan H, Ali A and Ali R (2003). Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical and Experimental Immunology*, **131**, 398-404.

Ahuja A, Bakshi S K, Sharma S K, Thappa R K, Agarwal S G, Kichlu S K, Paul R and Kaul M K (2005). Production of volatile terpenes by proliferating shoots and micropropagated plants of *Santolina chamaecyparissus* L. (cotton lavender). *Flavour Fragrance Journal*, **20**, 403-406.

Akerreta S, Cavero R Y, López V and Calvo M I (2007). Analyzing factors that influence the folk use and phytonomy of 18 medicinal plants in Navarra. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, **3** (16), 1-18.

Albano S M and Miguel M G (2010). Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*, 1-6.

Ansari K N (1997). The free radicals-the hidden culprits-an update. *Indian Journal of Medical Sciences*, **51**, 319-336.

Antonella S, Mario S, Maria L, Daniela M, Francesco B and Francesco C (1995). Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembrane. *Free Radical Biology and Medicine*, **19**, 481-486.

Aruoma O I (1999). Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, **8** (1), 53-63.

Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin J C, Pinkas M, Luycky M and Gazin M (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, **46**, 1086-1089.

Barrero A F, Mar Herrador M, Quilez J F, Alvarez- Manzaneda R, Portal D, Gavin J A, Gravalos D G, Simmonds M S J and Blaney W M (1999). Bioactive sesquiterpenes from *Santolina rosmarinifolia* subsp. *Canescens*. A conformational analysis of the germacrane ring. *Phytochemistry*, **51**, 529-541.

- Barros L, Ferreira MJ, Queiros B, Ferreira I C F R and Baptista P (2007). Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, **103**, 413-419.
- Barros L, Heleno S A, Carvalho A M and Ferreira I C F R (2010). Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: vitamins and phenolics. *LWT*, **43**, 544-550.
- Baskan S, Öztekin N and Erim F B (2007). Determination of carnosic acid and rosmarinic acid in sage by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, **101**, 1748-1752.
- Beckman K B and Ames B N (1998). The Free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, **78** (2), 547-581.
- Bergendi L, Beneš L, Ďuračková Z and Ferenčík M (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences*, **65**, 1865-1874.
- Blokhina O, Virolainen E and Fagerstedt K V (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a Review. *Annals of Botany*, **91**, 179-194.
- Bonnefont-Rousselot D, Peynet J, Beaudeau J L, Thérond P, Legrand A and Delattre J (2002). Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **16**, 260-267.
- Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y and Nasri M (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, **114**, 1198-1205.
- Bouzaïd W, Yahia M, Abdeddaim M, Aberkane M C et Ayachi A (2011). Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de *L'Aubepine Monogyne*. *Lebanese Science Journal*, **12** (1), 59-69.
- Bubonja-Sonje M, Giacometti J and Abram M (2011). Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, **127**, 1821-1827.
- Cadenas E and Davies J A (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, **29**, 222-230.

- Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sökmen A and Akpulat H A (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **87**, 215-220.
- Capecka E, Mareczek A and Leja M (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some lamiaceae species. *Food Chemistry*, **93**, 223-226.
- Carpenter C F and Chambers H F (2004). Daptomycin: another novel agent for treating infections due to drug-resistant gram-positive pathogens. *Clinical Infectious Diseases*, **38**, 994-1000.
- Chan E W C, Lim Y Y and Chew Y L (2007). Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. *Food Chemistry*, **102**, 1214-1222.
- Chan K L (2003). Role of nitric oxide in ischemia and reperfusion injury. *Current Medicinal Chemistry*, **1**, 1-13.
- Cherchi G, Deidda D, De Gioannis B, Marongiu B, Pompei R and Porcedda S (2001). Extraction of *Santolina insularis* essential oil by supercritical carbon dioxide: influence of some process parameters and biological activity. *Flavour and Fragrance Journal*, **16**, 35-43.
- Christensen L P (1992). Acetylenes and related compounds in Anthemideae. *Phytochemistry*, **31**, 7-49.
- Chu W L, Lim Y W, Radhakrishnan A K and Lim P E (2010). Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **10** (53), 2-8.
- Cohen J H, Kristal A R and Stanford J L (2000). Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, **92**, 61-68.
- Cowan M M (1999). Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12** (4), 564-582.
- Da Silva J A T (2004). Mining the essential oils of the Anthemideae. *African Journal of Biotechnology*, **3** (12), 706-720.

Daglia M (2011). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, **23**, 1-8.

Derbesy M, Touche J and Zola A (1989). The essential oil of *Santolina chamaecyparissus* L. *Journal of Essential Oil Research*, **1**, 269-275.

Djeridane A, Yousfi M, Brunel J M and Stocker P (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 2599-2606.

Djeridane M, Yousfi B, Nadjemi D, Boutassouna P and Stocker N (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, **97**, 654-660.

Evans W J (2000). Vitamin E, vitamin C and exercise. *American Journal of Clinical Nutrition*, **72**, 647-652.

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. *Comptes Rendus Biologies*, **331**, 372-379.

Favier A (2003). Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.

Fernandez-Lopez J, Zhi N, Aleson-Carbonell L, Perez-Alvarez J A and Kuri V (2005). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, **69**, 371-380.

Ferrari B, Tomi F and Casanova J (2005). Terpenes and acetylene derivatives from the roots of *Santolina corsica* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **33**, 445-449.

Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z et Jore D (2003). Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*, 91-96.

Gião M S, Leitão I, Pereira A, Borges A B, Guedes C J, Fernandes J C, Belo L, Santos-Silva A, Hogg T A, Pintado M E and Malcata F X (2010). Plant aqueous extracts: Antioxidant capacity via haemolysis and bacteriophage P22 protection. *Food Control*, **21**, 633-638.

- Giner Pons R M and Rios Canavate J L (2000). *Santolina chamaecyparissus*: Especie mediterranea con potenciales aplicaciones terapeuticas en procesos inflamatorios y transtornos digestivos. *Revista de Fitoterapia*, **1**, 27-34.
- Giner R M, Rios J L and Villar A (1988). CNS depressant effects, anti-inflammatory activity and anti- cholinergic actions of *Santolina chamaecyparissus* extracts. *Phytotherapy Research*, **12**, 37-41.
- Giner R M, Rios J L and Villar A (1989). Inhibitory effects of *Santolina chamaecyparissus* extracts against spasmogen agonists. *Journal of Ethnopharmacology*, **27**, 1-6.
- Goeptar A R, Scheerens H and Vermeulen N P (1995). Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Critical Reviews in Toxicology*, **25**, 25-65.
- Grosso C, Cristina A, Burillo F J, Mainar A M , Urieta J S, Barroso J G, Coelho J A and Palavra A M F (2009). Supercritical fluid extraction of the volatile oil from *Santolina chamaecyparissus*. *Journal of Separation Science*, **32**, 3215-3222.
- Gulcin I, Alici H A and Cesur M (2005). Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activities of propofol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **53**(3), 281-285.
- Gulcin I, Huyut Z, Elmastas M and Aboul-Enein H Y (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, **3**, 43-53.
- Gülçin I, Mshvildadze V, Gepdiremen A and Elias R (2006). The antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica*: 3-O-(β -D glucopyranosyl)-hederagenin. *Phytotherapy Research*, **20**, 130-134.
- Guzik T J, Korb R and Adamek-Guzik T (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, **54** (4), 469-487.
- Hagerman A E and Butler L G (1989). Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *Journal of Chemical Ecology*, **15** (6), 1795-1810.

Halliwell B and Gutteridge J M C (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford (fourth edition).

Hemaiswarya S, Kruthiventi A K and Doble M (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, **15**, 639-652.

Hu F B (2003). Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. *American Journal of Clinical Nutrition*, **78**, 544-551.

Huang D, Ou B and Prior R L (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **53**, 1841-1856.

Jones W P and Kinghorn A D (2005). Extraction of plant secondary metabolites. *In*: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. *Natural products isolation*. Humana Press (Totowa), pp: 323-411.

Ketsawatsakul U, Whiteman M and Halliwell B (2000). A reevaluation of the peroxynitrite scavenging activity of some dietary phenolics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **279**, 692-699.

Kintzios S, Papageorgiou K, Yiakoumettis I, Baricevic D and Kusar A (2010). Evaluation of the antioxidants activities of four Slovene medicinal plant species by traditional and novel biosensory assays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **53**, 773-776.

Kisiel W, Dawid-Pač R, Grabarczyk H and Nowak G (2003). Germacrane Derivatives from *Santolina pinnata* subs. *neapolitana*. *Zeitschrift für Naturforschung*, **58**, 793-796.

Kosar M, Dorman H J D, Bachmayer O, Baser K H C and Hiltunen R (2003). An improved on-line HPLC-DPPH method for the screening of free radical scavenging compounds in water extracts on Lamiaceae plants. *Chemistry of Natural Compounds*, **39**, 161-166.

Ksouri R, Falleh H, Megdiche W, Trabelsi N, Mhamdi B, Chaieb K, Bakrouf A, Magné C and Abdelly C (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 2083-2091.

Kumari A and Kakkar P (2008). Screening of antioxidant potential of selected barks of Indian medicinal plants by multiple *in vitro* assays. *Biomedical and environmental sciences*, **21**, 24-29.

- Kumazawa S, Hayashi K, Kajiya K, Ishii T, Hamasaka T and Nakayama T (2002). Studies of the constituents of *Uruguayan propolis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 4777-4782.
- Laguerre M, Lecomte J and Villeneuve P (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, **46**, 244-282.
- Le K, Chiu F and Ng K (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, **105**, 353-363.
- Lee J, Koo N and Min D B (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **3** (1), 21-33.
- Li H B, Cheng K W, Wong C C, Fan K W, Chen F and Jiang Y (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, **102**, 771-776.
- Ljubuncic P, Song H, Cogan U, Azaizeh H and Bomzon A (2005). The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease. *Journal of Ethnopharmacology*, **100**, 198-204.
- Lopez V, Akerreta S, Casanova E, Garca-Mina J M, Cavero R Y and Calvo M I (2008). *Pharmaceutical Biology*, **46**, 602-609.
- Maggi F, Bramucci M, Cecchini C, Coman M M, Cresci A, Cristalli G, Lupidi G, Papa F, Quassinti L, Sagratini G and Vittori S (2009). Composition and biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) naturalized in central Italy: Ideal candidate for anti-cariogenic formulations. *Fitoterapia*, **80**, 313-319.
- Mason T L and Wasserman B P (1987). Inactivation of red beet betaglucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry*, **26**, 2197-2202.
- McManus J P, Davis K G, Lilley T H and Haslam E (1981). The association of proteins with polyphenols. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 309-311.
- McManus M C (1997). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *American Journal of Health-System Pharmacy*, **54**, 1420-1433.

Montagnier L (2009). Oxidative stress in preventive medicine. *Free Radical Research*, **43**, 27-97.

Motamed S M and Naghibi F (2010). Antioxidant activity of some edible plants of the Turkmen Sahra region in northern Iran. *Food Chemistry*, **119**, 1637-1642.

Moure A, Cruz J M, Franco D, Dominguez J M, Sineiro J, Dominguez H, Nunez M J and Parajo J C (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, **72**, 145-171.

Ozen T (2009). Investigation of antioxidant properties of *Nasturtium officinale* (Watercress) leaf extracts. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, **66** (2), 187-193.

Ozen T, Demirtas I and Aksit H (2011). Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. *Food Chemistry*, **124**, 58-64.

Packer L and Weber S U (2001). The role of vitamin E in the emerging field of nutraceuticals. *In: Kramer K, Hoppe P P and Packer L. Nutraceuticals in health and disease prevention. New York (Marcel Dekker), pp: 27-43.*

Pala-Paul J, Perez-Alonso M J, Velasco-Negueruela A, Ramos-Vazquez P and Gomez-Contreras F and Sanz J (1999). Essential oil of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *rosmarinifolia*: first isolation of capillene, a diacetylene derivative. *Flavour and Fragrance Journal*, **14**, 131-134.

Pincemail J, Meurisse M, Limet R et Defraigne J O (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, **4** (5).

Prescott L M, Harley J P and Klein D A (2003). La chimiothérapie antimicrobienne. *In: Microbiologie, 2ème édition (Bruxelles), pp: 806-811.*

Que F, Mao L and Pan X (2006). Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Research International*, **39**, 581-587.

Ramarathnam N, Osawa T, Ochi H and Kawakishi S (1995). The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends in Food Sciences and Technology*, **6**, 75.

Ranilla L G, Kwon Y I, Apostolidis E and Shetty K (2010). Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology*, **101**, 4676-4689.

Rios J L and Recio M C (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **100**, 80-84.

Rodrigo R, Miranda A and Vergara L (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, **412**, 410-424.

Roede J R and Jones D P (2010). Reactive species and mitochondrial dysfunction: mechanistic significance of 4-hydroxynonenal. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **51**, 380-390.

Roussel A M (2009). Qui manque d'antioxydants, et comment le savoir ? *Cahiers de nutrition et de diététique*, pp: 7.

Sahreen S, Khan M R and Khan R A (2010). Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chemistry*, **122**, 1205-1211.

Sala A, Recio M C, Giner R M, Mdfiez S and Rios J (2000). Antiphosphopase A2 and anti-inflammatory activity of *Santolina Chamaecyparissus*. *Life and Sciences*, **66** (2), 35-40.

Sandhar H K, Kumar B , Prasher S, Tiwari P, Salhan M and Sharma P (2011). A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, **1** (1), 25-41.

Sanz J F, Garcia-Sarrion A and Marco J A (1991), Germacrane derivatives from *Santolina chamaecyparissus*. *Phytochemistry*, **30**, 3339-3342.

Sarker S D, Latif Z and Gray A I (2005). Natural Product Isolation. *In*: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. Humana Press (Totowa), pp: 1-23.

Scalbert A (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, **30**, 3875-3883.

Seidel V (2005). Initial and Bulk Extraction. *In*: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. Humana Press (Totowa), pp: 27-37.

Simon H U, Haj-Yehia A and Levi-Schaffer F (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in the apoptosis induction. *Apoptosis*, **5**, 415-418.

Sokmen A, Sokmen N, Daferera D, Polissiou M, Candan F, Unlu M and Akpulat A (2004). The in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and methanol extracts of *Achillea biebersteini* afan. (Asteraceae). *Phytotherapy Research*, **18**, 451-456.

Song J H (2008). What's new on the antimicrobial horizon? *International Journal of Antimicrobial Agents*, **32** (4), 207-213.

Storm D R, Rosenthal KS and Swanson P E (1977). Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annual Review of Biochemistry*, **46**, 723-763.

Su X, Duan J, Jian Y, Shi J and Kakuda Y (2006). Effect of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 348-353.

Suresh B, Srirama S, Dhanaraja S A, Elango K and Chinnaswamy K (1997). Anticandidal activity of *Santolina chamaecyparissus* volatile oil. *Journal of Ethnopharmacology*, **55**(2), 151-159.

Tang S Y and Halliwell B (2010). Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **394**, 1-5.

Tenover F C (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*, **119** (6), 3-10.

Topçu G, Ay M , Bilici A, Sarıkurkcu C, Ozturk M and Ulubelen A (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, **103**, 816-822.

Tortora G J, Funke B R and Case C L (2003). Introduction à la Microbiologie. Editions du Renouveau Pédagogique. France.

Tuberoso C I G, Montoro P, Piacente S, Corona G, Deiana M, Dessi M A, Pizza C and Cabras P (2009). Flavonoid characterization and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts from *Achillea ligustica* All. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **50**, 440-448.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M T D and Mazur M and Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **39**, 44-84.

Verdan A M, Wang H C, García C R, Henry W P and Brumaghim J L (2011). Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **105**, 1314-1322.

Vorbach C, Harrison R and Capecchi M R (2003). Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Trends in Immunology*, **24**, 512-517.

Watanabe T, Misawa S, Hiradate S and Osaki M (2008). Characterization of root mucilage from *Melastoma malabathricum*, with emphasis on its roles in aluminum accumulation. *New Phytologist*, **178**, 581-589.

Wiseman H and Halliwell B (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*, **313**, 17-29.

Wong S P, Leong L P and William Koh J H (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*, **99**, 775-783.

Xia E Q, Deng G F, Guo Y J and Li H B (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, **11**, 622-646.

Yala D, Merad A S, Mohamedi D and Ouar Korich M N (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, n° 91.

Zadak Z, Hyspler R, Ticha A, Hronek M, Fikrova P, Rathouska J, Hrnčiarikova D and Stetina R (2009). Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiological Research*, **58**, 13-17.

Zou Y P, Lu Y H and Wei D Z (2004). Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 5032-5039.