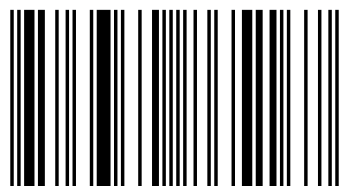


La présente étude est consacrée pour évaluer in vitro les propriétés antioxydantes et antibactériennes des extraits méthanoliques, protéiques et des huiles essentielles à partir des racines de deux plantes utilisées dans la médecine traditionnelle en Algérie, *Tamus communis* L et *Carthamus caeruleus* L. Le potentielle antioxydant des échantillons était évalué en utilisant trois techniques complémentaires, l'inhibition du radical libre DPPH, le test du β -Carotène / Acide linoléique et la technique FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma). Le test antioxydant a montré que les fractions méthanoliques non polaires des deux plantes sont plus actives que les fractions polaires. Dans le test antibactérien, les huiles essentielles de *T. communis* ont significativement inhibé la croissance de sept souches bactériennes parmi neuf, provoquant des zones d'inhibition de 19 à 25 mm de diamètre. Les fractions méthanoliques non polaires ont montré une activité antibactérienne plus ou moins importante en comparaison avec les fractions polaires.

Farida Belkhiri est enseignante chercheur en Microbiologie et en Biochimie à l'Université de Sétif1, Algérie. L'axe de recherche actuel: Activités biologiques des plantes médicinales.



978-3-330-86516-7



Farida Belkhiri
Abderrahmane Baghiani

Plantes médicinales Activités antioxydantes et antibactériennes

Etude de cas : *Tamus communis* et *Carthamus caeruleus*

**Farida Belkhir
Abderrahmane Baghiani**

Plantes médicinales Activités antioxydantes et antibactériennes

**Farida Belkhir
Abderrahmane Baghiani**

**Plantes médicinales Activités
antioxydantes et antibactériennes**

**Etude de cas : Tamus communis et Carthamus
caeruleus**

Éditions universitaires européennes

Impressum / Mentions légales

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Alle in diesem Buch genannten Marken und Produktnamen unterliegen warenzeichen-, marken- oder patentrechtlichem Schutz bzw. sind Warenzeichen oder eingetragene Warenzeichen der jeweiligen Inhaber. Die Wiedergabe von Marken, Produktnamen, Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen u.s.w. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Information bibliographique publiée par la Deutsche Nationalbibliothek: La Deutsche Nationalbibliothek inscrit cette publication à la Deutsche Nationalbibliografie; des données bibliographiques détaillées sont disponibles sur internet à l'adresse <http://dnb.d-nb.de>.

Toutes marques et noms de produits mentionnés dans ce livre demeurent sous la protection des marques, des marques déposées et des brevets, et sont des marques ou des marques déposées de leurs détenteurs respectifs. L'utilisation des marques, noms de produits, noms communs, noms commerciaux, descriptions de produits, etc, même sans qu'ils soient mentionnés de façon particulière dans ce livre ne signifie en aucune façon que ces noms peuvent être utilisés sans restriction à l'égard de la législation pour la protection des marques et des marques déposées et pourraient donc être utilisés par quiconque.

Coverbild / Photo de couverture: www.ingimage.com

Verlag / Editeur:

Éditions universitaires européennes

ist ein Imprint der / est une marque déposée de

OmniScriptum GmbH & Co. KG

Bahnhofstraße 28, 66111 Saarbrücken, Deutschland / Allemagne

Email: info@omniscryptum.com

Herstellung: siehe letzte Seite /

Impression: voir la dernière page

ISBN: 978-3-330-86516-7

Copyright / Droit d'auteur © Farida Belkhiri, Abderrahmane Baghiani

Copyright / Droit d'auteur © 2017 OmniScriptum GmbH & Co. KG

Alle Rechte vorbehalten. / Tous droits réservés. Saarbrücken 2017

Résumé

La présente étude est consacrée pour évaluer in vitro les propriétés antioxydantes et antibactériennes des extraits méthanoliques, protéiques et des huiles essentielles à partir des racines de deux plantes utilisées dans la médecine traditionnelle en Algérie, *Tamus communis* L et *Carthamus caeruleus* L. Le potentiel antioxydant des échantillons était évalué en utilisant trois techniques complémentaires, l'inhibition du radical libre DPPH, le test du β -Carotène / Acide linoléique et la technique FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma). Le test antioxydant a montré que les fractions méthanoliques non polaires des deux plantes sont plus actives que les fractions polaires. Parmi ces fractions, l'extrait chloroformique de *T. communis* a montré dans le test du DPPH une IC₅₀ de 18.9 μ g/ml presque égale à ce du BHT (18.6 μ g/ml). Cette fraction était capable d'inhiber l'oxydation de la β -Carotène avec un pourcentage d'inhibition de 89.8 %. La concentration équivalente 1 (EC1) de la fraction chloroformique de *T. communis* par la technique FRAP a été 0.5 g/l à 4 min et 0.4 g/l à 30 min. Dans le test antibactérien, les huiles essentielles de *T. communis* ont significativement inhibé la croissance de sept souches bactériennes parmi neuf, provoquant des zones d'inhibition de 19 à 25 mm de diamètre. Les fractions méthanoliques non polaires ont montré une activité antibactérienne plus ou moins importante en comparaison avec les fractions polaires et les protéines.

Mots clés : Activité antioxydante, Activité antibactérienne, les huiles essentielles, *Tamus communis* L, *Carthamus caeruleus* L.

Abstract:

The present study was conducted to evaluate the in vitro antioxidant and antibacterial properties of methanolic extracts, protein and essential oils from the roots of two plants used in traditional medicine in Algeria, *Tamus communis L* and *Carthamus caeruleus L*. The antioxidant potential of pattern was evaluated using three complementary techniques, inhibition of free radical DPPH, the test of β -Carotene / linoleic acid and FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) technique. The antioxidant test indicates that the methanolic fractions non-polar of tow plants were more active than the polar fractions. Among these fractions, the chloroform extract of *T. communis* appear in the DPPH test an IC_{50} of 18.9 μ g/ml, almost equal to that of BHT (18.6 μ g/ml). This fraction was able to inhibiting the oxidation of β -Carotene with a percentage inhibition of 89.8%. The equivalent concentration1 (EC1) of the chloroform fraction of *T. communis* by the FRAP technique was 0.5 g / l at 4 min and 0.4 g / l at 30 min. In the test antibacterial essential oils of *T. communis* significantly inhibited the growth of seven from nine bacterial strains, causing the zones of inhibition from 19 to 25 mm of diameter. The non-polar methanolic fractions showed antibacterial activity more or less important compared with the polar fractions and protein.

Key words: antioxidant activity, antibacterial activity, essential oils, *Tamus communis L*, *Carthamus caeruleus L*.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AMC	Amoxicilline + Acide clavulanique
AMX	Amoxicilline
ATP	Adénosine Triphosphate
BHT	Butylated Hydroxytoluene
BSA	Bovine Standard Albumine
CAT	Catalase
CBB	Bleu de Coomassie Brillant
Cmp	Cloramphénicol
CNM	Corynebacterium, Nocardia, Mycobacterium
COV	Composé Organique Volatil
CTX	Cefotaxime
CZ	Cefazoline
DMSO	Diméthyle sulphoxide
Dot	Doxycyline
DP	Degré de Polymérisation
DPPH	2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
E	Erythromycine
E.Ac	Extrait d'acétate d'éthyle
E.Ac/ Cc	Extrait d'acétate d'éthyle de <i>Carthamus caeruleus L.</i>
E.Ac/ Tc	Extrait d'acétate d'éthyle de <i>Tamus communis L.</i>
E.AG	Equivalent d'acide gallique
E.Aq	Extrait aqueux
E.Aq/ Cc	Extrait aqueux de <i>Carthamus caeruleus L.</i>
E.Aq/ Tc	Extrait aqueux de <i>Tamus communis L.</i>
E.Br	Extrait brut
E.Br/ Cc	Extrait brut de <i>Carthamus caeruleus L.</i>
E.Br/ Tc	Extrait brut de <i>Tamus communis L.</i>
E.Ch	Extrait du chloroforme
E.Ch/ Cc	Extrait du chloroforme de <i>Carthamus caeruleus L.</i>
E.Ch/ Tc	Extrait du chloroforme de <i>Tamus communis L.</i>
E.Pr	Extrait protéique
E.Pr/ Cc	Extrait protéique de <i>Carthamus caeruleus L.</i>
E.Pr/ Tc	Extrait protéique de <i>Tamus communis L.</i>
EC1	Concentration équivalente 1
EQ	Equivalent de quercétine
ER	Equivalent de rutine
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma
Gen	Gentamicine
GSH	Glutathion réduit

GSSG	Glutathion oxydé
IC₅₀	Concentration provoquant 50 % d'inhibition
IPP	l'isopentenyl diphosphate
KDa	Kilo Dalton
Lin	Lincomycine
M.W.	Molecular Wide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
Néo	Néomycine
Nib	Nibiol
PA	ProAnthocyanidine
PB	Polymyxine
Pen	Penicilline
Rf	Rapport frontal
ROS	Reactive Oxygen Space (espèces réactives de l'oxygène)
SD	Standard Deviation
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate – Polyacrylamid Gel Electrophoresis
SIDA	Syndrome Immunodéficientaire Acquis
SOD	Super Oxydes Dismutases
SOD	Superoxydes Dismutases
Suf	Sulfamides Forts
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl ethylene diamine
TPTZ	Tripyridyl-Triazine
TRX	Thiorédoxine
UV	Ultraviolet
VIH	Virus d'Immunodéficience Humain

SOMMAIRE

Introduction	01
--------------------	----

CHAPITRE I: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 LE STRESS OXYDANT	04
I.1.1 Définition	04
I.1.2 Mécanismes du stress oxydant	04
I.1.2.1. Mécanisme pro-oxydant	04
I.1.2.1.1. Les dérivés actifs de l'oxygène	05
I.1.2.1.2. Formation des dérivés actifs de l'oxygène	06
I.1.2.1.3. Les cibles des dérivés actifs de l'oxygène	08
I.1.2.1.4. Pathologies du stress oxydant	09
I.1.2.2. Mécanisme antioxydant	10
I.1.2.2.1. Les Enzymes	11
A. Les superoxydes dismutases (SOD)	11
B. Les catalases	11
C. Les glutathions peroxydases	11
D. La thiorédoxine (TRX)	12
I.1.2.2.2. Les molécules antioxydantes	12
A. La vitamine C	12
B. La vitamine E	13
C. Le sélénium	13
D. Le zinc	13
E. Les polyphénols	13
I.2 LES INFECTIONS MICROBIENNES	14
I.2.1. Définition	14
I.2.2. Les agents antimicrobiens	16
I.2.2.1. Mécanismes d'action	16
I.2.3.2 Antibiotiques	17
I.2.4. La résistance bactérienne	18
I.3 LES POLYPHENOLS	20
I.3.1 Définition	20
I.3.2. Les acides phénoliques	21
I.3.3. Les tannins	22
I.3.4. Les flavonoïdes	23
I.3.4.1. Structure chimique et classification	24
I.3.4.2. Propriétés physico-chimiques des flavonoides	27
I.3.4.3. Biosynthèse des flavonoides	28
I.3.4.4. Activités biologiques des flavonoides	28
I.3.5. Activité antioxydante des polyphénols	29
I.3.6. Activité antimicrobienne des polyphénols	31
I.4. LES HUILES ESSENTIELLES	34
I.4.1. Définition	34
I.4.2. Composition chimique des huiles essentielles	34

1.4.2.1. Les terpènes -----	35
A. Les monoterpènes -----	35
B. Les sesquiterpènes -----	36
1.4.2.2. Les composés aromatiques -----	37
1.4.3. Activité biologique et utilisations des huiles essentielles -----	37
1.4.4. Activité antimicrobienne des huiles essentielles -----	38
1.4.5. Activité liée à la composition chimique -----	40
1.5. LES PLANTES MEDICINALES -----	43
1.5.1. <i>Tamus communis L.</i> -----	43
1.5.1.1. Description -----	43
1.5.1.2. Distribution géographique -----	44
1.5.1.3. Actions et utilisations médicinales -----	45
1.5.2. <i>Carthamus caeruleus L.</i> -----	46
1.5.2.1. Description -----	46
1.5.2.2. Distribution géographique -----	47
1.5.2.3. Actions et utilisations médicinales -----	47

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II. MATERIEL -----	48
II.1.1. Matériel biologique -----	48
II.1.2. Produits -----	48
II.1.3. Appareillage -----	49
II.2 TECHNIQUES -----	49
II.2.1. Techniques d'extraction -----	49
II.2.1.1. Extraction des flavonoides -----	49
II.2.1.2. Extraction des protéines -----	51
II.2.1.3. Extraction des huiles essentielles -----	51
II.2.2. Etude quantitative -----	52
II.2.2.1. Dosage des polyphenols -----	52
II.2.2.2. Dosage des flavonoides -----	53
II.2.2.3. Dosage des protéines -----	54
II.2.2.4. Electrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) -----	55
II.2.3. Etude de l'activité antioxydante des différents extraits -----	56
II.2.3.1. Technique du 2, 2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) -----	56
II.2.3.2. Technique de la β -Carotène/ acide linoléique -----	57
II.2.3.3. Technique de Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) -----	58
II.2.4. Etude de l'activité antibactérienne des différents extraits -----	60
II.2.4.1. Méthode des puits de diffusion -----	60
II.2.4.2 Méthode des disques de diffusion -----	60
II.3 Analyse statistique -----	61

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 RESULTATS -----	62
III.1.1 Extraction et dosage des composés phénoliques -----	62
III.1.2 Extraction, dosage et électrophorèse des protéines -----	63
III.1.3 Extraction des huiles essentielles -----	66
III.1.4 L'activité antioxydante des différents extraits -----	66
III.1.4.1 Le pouvoir scavenger évalué par la technique DPPH -----	67
III.1.4.2 L'effet antioxydant évalué par la technique de la β -Carotène -----	72
III.1.4.3 Le pouvoir réducteur estimé par la technique FRAP -----	76
III.1.5 L'activité antibactérienne -----	80
III.1.5.1 L'activité antibactérienne des extraits méthanoliques et protéique -----	80
III.1.5.2. L'activité antibactérienne des huiles essentielles -----	84
III.2 Discussion -----	88
III.2.1 Caractérisation des différents extraits -----	88
III.2.2 L'activité antiradicalaire estimée par la méthode DPPH -----	91
III.2.3 L'activité antioxydante estimée par la technique de la β -Carotène -----	93
III.2.4 Le pouvoir réducteur estimé par la technique FRAP -----	94
III.2.5 Relation entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits --	95
III.2.6 L'activité antibactérienne -----	99
III.2.6.1 L'activité antibactérienne des extraits méthanoliques et protéiques -----	99
III.2.6.2 L'activité antibactérienne des huiles essentielles -----	102
A. Extraction des huiles essentielles -----	102
B. L'activité antibactérienne -----	103
Conclusion -----	107
Bibliographie -----	108

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : L'O ₂ , à l'origine des radicaux libres -----	04
Figure 2 : Production de ROS dans la cellule -----	05
Figure 3 : Cibles de l'action des antibiotiques -----	14
Figure 4: Structure générale des flavonoides -----	18
Figure 5: Structure chimique de certains monoterpènes-----	28
Figure 6: Structure chimique de certains sesquiterpènes-----	28
Figure 7 : Structure chimique de certains composés aromatiques -----	29
Figure 8 : Prise de vue du <i>Tamus communis L</i> et leurs parties -----	35
Figure 9 : Prise de vue du <i>Carthamus caeruleus L.</i> et leurs fleurs -----	37
Figure 10: Les étapes d'extraction des flavonoides par les solvants organiques -----	40
Figure 11: Gamme étalon de l'acide gallique avec le réactif du bleu de Prusse -----	42
Figure 12: Gamme étalon de la quercétine et de la rutine avec le réactif de l'AlCl ₃ -----	43
Figure 13: Gamme étalon de l'albumine bovine avec le réactif de Macart -----	44
Figure 14 : Courbe étalon des poids moléculaires standard -----	45
Figure 15: Gamme d'étalonnage du FeSO ₄ 7H ₂ O -----	48
Figure 16 : Electrophorèse (SDS-PAGE) des protéines -----	53
Figure 17 : le pouvoir antioxydant évalué par la technique du DPPH -----	56
Figure 18 : Comparaison entre les concentrations provoquant 50% d'inhibition (IC ₅₀) du radicale DPPH -----	59
Figure 19 : Cinétique d'inhibition d'oxydation de la β-Carotène -----	61
Figure 20: Cinétique de la réduction du TPTZ-Fe ³⁺ en TPTZ-Fe ²⁺ -----	64
Figure 21: Les zones d'inhibition effectuées par quelques extraits -----	68
Figure 22 : Les zones d'inhibition effectuées par les huiles essentielles du <i>Tamus communis</i> L. sur les différentes souches bactériennes testées-----	69

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Quelques pathologies du stress oxydant -----	07
Tableau 2: Structure des différentes classes de flavonoïdes -----	19
Tableau 3 : Rendements des différents extraits -----	52
Tableau 4: Les valeurs d'IC50 en microgramme par millilitre, des différents échantillons BHT. -----	58
Tableau 5 : La concentration équivalente 1 (EC1) -----	65
Tableau 6: Les zones d'inhibition des souches bactériennes -----	67
Tableau 7: Les diamètres des zones d'inhibition (DD en millimètre) des souches bactériennes provoquées par les extraits des deux plantes, les standards et les contrôles positifs.-----	67
Tableau 8: Les diamètres des zones d'inhibition (DD en millimètre) des souches bactériennes provoquées par les huiles essentielles des deux plantes, les standards et les contrôles positifs -----	68

INTRODUCTION

Longtemps avant que l'humanité n'ait découvert l'existence de microbes, l'idée que de certaines plantes avaient un potentiel guérissant été bien acceptée (Rios et Recio, 2005), ainsi que plusieurs diverses lignes d'évidence indiquent que les plantes médicinales représentent la forme la plus vieille et la plus étendue de médication, elles ont été régulièrement employées par les gens aux temps préhistoriques (Robert et Halberstein, 2005). En dépit de l'utilisation croissante de médicaments synthétiques des plantes, le matériel curatif organique naturel a persisté comme le "traitement de choix" pour une multitude de problèmes de santé des populations à travers le monde entier.

Depuis l'antiquité, l'homme a utilisé des plantes pour traiter des maladies infectieuses communes et certaines de ces médecines traditionnelles sont toujours incluses dans le cadre du traitement habituel de différentes maladies. Par exemple, l'utilisation de bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) et le jus de canneberge (*Vaccinium macrocarpon*) pour traiter les infections d'étendue urinaire est annoncée dans de différents manuels de phytothérapie, cependant, des espèces comme le baume jaune citron (*Mélisse officinalis*), l'ail (*Allium sativum*) et l'arbre de tee (*Melaleuca alternifolia*) sont décrites comme des agents antimicrobiens de large spectre (Heinrich *et al.*, 2004). Cela étant dit, il était généralement les huiles essentielles de ces plantes plutôt que leurs extraits qui ont eu la plus grande utilisation dans le traitement de pathologies infectieuses dans le système respiratoire, l'étendue urinaire, gastrointestinale et les systèmes biliaires, aussi bien que sur la peau. En cas de *Melaleuca alternifolia*, par exemple, l'utilisation d'huile essentielle est un instrument thérapeutique commun pour traiter l'acné et d'autres problèmes infectieux de la peau (Vanaclocha et Canigueral, 2003).

Plus de 200 pathophysiologies humaines allant de l'athérosclérose au cancer en passant par le diabète, le SIDA ou toutes les maladies à caractère inflammatoire (arthrite rhumatoïde, endotoxémie, ...), sont dues notamment au stress oxydant (Pincemail *et al.*, 2003). Ce dernier se définit comme la conséquence d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres et leur destruction par des systèmes de défenses anti-oxydantes (Favier, 2003). Les radicaux libres peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles : protéines, lipides et acides nucléiques. Les radicaux libres sont une forme particulière d'espèces chimiques (atomes ou molécules) possèdent un électron célibataire (ou non apparié), ils sont générés entre autres dans les mitochondries lors du transfert d'électrons, dans les cellules phagocytaires lors d'un processus inflammatoire et au cours de processus physiologiques d'oxydoréduction. Cette propriété rend les radicaux libres aptes à réagir avec différentes molécules (Januel, 2003).

En condition physiologique, le pouvoir oxydant des radicaux libres est contrebalancé par de nombreux antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques, on peut notamment citer certaines vitamines (C et E; bêta-carotène), mais aussi les phyto-nutriments (polyphénols, caroténoïdes...), les oligo-éléments (sélénium, zinc, cuivre,...), etc (Edeas, 2006). Cependant, les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation. Ils possèdent des propriétés antioxydantes et sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (tabac, pollution, infections...). Selon les chercheurs, l'effet protecteur des fruits et légumes vis-à-vis des maladies de civilisation (maladies cardiovasculaires, diabète...) serait d'ailleurs lié à la présence de très nombreux polyphénols, vitamines et acides phénoliques, présents dans ces aliments (Edeas, 2006).

Parmi les plantes médicinales du bassin méditerranéen on cite le *Tamus communis L.* et le *Carthamus caeruleus L.* En Algérie, les racines du *Tamus communis L.* sont

traditionnellement utilisées comme purgatif et comme diurétique (en usage externe, notamment pour soulager les patients souffrant de lumbago ou de rhumatismes). Boullard, (2001) a mentionné que l'application des racines de la plante, grattées en pâte, sous forme de cataplasme, soulage les douleurs des patients atteints de la goutte, les rhumatismes et la paralysie fonctionnelle. Le *Carthamus caeruleus L.* c'est une espèce peu commune qu'on peut rencontrer dans les terrains maigres de Provence et de Corse. Elle préfère les lieux secs et ensoleillés du Bassin méditerranéen, elle est originaire du Sud - Ouest de l'Asie (Mioulane, 2004). Les racines du *Carthamus caeruleus L.* sont utilisées en Algérie, comme un cicatrisant contribue à guérir les brûlures, soit sous forme de poudre ou d'une crème préparée dans le lait ou l'eau.

Dans ce présent travail nous avons essayé d'extraire les polyphénols (flavonoïdes), les protéines et les huiles essentielles à partir des racines des deux plantes *Tamus communis L* et *Carthamus caeruleus L.* L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée en utilisant trois techniques complémentaires ; l'activité scavenger du radical 2,2'-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), La technique de la β -Carotène/acide linoléique et la technique FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma). L'activité antimicrobienne a été évaluée par la méthode des disques de diffusion sur différentes souches bactériennes.

CHAPITRE I: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. LE STRESS OXYDANT

I.1.1. Définition

Dans les systèmes biologiques, l'oxygène est normalement transformé en molécules d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction est cruciale puisqu'elle apporte à la cellule toute l'énergie nécessaire (sous forme d'adénosine triphosphate (ATP)) pour assurer ses multiples fonctions (Favier, 2003). Le processus n'est toutefois pas parfait car une faible partie de l'oxygène (2 à 5%) est convertie en espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Pincemail *et al.*, 2003). Le stress oxydant se définira donc comme un déséquilibre de la balance entre la formation des espèces réactives de l'oxygène à caractère pro-oxydant et les antioxydants qui régulent leur production, en faveur des premières (Halliwell et Aruoma, 1993 ; Azzi *et al.*, 2004; Soares, 2005; Valavanidis *et al.*, 2006 ; França *et al.*, 2007).

I.1.2. Mécanismes du stress oxydant

I.1.2.1. Mécanisme pro-oxydant

Il est à noter que dans le processus de production d'énergie, l'oxygène moléculaire intervient seulement comme l'accepteur terminal des quatre électrons transférés par la chaîne des électrons (França *et al.*, 2007 ; Leeuwenburgh et Heinecke, 2001). Comprendre que l'oxygène moléculaire représente finalement qu'un accepteur d'électrons permet de faire le lien entre oxygène, radicaux libres, et ROS.

Par sa configuration électronique, l'oxygène moléculaire est un radical libre. Il possède en effet deux électrons non appariés (Koechlin-Ramonatxo *et al.*, 2006) (**Figure 1**). Heureusement, un blocage cinétique limite sa réactivité: les spins de ces deux électrons célibataires sont parallèles lui attribuant une stabilité relativement grande (Asmus *et al.*,

2000). Cependant, dans l'organisme une partie de cet oxygène moléculaire (1 à 2 %) peut capter de manière univalente et séquentielle un électron conduisant alors à la formation du chef de file des espèces oxygénées réactives: l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) (Boveris et Chance, 1973). C'est ainsi que dans la mitochondrie, à l'état physiologique, il existe lors du transport électronique le long de la chaîne respiratoire, une fuite d'électrons, à l'origine de la production de $O_2^{\cdot -}$ (Ji, 2001). La poussée respiratoire des polynucléaires neutrophiles (respiratory burst) et les oxydases (xanthine oxydase, NO synthase, eicosanoïdes) constituent également des sources cellulaires de la production d'anion superoxyde (Ji, 2001). Ce radical superoxyde va alors conduire au cours de véritable chaîne d'oxydoréductions à la formation de nombreuses espèces très réactives (Koechlin-Ramonatxo *et al.*, 2006).

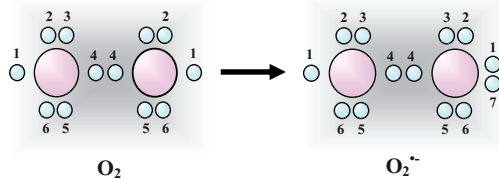


Figure 1 : $L'O_2$, à l'origine des radicaux libres (Koechlin-Ramonatxo *et al.*, 2006).

I.1.2.1. 1. Les dérivés actifs de l'oxygène

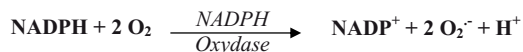
Un radical libre se définit comme tout atome, groupe d'atomes ou molécule possédant un électron non apparié (célibataire) sur l'orbitale externe (Levesque, 2006). Cette caractéristique lui confère une réactivité importante: les radicaux libres réagissent avec des molécules plus stables pour capter ou céder leurs électrons, créant ainsi de nouveaux radicaux en initiant des réactions en cascade (Januel, 2003 ; Baril, 2007).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle

particulier en physiologie (Park *et al.*, 2007) et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et le radical hydroxyle OH^{\cdot} , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO^{\cdot} (Yoshikawa *et al.*, 2000). D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Favier, 2003).

I.1.2.1. 2. Formation des dérivés actifs de l'oxygène

Les ROS peuvent être formés dans la cellule par des voies non enzymatiques ou enzymatiques, la principale source étant la réduction d'une molécule d' O_2 en radical anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Cette réaction semble surtout, catalysée par des NADPH oxydases membranaires (Wolin, 1996), qui sont généralement des chaînes de transport d'électrons constituées de flavoprotéines, cytochromes et quinones, la réaction globale est la suivante:



L' $O_2^{\cdot-}$ peut également être formé dans certains organites cellulaires tels que les peroxysomes, via la conversion de l'hypoxanthine en xanthine, puis en acide urique, catalysée par la xanthine oxydase, et les mitochondries lors d'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire (Wolin, 1996). Une fois formé, l' $O_2^{\cdot-}$ peut être neutralisé par un H^+ et transformé en radical hydroperoxyde (HOO^{\cdot}) ou réagir avec le NO^{\cdot} (diminuant ainsi la disponibilité de NO^{\cdot} et donc la vasorelaxation endothélium-dépendante) pour former l'anion peroxydinitrite

(ONOO⁻). Celui-ci peut nitrer des protéines au niveau des résidus tyrosines ou engendrer un radical nitrite NO₂[•] et le radical hydroxyle (HO[•]) (Figure 2) (Januel, 2003).

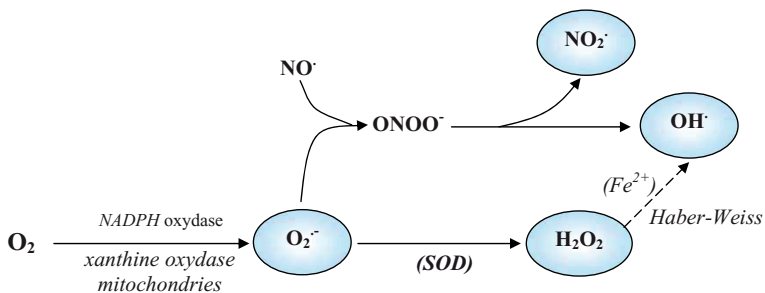
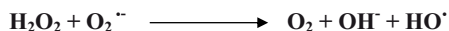


Figure 2 : Production de ROS dans la cellule (Januel, 2003).

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est une espèce stable, mais diffusible et avec une durée de vie compatible avec une action à distance de son lieu de production. Le peroxyde d'hydrogène est formé secondairement par la dismutation de l'anion superoxyde :



La dismutation de O₂^{•-} spontanée ou catalysée par les superoxydes dismutases est la source majeure de H₂O₂ (Park *et al.*, 2007). De plus, H₂O₂ est aussi produit *in vivo* par différentes oxydases, incluant les aminoacides oxydases est la xanthine oxydase. H₂O₂ n'est pas un radical libre mais a la capacité de générer des radicaux hautement réactifs. Le H₂O₂ peut être réduit suivant la réaction d'Haber-Weiss engendrant alors un ion OH⁻ inoffensif et un radical hydroxyle HO[•] plus agressif (Januel, 2003) :



Cette réaction est lente et probablement inopérante dans les tissus vivants. En revanche, la réaction de Fenton, qui nécessite l'intervention d'ions Fe^{2+} , se produit in vivo. Elle met en jeu la capacité du peroxyde d'hydrogène à oxyder des composés aromatiques en présence de fer:



Le radical hydroxyle a une demi-vie extrêmement courte et une capacité à diffuser restreinte. Il peut réagir avec un certain nombre de molécules comme les lipides organiques en enlevant ou en ajoutant une molécule d'hydrogène sur les liaisons insaturées (Januel, 2003).

I.1.2.1. 3. Les cibles des dérivés actifs de l'oxygène

Lors d'un stress oxydant, les ROS non « détoxiquées » par le système antioxydant attaquent et endommagent par oxydation les macromolécules contenues dans les cellules, notamment les lipides, les protéines, l'ADN... directement à leur contact (Koechlin-Ramonatxo *et al.*, 2006).

L'attaque des radicaux libres au sein des doubles liaisons lipidiques membranaires induit des processus de peroxydations en cascade aboutissant à la désorganisation complète de la membrane altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de barrière et d'information (Davies, 2000).

La toxicité des ROS s'exerce également sur les protéines. Les ROS sont en effet capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, altérant également leur fonction. Les plus sensibles à leur action sont les acides aminés aromatiques comme le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, sur lesquels le radical OH^\bullet s'additionne, modifiant la conformation de la protéine (Dean *et al.*, 1997). Sur les acides aminés contenant un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine, l'oxydation par les radicaux libres conduit à la formation de ponts disulfures, donc à l'agrégation de plusieurs molécules de protéines. Les

ROS sont aussi capables de couper des liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques. Par ailleurs, le radical OH^\bullet , mais aussi l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$, s'attaquent également aux protéines des tissus de soutien, comme le collagène du tissu conjonctif. L'oxydation de ces acides aminés conduit à une modification de la conformation spatiale et à une altération de la fonction protéique (Dean *et al.*, 1997). Les protéines oxydées perdent leur capacité à se fixer correctement sur un récepteur ou à fixer spécifiquement un ligand, altérant la signalisation cellulaire.

L'ADN est également une cible majeure des ROS. Les radicaux $\text{O}_2^{\bullet-}$ et OH^\bullet provoquent des lésions de l'ADN. Ceux-ci peuvent en effet interagir avec les désoxyriboses de l'ADN mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques. Ces altérations structurales lorsqu'elles ne sont « réparées » entraînent à long terme des altérations géniques : cassures chromosomiques, mutations, délétions, amplifications, à l'origine d'un dysfonctionnement au niveau du métabolisme protéique (Hartmann et Niess, 2000).

I.1.2.1. 4. Pathologies du stress oxydant

Dans de nombreux articles précédents, ont été montré que le stress oxydant est impliqué dans le développement de plus de 200 pathophysiologies (Pincemail *et al.*, 2003) allant de l'athérosclérose au cancer en passant par le diabète, le SIDA ou toutes les maladies à caractère inflammatoire (arthrite rhumatoïde, endotoxémie, ...) (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Quelques pathologies du stress oxydant.

Pathologies	Références
Ischémie- reperfusion	(Granger <i>et al.</i> , 1981 ; Granger, 1988 ; Talbott <i>et al.</i> , 1995 ; Lesgards <i>et al.</i> , 2002).
Diabète	(Paolisso <i>et al.</i> , 1993; Knoepfel <i>et al.</i> , 1994; Lesgards <i>et al.</i> , 2002).
Athérosclérose	(Steinberg, 1993; Berliner et Heinecke, 1996; Lesgards <i>et al.</i> , 2002).
Maladies intestinales inflammatoires	(Lesgards <i>et al.</i> , 2002).
Arthrite	(Mc Cord, 1974 ; Lesgards <i>et al.</i> , 2002).
Maladies neurodégénératives Maladie de Parkinson et d'Alzheimer	(Jenner et Olanow,1996 ; Giasson <i>et al.</i> , 2000 ; Lesgards <i>et al.</i> , 2002 ; Zafrilla <i>et al.</i> , 2007).
Cancer	(Pincemail <i>et al.</i> , 1999 ; Ames et Shigenaga, 1996 ; Lesgards <i>et al.</i> , 2002).
Maladies du système immunitaire	(Lesgards <i>et al.</i> , 2002).
Allergies	(Picardo <i>et al.</i> , 1992; Schmidt <i>et al.</i> , 1990; Lesgards <i>et al.</i> , 2002).

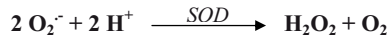
I.1.2.2. Mécanismes antioxydants

Les organismes aérobies sont protégés contre les ROS par des systèmes enzymatiques et des scavengers chimiques qui sont capables d'éliminer ces radicaux. En plus de la défense primaire qui implique généralement des enzymes comme la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase (Proctor et Reynolds, 1984), un autre système appelé défense secondaire qui, à côté de certaines glutathion transférases et des oxydo-réductases, fait intervenir de nombreuses molécules capables de capter les ROS pour produire des espèces chimiques moins toxiques. C'est le cas de la vitamine E (α -tocophérol), des caroténoïdes et des polyphénols (De Groot et Ratten, 1998).

I.1.2.2. 1. Les Enzymes

A. Les superoxydes dismutases (SOD)

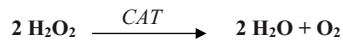
Les superoxydes dismutases ou SOD (EC1.15.1.1) sont des enzymes ubiquitaires catalysant la dismutation des anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et oxygène moléculaire (Serrano et Klann, 2004 ; Hwang et Kim, 2007) selon la réaction suivante:



Ces enzymes accélèrent la vitesse de cette réaction spontanée rendant très rapides la disparition du superoxyde mais en générant le peroxyde d'hydrogène. Celui-ci est un composé oxydant mais peut être ultérieurement catabolisé par la catalase et les glutathions peroxydases.

B. Les catalases

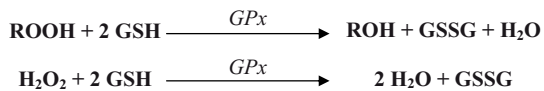
La catalase ou CAT (EC 1.11.1.6) est une protéine héminique qui catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire (Serrano et Klann, 2004) selon la réaction suivante:



La catalase se trouve dans les hématies et dans les peroxysomes de nombreux tissus et cellules. Cette compartimentation l'empêche d'être un accepteur pour l' H_2O_2 formé dans le cytosol et les mitochondries (Januel, 2003).

C. Les glutathion peroxydases

Les glutathion peroxydases présentes dans la plupart des tissus de mammifères, catalysent la réduction par le glutathion du peroxyde d'hydrogène et de divers hydroperoxydes lipidiques produits (Schradler *et al.*, 2006 ; Reichheld *et al.*, 2005). Les réactions mises en jeu sont les suivantes:



D. La thiorédoxine (TRX)

Cet enzyme a une structure proche de celle de la glutathion réductase. Il consomme aussi du NADPH dans son fonctionnement. Il joue un rôle protecteur contre une grande variété de stress oxydants grâce à ses propriétés de capture des radicaux libres. Des données biochimiques montrent que les thiorédoxines réduisent des protéines clés pour le développement, la division cellulaire ou la réponse au stress oxydant (Reichheld *et al.*, 2005).

I.1.2.2. 2. Les molécules antioxydantes

Afin de se protéger contre une exposition excessive aux radicaux libres, l'organisme peut fabriquer ses propres antioxydants à partir des nutriments suivants qui se trouvent dans la nourriture et les suppléments nutritionnels tel que l'acide aminé cystéine, les vitamines du complexe B, des minéraux comme le cuivre, le manganèse, le sélénium et le zinc (Hosein et Lytle, 2001). La nourriture renferme également des antioxydants tout faits qui contribuent à protéger l'organisme, dont : vitamine C, vitamine E, polyphénols (flavonoïdes, tanins...), caroténoïdes mixtes comme l'alphacarotène, le bêta-carotène et le lycopène (Serrano et Klann, 2004 ; Edeas, 2006).

A. La vitamine C

La vitamine C empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase). Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle passe par une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée (Chen *et al.*, 2000).

B. La vitamine E

Il est admis que les radicaux tocophéryles sont régénérés par l'acide ascorbique et que sans cette synergie, les tocophérols sont inactifs (Carr *et al.*, 2000). Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' α -tocophérol (α -TocH), connu comme inhibiteur de la propagation lipidique, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO₂, et constitue par ce biais le seul antioxydant liposoluble assurant cette protection (Khalil, 2002).

C. Le sélénium

Le sélénium est un micro-élément essentiel (constituant de la glutathion peroxydase) qui intervient dans la protection contre les espèces oxygénées réactives. Il semble impliqué dans l'élimination des acides gras peroxydés et en association avec la vitamine E, dans la destruction des radicaux libres produits par le métabolisme cellulaire. Cet effet de détoxification serait responsable des effets anti-cancéreux et anti-vieillessement, attribués au sélénium (Wolters *et al.*, 2005 ; Falquet et Hurni, 2006).

D. Le zinc

Cet oligo-élément est un des co-facteurs essentiels de la SOD. La prise de zinc conduit à long terme à l'induction de protéines antioxydantes comme les métallothionéines. Le zinc protège également les groupements thiols des protéines. Le zinc peut inhiber partiellement les réactions de formation d'espèces oxygénées induites par le fer ou le cuivre (Mezzetti *et al.*, 1998).

E. Les polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires, d'un poids moléculaire élevé. Ils sont largement distribués dans le règne végétal (Haslam, 1993). La structure de base qui les caractérise est la présence d'un ou plusieurs noyaux aromatiques auquel sont directement liés

un ou plusieurs groupements hydroxyle libres ou engagés dans une autre fonction (éther, ester) (Harborne, 1994).

Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation. Ils possèdent des propriétés antioxydantes et sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (tabac, pollution, infections...). Selon les chercheurs, l'effet protecteur des fruits et légumes vis-à-vis des maladies de civilisation (maladies cardiovasculaires, diabète...) serait d'ailleurs lié à la présence de très nombreux polyphénols, vitamines et acides phénoliques, présents dans ces aliments (Edeas, 2006).

I.2. LES INFECTIONS MICROBIENNES

I.2.1. Définition

Les bactéries aéroportées cultivables ou non, les champignons microscopiques saprophytes, leurs fragments (fragments cellulaires, flagelles et matériel génétique), leurs métabolites (COV (composé organique volatil), endotoxines, mycotoxines) et les virus, sont largement responsables d'une variété de maladies liées à leur présence dans l'environnement (Hurst, 1997 ; Rylander, 1998). Les germes qui ne sont pas intrinsèquement pathogènes provoquent des symptômes de processus inflammatoires, de stimulations des réponses immunitaires, de largages de substances toxiques ou d'allergènes (Salthammer, 1999). Les premières parties atteintes du corps sont les yeux, le nez et la gorge.

Les principaux types de maladies sont des irritations et des inflammations du système respiratoire (la bronchiolite), des maladies infectieuses (la légionellose) et virales et des allergies. Il existe quelques cas rares de cancers et d'immunosuppressions. Malgré que toutes les moisissures et leurs spores ne sont pas pathogènes, ils peuvent déclencher des maladies

respiratoires de type allergique chez des personnes prédisposées et sensibles, ou déclencher et ou aggraver des crises chez les asthmatiques (Gumowski et Grange, 1987).

Les infections nosocomiales concernent toute affection à microorganisme (bactéries 90% et champignons) survenant chez un malade hospitalisé et sans rapport, à priori, avec l'affection qui a motivé son intervention. Elles sont soit liées à un soin (ou une intervention) ou simplement dues à l'environnement hospitalier. Ces infections se présentent sous diverses formes: infections urinaires, respiratoires, digestives et post-opératoires. Elles peuvent aussi être dues à la contamination du matériel: cathéters et tubes trachéaux (Borrel, 2000).

Les microorganismes incriminés dans les infections microbiennes sont rarement des protozoaires, quelques fois des champignons (*Aspergillus*, *Cryptococcus*), des levures (*Candida*) et parfois des virus (hépatites, herpès, grippe). On retrouve très souvent des bactéries ou leurs formes altérées, dont l'apparition est favorisée par l'usage des antibiotiques: bactéries à Gram positif tel que *Staphylococcus*, *Enterococcus* et bactéries à Gram négatif comme les *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Klebsiella sp.*,...), *Pseudomonadaceae* (Haxhe et Zumofen, 1999).

La capacité des microorganismes de créer une infection chez l'homme découle de plusieurs facteurs dont la nature du microbe et la réceptivité de l'hôte (Haxhe et Zumofen, 1999). La sensibilité des malades peut être due à certaines conditions comme l'âge et le poids, ainsi que le diabète ou la leucémie, la malnutrition, le stress et même le coma. Elle peut être aussi induite à des traitements à base d'immunodépresseurs, de stéroïdes ou de radiothérapie (Borrel, 2000). La nature mais aussi la taille des cellules sont déterminantes pour les risques encourus lors d'une contamination. En règle générale, plus la particule est petite plus le risque est grand car les petites particules, telles les bactéries et les virus qui pénètrent jusqu'aux bronchioles et alvéoles, ne sont pas expulsés facilement lors de l'expiration.

I.2.2. Les agents antimicrobiens

Un agent antimicrobien ou désinfectant est défini par son pouvoir de tuer des populations microbiennes. On attend d'un agent désinfectant généralement une action à large spectre et plus rarement une action ciblée sur un germe en particulier (désinfection sélective).

Pour une action bactéricide globale sur les bactéries on doit s'assurer de l'activité bactéricide de l'agent antimicrobien aussi bien sur les espèces à Gram positif que négatif, sans exclure le groupe CNM (Corynebacterium, Nocardia, Mycobacterium). Ces trois groupes de bactéries se distinguent par la composition et la structure de leur paroi cellulaire dont dépend la perméabilité aux agents antimicrobiens (Pibiri, 2006).

I.2.2.1. Mécanismes d'action

Les mécanismes d'action des produits antimicrobiens autres que les antibiotiques restent encore généralement peu et mal connus. Les agents chimiques antimicrobiens se classent en deux catégories selon leur effet. Le premier est létal, c'est à dire qu'il entraîne la mort de l'individu. On le nomme par le suffixe –CIDE : virucide, bactéricide, fongicide, insecticide. Le second correspond à une inhibition de croissance en présence du produit actif. On le nomme avec le suffixe –STATIQUE : bactériostatique, fongistatique.

Parmi les produits BIOCIDES, on distingue **i**) les composés chimiquement très réactifs qui se caractérisent par une action brutale, rapide et temporaire et souvent non spécifique. Exemples : les oxydants et l'eau oxygénée, les halogénés (chlore et iode) et l'oxyde d'éthylène, les acides et les bases fortes, les aldéhydes et les phénols. **ii**) les composés chimiquement stables à actions plus spécifiques comme les ammoniums quaternaires, les dérivés phénoliques autres que le phénol, la chlorohexidine parmi d'autres.

Les inhibiteurs de croissance avec un effet BIOSTATIQUE comprennent essentiellement les métaux (mercuriels et dérivés du cuivre, du zinc, de l'argent,...) et les colorants.

Selon leur nature et la concentration utilisée, les antiseptiques et désinfectants ont une ou plusieurs cibles. Dans la majeure partie des cas, l'accès à la cible nécessite le franchissement de la paroi cellulaire qui est un obstacle à la fois chimique et physique.

M.R.J. Salton en 1968 a décrit cinq étapes dans l'action des agents antimicrobiens (Fleurette et Freney, 1995) :

1. Adsorption sur la cellule suivie de la pénétration dans la paroi.
2. Réactions complexes avec la membrane cytoplasmique conduisant à sa désorganisation.
3. Echappement des composants de faible poids moléculaire du cytoplasme.
4. Dégénération des protéines et des acides nucléiques.
5. Lyse de la paroi causée par les enzymes autolytiques.

I.2.3.2 Antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances destinées à agir sur les microorganismes indésirables principalement chez les humains. La majorité des antibiotiques actuels sont de nature synthétique ou semi synthétique. Actuellement on compte environ 250 antibiotiques disponibles (Guillemot, 2005). Le mode d'action des antibiotiques est connu car ils sont développés en fonction de leur « cible » (**Figure 3**), c'est à dire de l'effet destructeur désiré (Ros, 1999). On les classe d'ailleurs selon leur mécanisme de destruction de la cellule bactérienne (Pibiri, 2006) :

1. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne.
2. Antibiotiques inhibant la synthèse de la membrane cytoplasmique.
3. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique.
4. Antibiotiques inhibiteurs du métabolisme des acides nucléiques et de la synthèse de l'ADN.
5. Antibiotiques agissant par inhibition compétitive (exemple d'autres mécanismes).

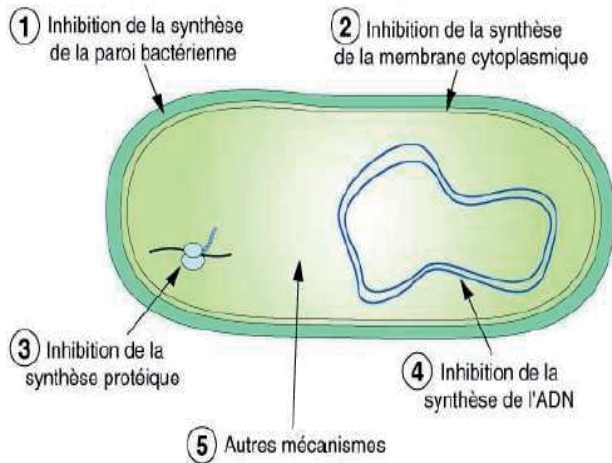


Figure 3 : Cibles de l'action des antibiotiques (Pibiri, 2006).

I.2.4. La résistance bactérienne

Le recours à des médicaments antimicrobiens comme les antibiotiques pour traiter les maladies infectieuses constitue un point marquant dans l'histoire de la médecine. Mais en raison de l'usage généralisé de ces types de médicaments, plusieurs souches de grandes familles de bactéries pathogènes sont devenues résistantes à un ou plusieurs antibiotiques. De fait, la prolifération de ces microorganismes résistants pose un grave problème de santé à l'échelle mondiale, un problème dont les conséquences pourraient bien s'avérer irréversibles (Mehrotra *et al.*, 2003). Parmi 2 millions de personnes qui acquièrent des infections bactériennes aux hôpitaux américains chaque année, 70 % de cas impliquent maintenant des souches qui sont résistantes à au moins un antibiotique (Tim Cushnie et Lamb, 2005).

La résistance est un phénomène naturel qui survient lorsque les bactéries qui produisent des antimicrobiens tentent de se protéger contre ces mêmes antimicrobiens. On a démontré que la résistance bactérienne existait avant même qu'on commence à utiliser les

antimicrobiens en médecine humaine et que cette résistance « intrinsèque » reflète l'adaptation évolutive des bactéries aux toxines naturelles présentes dans l'environnement (Mehrotra *et al.*, 2003). La résistance intrinsèque peut exister pour plusieurs raisons on citant : la cible antimicrobienne normale n'est pas présente dans la cellule bactérienne, n'est pas vulnérable à l'antimicrobien ou ne peut être atteinte par l'antimicrobien. La résistance intrinsèque peut aussi résulter de la présence d'enzymes dégradantes naturelles (Mehrotra *et al.*, 2003).

Les familles de bactéries ont deux façons de bâtir artificiellement une résistance quand elles sont exposées à un antimicrobien. La première suppose un changement ou une mutation des gènes de la bactérie (Wang *et al.*, 2003; Cheung *et al.*, 2005 ; Hooper, 2000), alors que la seconde se manifeste quand les bactéries acquièrent les gènes de résistance présents dans d'autres bactéries (Liebert *et al.*, 2000 ; Steinmoen *et al.*, 2002), ce qu'on qualifie aussi de résistance « extrinsèque ». Les gènes de résistance peuvent se transférer directement entre les membres d'une même espèce ou à partir d'une espèce différente (Wang *et al.*, 2003; Cheung *et al.*, 2005 ; Hopkins *et al.*, 2005). Dans les deux cas, la capacité de résister à un antimicrobien donne un grand avantage aux bactéries; elles sont alors en mesure de se multiplier et d'élargir leur niche unique en colonisant les surfaces et en s'attachant aux récepteurs où vivaient auparavant les bactéries souvent inoffensives ou bénéfiques détruites par l'exposition à l'antimicrobien (Acar et Rostel, 2001).

Les microorganismes possèdent des mécanismes évolués qui leur permettent d'échapper à l'action des antimicrobiens. Plusieurs mécanismes de résistance différents ont été décrits dans les bactéries (Opal *et al.*, 2000). Ces mécanismes sont l'inhibition enzymatique, l'imperméabilité de la membrane, les pompes d'efflux, l'altération du ribosome-cible, l'altération de précurseurs-cibles de la paroi cellulaire, l'altération des enzymes-cibles, la surproduction d'enzymes-cibles et des auxotrophes qui contournent les étapes inhibées (Allen

et al., 2006). Certains de ces mécanismes s'appliquent théoriquement aux biocides, mais ils sont moins bien étudiés. Lorsque des changements de susceptibilité aux antibiotiques et aux biocides se produisent simultanément, les déterminants de la résistance touchent surtout des gènes qui codent les pompes d'efflux polychimiothérapeutiques (Allen *et al.*, 2006). Ces gènes peuvent être nés dans le plasmide d'espèces Gram positives ou codés dans les chromosomes d'espèces Gram négatives (Bloomfield, 2002).

Dans les dernières années, l'incidence de résistance aux multi-drogues dans les bactéries pathogéniques et opportunistes a été de plus en plus documentée (Jones *et al.*, 2004). Ces bactéries résistantes aux multi-drogues ont aussi créé des problèmes cliniques immenses du cancer et des patients compromis immunisés (Ahmad et Aqil, 2007). Les bactéries résistantes aux multi-drogues les plus importantes sur l'échelle globale incluent des bactéries à Gram-positif (*Staphylococcus aureus* résistant au methicillin, enterococci resistant au vancomycin) et les bactéries à Gram-négatif (les membres d'enterobacteriaceae produisant plasmide - négocié prolongeant le spectre de β -lactamase (ESbL)) et d'autres tel que le *Pseudomonas aeruginosa*, la tuberculose de *Mycobacterium* (Medeiros, 1997; Sajduda *et al.*, 1998).

I.3. LES POLYPHENOLS

I.3.1 Définition

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires, d'un poids moléculaire élevé. Ils sont largement distribués dans le règne végétal (Haslam, 1993). La structure de base qui les caractérise est la présence d'un ou plusieurs noyaux aromatiques auquel sont directement liés un ou plusieurs groupements hydroxyle libres ou engagés dans une autre fonction (éther, ester) (Harborne, 1994).

Les polyphénols sont synthétisés à partir des métabolites primaires via voie: (1) la voie de l'acide shikimique qui conduit des carbohydrates aux acides aminés aromatiques

(phénylalanine, tyrosine) dont la désamination conduit aux acides cinnamiques et à leurs dérivés, (2) la voie de l'acétate qui synthétise des poly- β -cétolactones de longueur variable (Forkmann, 1993; Harborne, 1994).

Les polyphénols naturels regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres constituants. Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés, de plus de 3000 Dalton, comme les tannins.

Les acides phénoliques, les tannins et les flavonoïdes constituent les classes majeures des polyphénols.

I.3.2. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont largement distribués dans les fruits (Garcia-Viguera *et al.*, 1994), les tiges et les feuilles des légumes (Morton *et al.*, 2000). De plus, le thé et le vin rouge sont riches en ces composés (Harbowy et Balentine, 1997). Ils sont en principe solubles dans les solvants organiques polaires (Bruneton, 1993). Les acides phénoliques sont divisés en trois classes : les acides phénoliques simples, les acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque et les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique.

Les acides phénoliques simples sont rares à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles végétales (Bruneton, 1993). Les acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque sont des dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque comme l'acide vanillique (Haslam et Lilley, 1988). Les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique ont une distribution très large. L'acide caféique et l'acide férulique sont les composés majeurs (Bruneton, 1993).

I.3.3. Les tannins

Les tannins sont des molécules polyphénoliques de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da. Ils sont présents dans les feuilles, les fleurs et les graines des plantes (Watterson et Butler, 1983). Ils sont du grand intérêt pour la nutrition et la médecine à cause de leur capacité antioxydante puissante et leur effet protecteur possible sur la santé humaine (Santos-Buelga et Scalbert, 2000 ; Oszmianski *et al.*, 2007). La plupart des propriétés biologiques des tannins sont liées au pouvoir qu'ils ont de former des complexes avec les macromolécules, en particulier avec les protéines. Les liaisons non covalentes, hydrogènes et hydrophobes participent à la formation du complexe tannins-protéine (Hagerman et Butler, 1978 ; Mc Manus *et al.*, 1981) .

Les tannins sont subdivisés en deux classes différentes, largement distribuées chez les végétaux supérieurs, qui sont les tannins hydrolysables et les tannins condensés.

Les tannins hydrolysables sont des hétéropolymères dont l'hydrolyse chimique ou enzymatique libère un sucre, généralement le glucose, et un acide phénolique. L'acide phénolique libéré peut être l'acide gallique dans le cas des tannins galliques, l'acide hexahydroxydiphénique et ses dérivés comme l'acide éllagique dans le cas des tannins éllagique (Mehansho *et al.*, 1987). La pédunculagine est le tannin hydrolysable représentant de cette classe (Hagerman et butler, 1989).

Les tannins condensées ou proanthocyanidines (PAs) sont des oligomères ou polymères de flavonoïdes, constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone, le plus souvent entre C4 et C8 ou C4 et C6 (Mehansho *et al.*, 1987 ; Haslam et Lilley, 1988). La taille de molécule de PA peut être décrite par leur degré de polymérisation (DP) (Oszmianski *et al.*, 2007).

I.3.4. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent une large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Bruneton, 1999). Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux surtout dérivés du benzo- γ -pyrone (cycle A et C dans la **Figure 4**) (Hendrich, 2006). Les flavonoïdes sont des composés phénoliques, très abondants dans la nature, trouvés partout dans les plantes développées et ils ont été identifiés dans toutes les parties de la plante y compris les feuilles, les racines, les tiges, les fleurs, le pollen, le nectar, les graines et l'écorce (Cermak *et al.*, 1998 ; Tim Cushnie et Lamb, 2005). Ils diffèrent les uns des autres par le degré d'insaturation, le mode d'hydroxylation ou de méthylation et par le type du sucre attaché, ils peuvent être sous forme aglycone ou hétéroside (Markham, 1982). Les flavonoïdes sont présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles assurant ainsi la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement ultraviolet. Les formes hétérosides des flavonoïdes s'accumulent dans les vacuoles et dans les cellules épidermiques (Bruneton, 1993).

À cause de leur occurrence à beaucoup de plantes mangeables, les flavonoïdes constituent une composante importante dans la majorité des régimes alimentaires quotidiens (Hendrich, 2006). Les sources communes de flavonoïdes sont : les oignons, les pommes, les tomates, le vin rouge (quercétine, rutine), le pamplemousse, le thé noir (kaempferol), les graines de soja (genisteine, daidzeine), le persil, le céleri (apigénin) et le thé (catechins) (Hendrich, 2006). Il y'a des flavonoïdes consommés comme des composantes d'aliments, quelques autres sont extraits des plantes immangeables, et appliqués comme des compléments d'aliments, par exemple silibin, qui est extrait du chardon de lait (Fraschini, 2002).

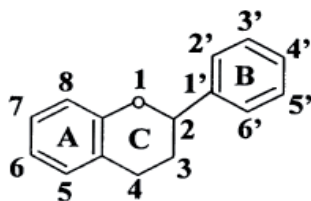


Figure 4: Structure générale des flavonoïdes (Tim Cushnie et Lamb, 2005)

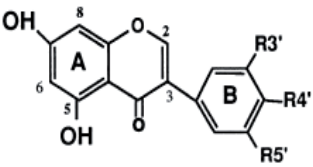
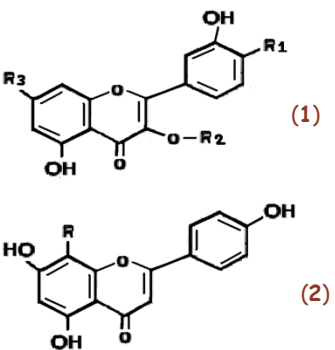
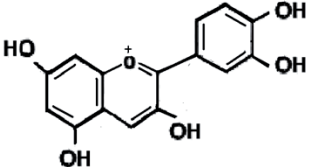
I.3.4.1. Structure chimique et classification

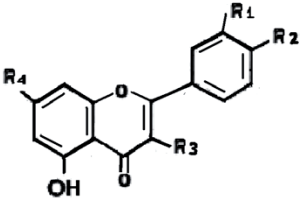
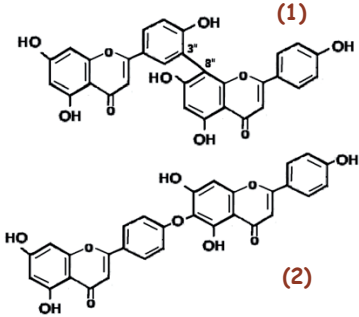
Presque 6500 différentes structures de flavonoïdes ont été décrites chez les plantes (Harborne *et al.*, 2000). À l'exception des chalcones, ces métabolites secondaires sont toujours tricycliques, leur squelette carboné C6-C3-C6 (**Tableau 2**) est caractérisé par la présence de deux cycles benzéniques A et B et d'un hétérocycle oxygéné (Hahlbrock, 1981 ; Markham, 1982). En tenant compte de la nature chimique de la molécule, et des positions de moitiés substituant des anneaux A, B et C, les flavonoïdes sont divisés en 14 différents groupes (Havsteen, 2002 ; Hendrich, 2006). Six des groupes sont particulièrement bien connus et caractérisés : les flavones, isoflavones, flavanones, flavonols, flavanols (catechins) et anthocyanidines (Figure 1) (Heim *et al.*, 2002; Hendrich, 2006).

Selon la position à laquelle l'anneau B est attaché au benzo- γ -pyrone le cœur de la molécule, on distingue les flavonoïdes (cycle B est attaché à la position 2 d'anneau C) et les isoflavonoïdes (cycle B est attaché à la position 3 d'anneau C) (Hendrich, 2006).

Tableau 2 : Structure des différentes classes de flavonoïdes (résumés à partir de Gamet-Payrastré *et al.*, 1999).

Classes	Structure chimique	Caractéristiques
Chalcones et Aurones	<p>(1)</p> <p>(2)</p>	<p>-Chalcones (1): présentent un chaînon tricarboné cétonique α-β-insaturé (Markham, 1982).</p> <p>-Aurones (2): l'hétérocycle comprend deux atomes de carbone. (Harborne, 1994)</p>
Flavanones et Flavanonols		<p>-Flavanones et Flavanonols : caractérisés par l'absence de la double liaison C2-C3 (Lee <i>et al.</i>, 1994).</p> <p>-Les Flavanonols diffèrent des flavanones par la présence de groupement hydroxyles en C3 (Pierpoint, 1986).</p>
Flavones et flavonols		<p>- Flavones et Flavonols : caractérisés par la présence de la double liaison C2-C3 (Formica et Regelson, 1995).</p> <p>- Flavonols : possèdent en plus un groupement hydroxyle en C3 (Formica et Regelson, 1995).</p>

<p>Isoflavonoïdes</p>		<p>- Isoflavonoïdes : caractérisés, par un enchaînement en C15, mais qui est ici réarrangé selon un motif 1,2-diphényl propanique (Bruneton, 1993).</p> <p>- Dérivés par cyclisation des chalcones dans lesquels le noyau B est lié au C3 du noyau C (Hahlbrock, 1981).</p>
<p>Hétérosides flavonoïdiques</p>		<p>-Hétérosides flavonoïdiques : divisés en flavonoïdes-O-glycosides et flavonoïdes-C-glycosides.</p> <p>-Flavonoïdes-O-glycosides (1) : un ou plusieurs groupements hydroxyles sont liés à un ou plusieurs sucres par une liaison acide labile. Le sucre est habituellement un glucose, un galactose ou un rhamnose.</p> <p>-Flavonoïdes-C-glycosides (2) : la liaison s'établit entre le C1 du sucre et le C6 ou C8 du flavonoïde.</p>
<p>Anthocyanidines</p>		<p>- Anthocyanidines : possèdent un hétérocycle de type benzopyroxonium à oxygène tétravalent. Ils sont responsables de la couleur rouge, bleu et pourpre des fruits.</p>

<p>Flavonoïdes sulfatés</p>	 <p style="text-align: center;">$R_1=R_2=R_3=R_4=OSO_3$</p>	<p>- Flavonoïdes sulfatés : flavonoïdes hydrosolubles, caractérisés par la présence de 1 à 4 résidus sulfates liés aux groupements hydroxyles du phénol ou du sucre (Varin <i>et al.</i>, 1987).</p>
<p>Biflavonoïdes</p>	 <p style="text-align: right;">(1)</p> <p style="text-align: right;">(2)</p>	<p>-Biflavonoïdes : résultent de la condensation de deux flavonoïdes par des liaisons de type carbone-carbone (1) ou de type éther (2). Ils peuvent être résulte ou non de même type (biflavone, biflavanone, flavone-flavanone).</p>

I.3.4.2. Propriétés physico-chimiques des flavonoides

Les flavonoides aglycones moins polaires comme les isoflavones, les flavonones et les flavones hautement méthoxylés et les flavonols sont plus solubles dans les solvants tels que l'éther et le chloroforme (Vistaropoulou et vajias, 1986). Les composés phénoliques possèdent un nombre insubstitué de groupements hydroxyles ou de sucres sont des composés polaires, généralement solubles dans les solvants polaires tels que l'éthanol, le méthanol, le butanol, l'acétone, le diméthylsulfoxyde, l'eau, etc. (Benkrief *et al.*, 1990). Les flavonols résistant au traitement à la chaleur et ne sont pas déglycosylés (Day et Williamson, 1999).

I.3.4.3. Biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont synthétisés dans les plantes au niveau des chloroplastes, ils ont une teneur maximale dans les organes jeunes (feuilles et boutons floraux) (Paris et Hurabille, 1981).

La formation des flavonoïdes résulte de la condensation, catalysée par une chalcone synthase, de trois molécules de malonyl CoA, provenant du métabolisme du glucose, avec un acide cinnamique lui-même formé par la voie de l'acide shikimique (Hahlbrock, 1981 ; Markham, 1982). Le produit immédiat de la réaction de condensation de la chaîne latérale de l'acide cinnamique ou de l'acide parahydroxycinnamique avec les trois unités d'acétate est une naringénine chalcone (Hahlbrock, 1981). Les deux grandes voies de biosynthèse aromatique sont donc mises en œuvre pour constituer chacune des parties du squelette C6-C3-C6. C'est à partir de l'acide cinnamique ou de l'acide parahydroxycinnamique provenant de la désamination de la phénylalanine ou de la tyrosine respectivement, que s'édifie cet enchaînement en C15. D'autres enzymes catalysent la modification des flavonoïdes après la formation du squelette C6-C3-C6, par hydroxylation, méthylation et glycosylation (Forkmann, 1993).

I.3.4.4. Activités biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont une classe de composés ubiquitaires dans les plantes vasculaires et représentent un des plus grands groupes de produits phénoliques naturels. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs, la protection des plantes contre les radiations UV de type B et leur défense contre les herbivores et les attaques microbiennes (Harborne *et al.*, 2000 ; Waridel, 2003).

De nombreux polyphénols ; les flavonoïdes et d'autres composés phénoliques sont des molécules complexes et ont des actions potentielles multiples, ils sont capables de se fixer sur

certaines protéines et enzymes et de modifier les équilibres enzymatiques (Halliwell, 2007). En règle générale, les composés phénoliques sont des inhibiteurs enzymatiques (Cermak *et al.*, 1998; Middleton *et al.*, 2000) en ont le pouvoir d'inhiber plusieurs enzymes tel que la télomérase, glutamate déhydrogénase, cyclooxygénase, lipoxygénase, xanthine oxydase, la matrice metalloprotéinases, cytochrome P450 et les activités d'enzyme sulphotransférase, en affectant des sentiers de transduction de signal et le fait d'interagir en avec sirtuins (Mandel *et al.*, 2006 ; Zini *et al.*, 2006).

De plus, les polyphénols sont capables d'inhiber l'histidine décarboxylase, la PKC, la PLA2, la myéloperoxydase, la NADPH oxydase (Middleton et Kandaswami, 1992). Alors que, certains isoflavones inhibent d'une manière non spécifique la catéchol-O-méthyltransférase, ce qui augmenterait la quantité des catécholamines et donc provoquerait une élévation de la résistance vasculaire (Bruneton, 1993).

Les flavonoïdes peuvent aussi interagir avec les systèmes de transport de médicaments cellulaires, rivaliser avec le glucose pour le transport transmembranaire, se mêler du règlement du cycle cellulaire, inhiber la glycation protéinique, moduler les activités de la paraoxonase, myéloperoxydase et la thyroïde peroxydase, augmenter la production d'oxyde nitrique endothélial et affecter la fonction de plaquette (Morris, 2006 ; Schroeter *et al.*, 2006).

I.3.5. Activité antioxydante des polyphénols

Il est connu que certaines propriétés pharmacologiques des polyphénols sont dues à leur activité antioxydante (Gryglewski *et al.*, 1987; De Whalley *et al.*, 1990; Morton *et al.*, 2000). De nombreux composés phénoliques réagissent avec les radicaux libres (Lonchampt *et al.*, 1989, Bagchi *et al.*, 1998), empêchant ainsi les dégradations liées à leur intense réactivité au niveau des phospholipides membranaires (Halliwell et Aruoma, 1993)

En plus de l'inhibition des oxydases, l'activité antioxydante des polyphénols est due à leur capacité de capter les radicaux libres et/ou de chélater les ions métalliques du fer et du cuivre (Kandaswami et Middleton, 1994, Rice-Evans, 1995 ; Halliwell, 2007). De plus, la régénération de l' α -tocophérol par réduction du radical α -tocophéryl peut contourner à leur activité antioxydante (Rice-Evans, 1995). Les flavan-3-ols peuvent régénérer l' α -tocophérol par le transfert d'un atome d'hydrogène au radical α -tocophéryle (Miura *et al.*, 1994).

Les flavonoïdes exercent des effets pharmacologiques multiples sur les cellules et les tissus des mammifères, leur principale activité est une propriété vitaminiq (Havsteen, 1983). Ils ont d'abord été décrits comme des substances protectrices de la paroi capillaire et de maintien de sa résistance (Formica et Regelson, 1995). D'autres activités biologiques ont été attribuées aux flavonoïdes, citons à titre d'exemple les activités anti-inflammatoires, anti-allergiques, antihypertensives (Middleton et Kandaswami, 1993; Rice-Evans, 2001), antivirales (Nijveldt *et al.*, 2001 ; Narayana *et al.*, 2001), antifongiques, antibactériennes (Tomas-Barberan *et al.*, 1988), anticancéreuses (Yang *et al.*, 2000) et anti-ulcéreuse (Di Carlo *et al.*, 1993). Ces activités sont attribuées en partie aux propriétés anti-oxydantes de ces composés naturels. Les flavonoïdes expriment ces propriétés par : (1) le piégeage direct des ROS, (2) la suppression de la formation des ROS par l'inhibition de quelques enzymes ou par chélation des ions métalliques impliqués dans la production des ROS via les réactions de Fenton et Haber Weiss, et (3) la protection des systèmes de défense antioxydants de l'organisme (Cotelle, 2001).

Comme les flavonoïdes, les acides phénoliques sont de puissants antioxydants, ils exercent leur effet par capture des ROS et des espèces réactives dérivés de l'azote (Morton *et al.*, 2000).

Le pouvoir des polyphénols, et particulièrement des flavonoïdes, d'inhiber la peroxydation des lipides est lié à leur structure moléculaire. La présence d'un groupement orthodihydroxyle sur le noyau 13, la double liaison en C2-C3 en conjugaison avec une fonction cétone en C4 et des groupements hydroxyles en C3 et C5 sont les caractéristiques structurales principales pour une activité antioxydante (Bors *et al.*, 1990; Rice-Evans, 1996). Par ailleurs, la glycosylation et la méthylation tendent à diminuer l'effet inhibiteur des polyphénols (Nakayama *et al.*, 1992). La glycosylation en C3 peut influencer la propriété des flavonoïdes de chélater les métaux (Jorgensen, 1998).

I.3.6. Activité antimicrobienne des polyphénols

Une des fonctions incontestées des flavonoïdes et des composés phénoliques, est leur rôle dans le fait de protéger les plantes contre l'invasion microbienne. Cela implique non seulement leur présence aux plantes comme des agents constitutives, mais aussi leur accumulation comme phytoalexines en réponse à l'attaque microbienne (Grayer et Harborne, 1994, Harborne, 1999b). À cause de leur capacité étendue d'inhiber la germination des spores pathogènes des plantes, ils ont été proposés aussi pour être utilisés contre les pathologies fongiques de l'homme. Il y a un grand intérêt dans l'utilisation des flavonoïdes des plantes pour le traitement des maladies humaines et surtout pour contrôler le virus d'immunodéficience qui est l'agent causatif de SIDA (Harborne et Williams, 2000).

Plusieurs recherches signalent la présence régulière d'activité antibactérienne chez les flavonoïdes. Ainsi, le retrochalcone licochalcone C (4,4'-dihydroxy-2'-methoxy-3'-prenyl) est actif contre *Staphylococcus aureus* avec une concentration inhibitrice minimale de croissance (CMI) de 6.25 µg / ml (Haraguchi *et al.*, 1998). Aussi, le constituant 5,7-dihydroxy-3,8-diméthoxy flavone a une CMI de 50 µg / ml contre *Staphylococcus epidermis* (Iniesta-Sanmartin *et al.*, 1990). De nouveau, la substance 5,7,2',6'-tetrahydroxy-6-prenyl-8-

lavandulyl-4'-methoxy-flavanone inhibe complètement la croissance de *S. aureus* à des concentrations entre 1.56 et 6.25 µg / ml (Inuma *et al.*, 1994). Le susdit flavanone est particulièrement actif contre les souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques et pourrait avoir la valeur de traiter des patients, qui prend involontairement cette infection pendant qu'à l'hôpital (Harborne et Williams, 2000).

La majorité de flavonoides reconnus comme des agents constitutifs antifongiques aux plantes sont les isoflavonoides, flavanes ou flavanones. La présence d'un groupe phénolique dans un flavonoïde naturel pourrait être s'attendre fournisse une activité antimicrobienne et l'adjonction de plusieurs groupes phénoliques améliore cette activité. La mise à l'essai de l'effet de différents flavonoides sur la croissance mycélienne dans le champignon *Verticillium alba-atrum*, un pathogène de plusieurs maladies sérieuses, a montré exactement que l'opposé était vrai. Les composés les plus inhibitrices étaient les structures parentales, flavone et flavanone, qui étaient actifs à 1 et 5 ppm, respectivement (Harborne et Williams, 2000). L'hydroxy flavonoïde normal inhibe la croissance seulement dans les concentrations au-dessus de 5 ppm et certains étaient inefficaces même à 200 ppm. En fait, le nombre croissant de substituant hydroxyl, méthoxyl ou de glycosyl s'est ensuivi dans la perte régulière d'activité antifongique (Picman, 1995).

Les expériences avec d'autres compositions de champignons suggèrent que *V. albo-atrum* peut être exceptionnel en sa réponse à la substitution hydroxy/méthoxy dans la série de flavonoïde et il y a beaucoup d'exemples de flavonoides antifongiques avec un tel substituant (Harborne et Williams, 2000). Par exemple, deux chalcones présent dans les feuilles de *Myrica cerrata* (2',4'-dihydroxy-6'-méthoxy-3',5'-diméthyl-chalcone) et le (2',4'-dihydroxy-6'-méthoxy-5'-méthylchalcone) inhibent la croissance de *Cladosporium cucumerinum* (Gafner *et al.*, 1996). De nouveau, deux nouveaux flavanes caractérisés du carex, *Mariscus*

psilostachys (2S-4'-hydroxy-5, 7, 3'-trimethoxy-, 4'-dihydroxy-7, 3'-dimethoxy flavan), sont aussi inhibiteurs sur *C. cucumerinum* (Garo *et al.*, 1996).

Pourtant, la propriété des flavonoides qui a été récemment explorée est l'activité antivirale, notamment contre le virus d'immunodéficience humaine (VIH), l'agent causatif de SIDA. Certains flavonoides ont l'air d'avoir l'activité inhibitrice directe sur le virus (Harborne et Williams, 2000). C'est apparemment vrai pour baicaline (5,6,7-trihydroxy-flavone 7-glucuronide) à partir *Scutellaria baicalensis* (Li *et al.*, 1997). D'autres flavonoides sont inhibiteurs aux enzymes exigées pour la réplication virale. Deux biflavones, robusta flavone et hinokiflavone, sont actifs contre la transcriptase inverse du VIH-1 avec les valeurs d'IC50 de 65 μM (Lin *et al.*, 1997b). Aussi, la quercétine 3-(2''-alloylarabinopyranoside) isolée d'*Acer okamotoanum*, est active contre VIH-1 intégrase avec une valeur d'IC50 de 18.1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (Kim *et al.*, 1998).

En fait, la quercétine appliquée à une concentration de 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ a provoqué l'inhibition de 70 % de développement de lésion locale du virus sur la plante testée *Chenopodium quinoa* (Harborne et Williams, 2000). La quercétine et autres flavonoides ont l'air de se mêler d'un premier événement dans le cycle de vie virulent (Malhotra *et al.*, 1996).

I.4. LES HUILES ESSENTIELLES

I.4.1. Définition

Les huiles volatiles, ou essences aromatiques végétales nommées huiles essentielles car elles renferment la "Quinta essentia", la fragrance de la plante (Lamarti *et al.*, 1994), sont des substances odorantes, volatiles, huileuses donc de nature hydrophobe, totalement solubles dans les alcools, l'éther et dans les huiles végétales et minérales. Lorsqu'elles sont pures et naturelles, elles ne contiennent aucun corps gras : elles sont uniquement constituées de molécules aromatiques volatiles (Coraline *et al.*, 2006).

Les plantes aromatiques synthétisent naturellement les huiles sous forme de métabolites secondaires par des cellules sécrétrices qui contiennent de la chlorophylle, elles sont ensuite transportées lors de la croissance de la plante dans d'autres parties ; dans le bois, les fruits, les écorces, les graines et les racines et sont conservées dans les cellules sécrétrices, les cavités, les canaux, les cellules épidermiques ou dans les trichomes glandulaires (Bakkali *et al.*, 2008). Cependant la quantité d'huile produite est très variable selon les espèces et elles sont souvent colorées (Coraline *et al.*, 2006).

Actuellement, environ 3000 huiles essentielles sont connues, dont 300 sont commercialement importantes, surtout pour les produits pharmaceutiques, agronomiques, alimentaires, hygiéniques, cosmétiques et les industries de parfum (Prabuseenivasan *et al.*, 2006).

I.4.2. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des composés naturels très complexes qui peuvent contenir environ 20-60 composantes à de tout à fait différentes concentrations. Ils sont caractérisés par deux ou trois composantes importantes à d'assez hautes concentrations (20-70 %) comparés à d'autres composantes présentées en quantités de trace (Croteau *et al.*, 2000; Betts, 2001; Bowles, 2003; Pichersky *et al.*, 2006). Les constituants des huiles essentielles appartiennent,

de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (terpènes) d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane -beaucoup moins fréquents d'autre part, tous caractérisés par un poids moléculaire bas (Bakkali *et al.*, 2008).

I.4.2.1. Les terpènes

Les terpènes (= terpénoïdes) sont des constituants habituels des cellules végétales, impliqués ou non dans des fonctions métaboliques essentielles, on les trouve fréquemment dans les huiles volatiles des plantes (Lamarti *et al.*, 1994).

Les terpènes présentent structurellement et fonctionnellement différentes classes. Ils sont formés des combinaisons de plusieurs unités de 5 carbones à la base (C5) appelé isoprène. Dans le cas des huiles essentielles, seuls seront rencontrés les terpènes les plus volatils, c'est à dire, ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée : monoterpènes (C10) et sesquiterpènes (C15), mais existent aussi les hemiterpènes (C5), diterpènes (C20), triterpènes (C30) et tetraterpènes (C40) (Bruneton, 1999). On appelle un terpène contenant de l'oxygène un terpénoïde.

La biosynthèse des terpènes consiste la synthèse du précurseur de l'isopentenyl diphosphate (IPP), l'adjonction répétitive d'IPPs pour former le précurseur prenyldiphosphate des différentes classes de terpènes, la modification allylique de prenyldiphosphate par des synthétases spécifique de terpènes pour former la squelette terpène et finalement, la modification enzymatique secondaire (réaction redox) de la squelette pour attribuer les propriétés fonctionnelles aux différents terpènes (Bakkali *et al.*, 2008).

A. Les monoterpènes : Ils sont formés par le couplage de deux unités isopréniques (C10) (**Figure 5**). Ils sont les molécules les plus représentatives, constituant 90 % des huiles essentielles et permettent une grande variété de structures.

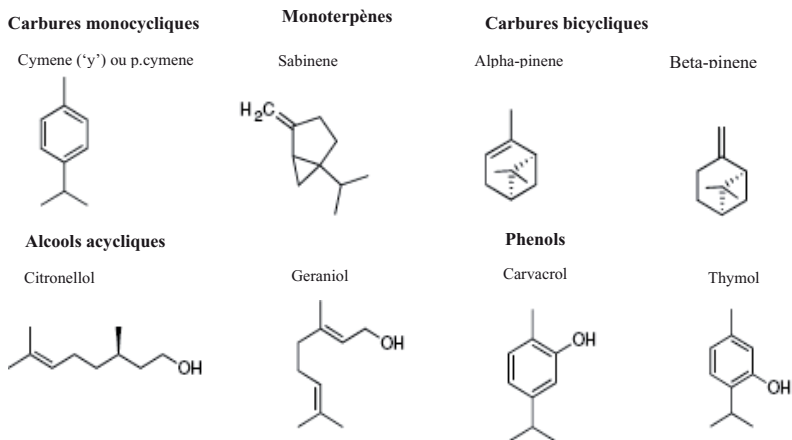


Figure 5: Structure chimique de certains monoterpènes.

B. Les sesquiterpènes: Ils sont formés par l'assemblage de trois unités isopréniques (C15). L'extension de la chaîne augmente le nombre de cyclisations qui permet une grande variété de structures (**Figure 6**). La structure et la fonction des sesquiterpènes sont semblables à ceux des monoterpènes.

Les exemples de plantes contenant ces composants sont : Angélica, bergamote, cumin des prés, céleri, citronella, coriandre, eucalyptus, géranium, genièvre, lavandin, lavander, citron, lemongrass, mandarine, menthe, orange, pastille de menthe, petit grain, pin, Rosemary, sage, thym (Bakkali *et al.*, 2008).

Sesquiterpènes

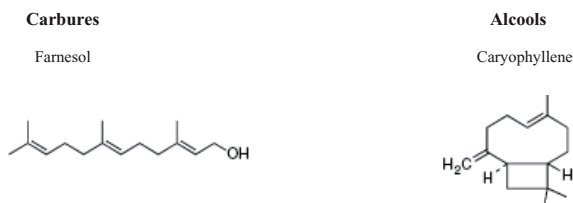


Figure 6: Structure chimique de certains sesquiterpènes.

I.4.2.2. Les composés aromatiques

Les composés aromatiques (**Figure 7**) sont des dérivés de phenylpropane (C6-C3), se produisent beaucoup moins fréquents que les terpènes. Très fréquemment, il s'agit d'allyle de propénylphénols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles essentielles, telle celle du girofle (eugénol) (Ghestem *et al.*, 2001). On peut également rencontrer dans les huiles essentielles des composés en C6-C1, plus rares, tel le safrole (Bruneton, 1987 ; Belaiche, 1979). Les sentiers biosynthétiques concernant les terpènes et les dérivés phenylpropaniques sont généralement séparés dans les plantes, mais peuvent coexister dans certaines, avec un sentier important commandant (voir, l'huile de cinnamom avec cinnamaldehyde comme un composant majeur et eugenol comme un composant mineur, aussi l'huile de clou de girofle, le fenouil, etc.).

Les principales sources végétales de ces composés sont l'anis, la cannelle, le clou de girofle, le fenouil, la muscade, le persil, sassafras, l'anis d'étoile, l'estragon et certaines familles botaniques (Apiaceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Rutaceae).

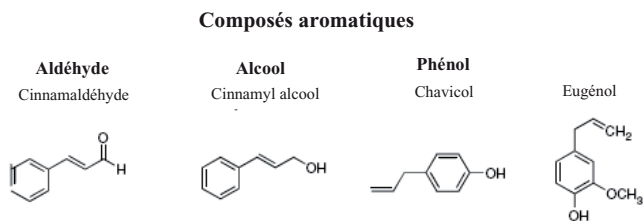


Figure 7 : Structure chimique de certains composés aromatiques.

I.4.3. Activité biologique et utilisations des huiles essentielles

Dans la nature, les huiles essentielles jouent un rôle important dans la protection des plantes comme des agents antibactériens, antivirales, antifongiques, et comme des insecticides et aussi les protègent contre les herbivores en réduisant leur appétit pour de telles plantes. Ils

peuvent aussi attirer certains insectes pour préférer la dispersion de pollens et de graines, ou repoussez d'autres indésirables.

En raison de leurs propriétés antiseptiques (bactéricide, virucide et fongicide), médicinales et leur fragrance, ils sont utilisés dans l'emballage, la préservation d'aliments et comme antimicrobiens, analgésique, sédatif, anti-inflammatoire, spasmolytique et de remèdes localement anesthésiques (Bouhdid *et al.*, 2006).

Les huiles essentielles ou certaines de leurs composantes sont utilisées dans les parfums et les produits cosmétiques, dans les produits hygiéniques, dans la dentisterie, dans l'agriculture, comme les sauveurs d'aliments et les additifs et comme des remèdes naturels. Par exemple, d-limonène, geranyl l'acétate ou d-carvone sont employés dans les parfums, les crèmes, les savons, comme des additifs de goût pour les aliments, comme des fragrances nettoyant des produits pour la maison et comme des solvants industriels. De plus, les huiles essentielles sont utilisées dans les massages comme des mixtures avec l'huile végétale ou dans les bains, mais le plus souvent dans l'aromathérapie. Quelques huiles essentielles ont l'air d'exposer des propriétés médicinales particulières qui ont été prétendues guérir un dysfonctionnement d'organe ou un désordre systémique (Silva *et al.*, 2003; Hajhashemi *et al.*, 2003; Perry *et al.*, 2003).

I.4.4. Activité antimicrobienne des huiles essentielles

Empiriquement reconnues depuis des siècles, la confirmation scientifique de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est récente. Elle ne date que du début du siècle dernier avec les travaux du Dr GATTEFOSSE, le père de l'aromathérapie en France. Depuis ce temps, l'utilisation des huiles essentielles s'est développée jusqu'à devenir depuis plus d'une vingtaine d'années, une sérieuse alternative à la médecine des antibiotiques dans les pathologies infectieuses (Pibiri, 2006).

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles se trouve à la base des médecines dites alternatives, de nombreux procédés utilisés dans la conservation des produits alimentaires crus ou cuits, de substances actives exploitées dans les produits pharmaceutiques. Cette activité a été utilisée dernièrement pour la conservation du patrimoine bibliographique des musées, et elle est naissante pour traiter la qualité de l'air dans les constructions urbaines (Seigniez et Pibiri, 2001).

Plus spécifiquement, plusieurs études ont montré l'apparition de fuites d'ions potassium K^+ de cellules microbiennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) en contact avec du Tea-tree (*Melaleuca alternifolia*). Il s'agit de la toute première indication de dégâts irréversibles au niveau de la membrane. Des composés isolés tels le thymol et le carvacrol rendent la membrane des bactéries perméable, prémice de leur mort (Helander et Alakomi, 1998; Lambert *et al.*, 2001). La faculté de perturber la perméabilité de la cellule membranaire, accompagnée de la perte de l'osmose chimique sont bien la preuve d'une activité létale de certaines huiles essentielles (Cox *et al.*, 2000). Ainsi, des clichés de microscopie électronique illustrent ces études en montrant les dommages de cellules de quelques microorganismes en citant : *Staphylococcus aureus* en contact avec des huiles essentielles riches en monoterpénols et en phénols (Franchomme et Pénéol, 1990), des cellules d'*Escherichia coli* visiblement très endommagées par l'Origan compact qui collapent après 1 minute de contact (Burt et Reinders, 2003) et la lyse de cellules fongiques provoquée par la Citronnelle de Java, *Cymbopogon nardus*.

A la manière des agents chimiques, on distingue deux sortes d'effets des huiles essentielles sur les microorganismes une activité létale (bactéricidie) et une inhibition de la croissance (bactériostase). L'activité des huiles essentielles est souvent assimilée à une activité bactériostatique. Cependant les études suivantes ont montré que certains constituants

chimiques des huiles essentielles ont des propriétés bactéricides (Kunle et Okogun, 2003), (Carson et Riley, 1995), (Lambert *et al.*, 2001), (Walsh *et al.*, 2003) et fongicides (Hammer *et al.*, 2003).

La sensibilité des microorganismes peut varier selon le germe testé car une huile essentielle peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, biostatique vis-à-vis d'autres ou n'avoir aucun effet (Hermal, 1993). C'est pour cela qu'il est important de mentionner la dénomination complète ainsi que le Gram des microorganismes ainsi que l'espèce botanique et le chémotype de l'huile essentielle.

Les bactéries à Gram positif seraient plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries à Gram- (Zaika, 1988). Cette affirmation n'a cependant pas été confirmée par d'autres travaux. La susceptibilité des bactéries est en effet indépendante du Gram (Dorman et Deans, 2000), ou dépend des huiles essentielles utilisées (Deans et Ritchie, 1987). Il semblerait tout de même qu'en règle générale, les bactéries à Gram négatif soient plus résistantes aux huiles essentielles. Ces résultats sont confirmés par de nombreuses expériences (Cosentino *et al.*, 1999).

I.4.5. Activité liée à la composition chimique

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et les possibles effets synergiques entre les composants. Ainsi la nature des structures chimiques qui la constituent, mais aussi leurs proportions jouent un rôle déterminant (Pibiri, 2006).

Les molécules réputées actives sont des terpénoïdes, car les hydrocarbures saturés et les acétates ioniques sont inactifs, par la nature même de leur faible capacité de liaisons hydrogène et de leur faible solubilité (Griffin *et al.*, 1999). L'effet des terpénoïdes sur des

membranes bactériennes isolées suggère que leur activité est fonction des propriétés lipophiles des constituants terpéniques, la nature des groupes fonctionnels, leur solubilité en phase aqueuse et la stéréochimie de la molécule (Dorman et Deans, 2000).

Les composés chimiques de plus grande efficacité et à plus large spectre sont des phénols (thymol, carvacrol et eugénol), des alcools (α -terpineol, terpinen-4-ol, linalol), des aldéhydes, des cétones et plus rarement des terpènes (Cosentino *et al.*, 1999). Les principaux terpénoïdes actifs sont décrits cidessous.

Les alcools : sont généralement plus connus pour leur activité létale que bactériostatique sur les cellules végétatives. Ils agissent en dénaturant les protéines, comme solvants ou comme agents de déshydratation (Dorman et Deans, 2000).

Les aldéhydes : sont de puissants agents antimicrobiens ou anti-infectieux. Un groupe aldéhydique conjugué à une double liaison est fortement électronégatif. Les composés électronégatifs peuvent induire des réactions de transfert d'électrons et réagir avec des composés nitrés vitaux pour la bactérie : protéines et acides nucléiques (Franchomme et Péroël, 1990).

Les phénols : sont responsables de dégâts irréversibles au niveau de la membrane. Le thymol et l'eugénol sont responsables de l'activité fongicide (Bennis *et al.*, 2004) et bactéricide des huiles essentielles qui en contiennent (Cox *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2003). La molécule de thymol a un effet inhibiteur et létal sur diverses souches, dont *Echericha coli* et *Staphylococcus aureus*, sur lesquelles elle provoque des fuites d'ions potassium K⁺. En revanche elle n'est pas active sur *Pseudomonas aeruginosa* (Walsh *et al.*, 2003). Plus les teneurs phénols sont élevées, plus les huiles essentielles sont efficaces (Cosentino *et al.*, 1999). Cependant les phénols ne sont pas les seuls responsables de l'intégralité de l'activité ; la totalité de la composition chimique doit être prise en compte (Cosentino *et al.*, 1999).

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des composés chimiques isolés est qualitativement identique. Cependant il existe des différences quantitatives. Certaines études ont montré que l'activité (antimicrobienne, antivirale, insecticide, larvicide et ovicide) des huiles essentielles est supérieure à celle de ses composés majoritaires testés séparément (Lahlou, 2004). Les composés purs, le thymol et le carvacrol ont un net effet synergique, ce qui expliquerait les différentes activités des chémotypes de Thymus. L'aldéhyde cinnamique est généralement indifférent aux deux phénols (Didry *et al.*, 1993). Cependant une étude (Lambert *et al.*, 2001) ne corrobore pas les effets de synergie mentionnés. Une combinaison de concentrations comparables en thymol et en carvacrol reproduit bien l'inhibition de l'huile essentielle mais les autres composés minoritaires ont pour effet de diminuer l'effet des principaux composés actifs phénolés.

I.5. LES PLANTES MEDICINALES

Depuis longtemps, les plantes médicinales avaient un grand intérêt dans la médecine traditionnelle, elles présentent une source naturelle efficace et moins coûteuse de la thérapie soit sous forme de préparations traditionnelles (jus, crème, poudre...), ou sous forme de principes actifs purs. Les plantes médicinales sont très abondantes dans la nature, elles sont caractérisées par la diminution des effets indésirables par apport aux médicaments, par une grande efficacité thérapeutique et par la présence de compositions inoffensives tel que la cellulose. Parmi les plantes utilisées dans la médecine traditionnelle en Algérie, on cite : le tamier qui est utilisé dans le traitement du rhumatisme et la carduncelle bleue qui contribue à guérir les brûlures.

I.5.1. *Tamus communis L.*

Le tamier commun, ou herbe aux femmes battues, est une plante herbacée vivace dioïque sauvage, commune en Europe, en Asie et dans le Nord de l'Afrique. Il est appelé scientifiquement *Tamus communis L.* de la famille des Dioscoréacée, prend différents noms communs tel que El-Karma Saouda, herbe aux femmes battues, raisin du diable, black bryony, bryony, blackeye, albarri, brionia negra, nueza negra, lady's seal et siyah akasma.

I.5.1.1. Description

Tamus communis L. (**Figure 8**) appartient à une famille de jumelage et des plantes grimpances qui ressortent généralement de gros tubercules, or sa tige grêle, volubile, pouvant atteindre 3 m de haut. Ses feuilles, alternes, pétiolées, luisantes, sont en forme de coeur pointu, généralement lisses et brillantes comme si elles avaient été vernies, rappellent quelque peu celles du Liseron blanc (*Calystegia sepium L. Br.*) (Boullard, 2001).

Le tamier commun est caractérisé par une grosse racine charnue, noir à l'extérieur, tubérisée, qui émet chaque année de nouveaux bourgeons, c'est comme celle de l'igname, épaisse et tubéreuse et riche en amidon, mais trop âcre d'être utilisés comme denrées alimentaires d'une manière quelconque.

Les fleurs verdâtres du tamier sont petites et réunies en grappes. Les sexes sont séparés (plante dioïque), on distinguera (Boullard, 2001): (1) des pieds males aux fleurs en grappes lâches, chacune riche de ses 6 étamines ; (2) des pieds femelles, aux fleurs pourvues de 3 carpelles, à l'origine d'une baie subsphérique. Les fruits sont de petites baies rouges brillantes à maturité, juteuses et de 12 mm de diamètre, à peine aussi gros qu'une cerise anglaise.



Figure 8 : Prise de vue du *Tamus communis* L et leurs parties.

I.5.1.2. Distribution géographique

Le tamier commun vit dans différents endroits ou se croit sous forme de rangés d'arbustes. Il se trouve particulièrement dans les forêts montagneuses d'altitude 1600m. Seulement quatre espèces de la famille Dioscoreaceae sont natales en Europe : *Dioscorea balcanica* Kosanin,

Borderea pyrenaica Miegville, *Borderea chouardii* (Gausen) Heslot et *Tamus communis* L.

Les espèces de *Dioscorea* et *Borderea* sont endémiques dans la Péninsule Balkanique et les Pyrénées, alors que *T. communis* affiche une plus large distribution dans la Grande-Bretagne, l'Europe Sud, Centrale sud et Ouest (Tutin *et al.*, 1972). Comme on peut trouver le *Tamus communis* L. dans l'Asie (Iran) et dans le Sud Ouest d'Afrique (Tutin *et al.*, 1980), concernant le Maroc et l'Algérie il se trouve dans le Tell et les hautes buttes (Maire, 1959).

I.5.1.3. Action et utilisations médicinales

Tamus communis L. (bryony noir) est une plante avec de grands tubercules qui provoquent l'irritation quand frottés sur la peau (Schmidt et Moul, 1983). Comme un irritant externe, Black Bryony a toutefois été utilisée avec profit, et il a été autrefois très employé.

Les enquêtes phytochimiques précédentes ont révélé la présence de spirostane et de furostane glycosides (Aquino *et al.*, 1991), stérols (Capasso *et al.*, 1983), l'histamine (Schmidt et Moul, 1983) et hydroxy/alkoxy phenanthrenes et dihydrophenanthrenes (Reisch *et al.*, 1969, 1972, 1973; Aquino *et al.*, 1985a, b), avec ces principes actifs surtout l'histamine et des saponosides dérivés de la diosgénine, cette souche servit encore, jadis, comme purgatif et comme diurétique (Kovacs *et al.*, 2007). On continue à lui reconnaître le statut d'antinévralgique (en usage externe, notamment pour soulager les patients souffrant de lumbago ou de rhumatismes) et on attribue à son suc des propriétés rubéifiantes renforçant l'activité précédente.

De plus, de différentes parties de la plante ont été appliquées dans la médecine traditionnelle pour le traitement de polypes et de tumeurs (Hartwell, 1969); quant aux jeunes pousses, elles contribueraient à guérir l'hypertrophie de la rate liée aux accès de fièvres intermittentes (Boullard, 2001).

Tant les rhizomes que les baies ont une réputation dans la médecine de gens comme rubefaciants efficaces ils ont donc traditionnellement été utilisés dans plusieurs pays pour le traitement de rhumatisme, arthrose, lumbago et dermatoses (Duke, 2002).

Les applications de pulpe de rhizome râpé jouissaient de la faculté de faire disparaître rapidement les hématomes. La racine fraîche grattée à une pâte et appliquées sous la forme d'un cataplasme, a été constatée comme un stimulant de plâtre, la goutte, les rhumatismes et la paralysie de fonctionnement, dans de nombreux cas (Boullard, 2001).

Le jus de la racine fraîche, mélangée avec un peu de vin blanc, a été utilisé comme un remède pour le gravier, est un puissant diurétique, mais il n'est pas donné maintenant en interne, et n'est pas inclus dans la Pharmacopée britannique. Aussi bien, le jus de la racine exprimé, avec le miel, a également été utilisé comme voie de recours pour les plaintes asthmatiques, mais d'autres voies de recours qui sont plus sûres doit être préféré. Pour les bobos, les vieux auteurs recommandent qu'il soit effectué sur un onguent avec de la graisse de porc ou de cire, ou autre onguent. " (Kovacs *et al.*, 2007).

I.5.2. *Carthamus caeruleus L.*

Le genre *Carthamus* de la famille des Asteraceae, comprend 14 espèces d'annuelles ou de vivaces herbacées, dont la Carduncelle bleue ou le kendar du nom scientifique *Carthamus caeruleus L.* ou *Carduncellus caeruleus L.* appelé aussi *Onoborma caerulea* et *Carthamus tingitanus*.

I.5.2.1. Description

La carduncelle bleue est une herbe annuelle ou bisannuelle à tige ascendante simple ou très peu rameuse, glabre, dressée et velue (haute de 0.2 à 0.6 m) (Quezel et Santa, 1963; Mioulane, 2004), ses feuilles glabres ou pubescentes, fortement nerviées, à contour ovale ou lancéolé ; les inférieurs pétiolés, dentées ou lyrées – pinnatifides, les supérieurs sessiles-amplexicaules ou dentées-épineuses (Mioulane, 2004). Les fleurs sont bleues, en capitules

terminaux solitaires (3 cm de large sur 3 – 4 cm de long), ont une corolle tubuleuse que prolongent 5 dents à valeur de courts lobes sommitaux, en outre les fruits du *Carthamus caeruleus* L. ce sont des akènes nettement plus courts que l'aigrette (environ 2 fois, 1 cm de long) (Boullard, 2001 ; Quezel et Santa, 1963).

I.5.2.2. Distribution géographique

C'est une espèce peu commune qu'on peut rencontrer dans les terrains maigres de Provence et de Corse. Elle préfère les lieux secs et ensoleillés du Bassin méditerranéen, elle est originaire du Sud - Ouest de l'Asie (Mioulane, 2004), d'Orient, mais répandues depuis dans le reste de l'Asie, en Afrique du Nord, en Australie même et dans les deux Amériques, ainsi qu'en Europe (Boullard, 2001).

I.5.2.3. Action et utilisations médicinales

Les racines du *Carthamus caeruleus* L. sont utilisées en Algérie, comme un cicatrisant contribue à guérir les brûlures, soit sous forme de poudre ou une crème préparée dans le lait.



Figure 9 : Prise de vue du *Carthamus caeruleus* L. et leurs fleurs.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. MATERIEL

II.1.1. Matériel biologique

Les racines des deux plantes (*Tamus communis L.* et *Carthamus caeruleus L.*), ont été collectées à partir de BouAndas la Willaya de Sétif.

Les souches bactériennes testées : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 , *Staphylococcus aureus* ATCC 2592 3, *Bacillus sp.*, *Klebsiella pneumoniae* , *Salmonella typhi*, *Enterobacter agglomerans* , *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*.

II.1.2. Produits

Le 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), β -carotène, Acide linoléique, Mueller Hinton Agar (Fluka). Tripyridyl-Triazine (TPTZ), gomme arabique, Bleu de Coomassie Brillant (CBB) G250, acrylamide, N, N méthylène bis-acrylamide, N,N,N',N'-Tetramethyl ethylene diamine (TEMED), bleu brillant R250, Tween 40, Sodium dodecyl sulphate (SDS), persulfate d'ammonium, glycérol, β -mercaptoéthanol, glycine, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, K₃Fe (CN)₆, FeCl₃, AlCl₃, Tris-HCl, Diméthyle sulphoxide DMSO (Sigma, Aldrich ou Fluka).

Acide gallique, quercétine, rutine, acide caféique, catéchine, acide tannique, diosmine, BHT (butylated hydroxytoluene), albumine bovine (BSA), acide ascorbique, méthanol, éthanol, hexane, acétate d'éthyle chloroforme et l'acide phosphorique (85%).

Les antibiotiques : Polymyxine (PB), Néomycine (Néo), Nibiol (Nib), Doxycycline (Dot), Cloramphénicol (Cmp), Gentamicine (Gen), Erythromycine (E), Amoxicilline + Acide clavulanique (AMC), Penicilline (Pen), Cefazoline (CZ), Amoxicilline (AMX), Lincomycine (Lin), Sulfamides Forts (Suf), Cefotaxime (CTX), (Bio-Rad).

II.1.3. Appareillage

Centrifugeuse 3K30 (Sigma), évaporateur (Germany, bUchi461), lyophilisateur (Phywe Chvisa), spectrophotomètre VIS (Spectronic R 20 Genesyst TM) et un appareil d'électrophorèse Pharmacia –LKB.

II.2. Techniques

II.2.1. Techniques d'extraction

Après l'identification des deux plantes (professeur), leurs racines sont nettoyées des impuretés puis ils sont coupés en petits morceaux et mis à sécher dans une étuve à 37°C pour quelques jours. Après le séchage les racines sont broyées par un mortier (Hawen) et estoquées dans des flacons bien fermé à 4 °C avons l'utilisation.

II.2.1.1. Extraction des flavonoïdes

La préparation des extraits à partir des racines de *Tamus communis L.* et *Carthamus caeruleus L.* a été effectuée selon la méthode de Markham (1982) qu'est basée sur le degré de solubilité des flavonoïdes dans les solvants organiques. Pour obtenir l'extrait brut les broyats des racines ont été soumis à une extraction par un mélange hydroalcoolique méthanol / eau. Ce dernier a subi un fractionnement par une série d'extractions avec des solvants à polarité croissante (Hexane → Chloroforme → Acétate d'éthyle) (**Figure 10**).

L'extraction des flavonoïdes de nos plantes est effectuée à partir de la matière sèche broyée (100 g) par le méthanol (85%) (1L: 85% méthanol et 15% eau distillée:v/v). Le mélange subit une agitation pendant une nuit à 4°C puis on le laisse quelques temps pour sédimenter, on obtient un culot et un surnageant, ce dernier est filtré à travers la laine de verre. Le culot subit une deuxième extraction (50% méthanol, 50% eau:v/v). Les deux filtrats sont combinés, filtrés sur du papier filtre puis soumis à une évaporation à basse pression à 40°C. 50ml de la phase aqueuse subit une lyophilisation puis conservé à -20°C, le reste sera délipidé par de

l'hexane jusqu'au l'absence total de la couleur. On récupère une phase organique (rejetée) et une autre aqueuse, cette dernière est décantée par le chloroforme en donnant une fraction organique (extrait du chloroforme) et une fraction aqueuse. La fraction aqueuse subit une dernière extraction par l'acétate d'éthyle pour obtenir une phase organique qui représente l'extrait d'acétate d'éthyle et la phase aqueuse finale (Raffinat).

Au cours des extractions par les solvants organiques, la décantation est répétée (v/v) jusqu'au l'absence total de la couleur. Les différents extraits doivent être lyophilisés et conservés à -20°C avant l'utilisation.

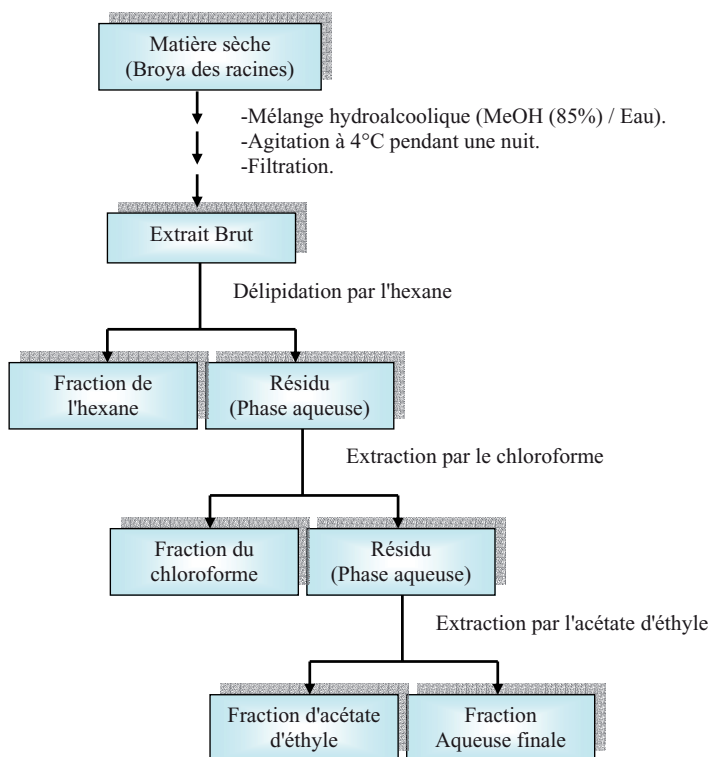


Figure 10: Les étapes d'extraction des flavonoides par les solvants organiques

II.2.1.2. Extraction des protéines

L'extraction des protéines des deux plantes est réalisée selon la méthode de (Mahmood *et al.*2003) et (Khan *et al.*2003) avec quelques modifications, par l'ajout de 90ml eau distillée à 10g du broya des racines de la plante et on agite le mélange jusqu'au le changement de sa couleur. Après, on centrifuge le mélange par une vitesse de 800G pendant 30min et on filtre le surnageant par laine de verre. Le surnageant subit une deuxième centrifugation (3000G, 30min) puis il est filtré par un papier filtre (Whatman filtre) et le filtrat doit être dialysé contre le tampon ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 25mM, pH 7.4). Enfin l'extrait protéique est conservé à -20°C avant l'utilisation.

II.2.1.3. Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles de nos plantes sont extraites on utilisant un système d'hydrodistillation. Alors, 100g de broya des racines sont soumis à une ébullition dans un litre d'eau distillée pour 4-5 h avec un débit d'hydrodistillation ne dépasse pas 2-4 ml/min (Wagner *et al.*,1983; Bruneton, 1999).

La récupération des huiles essentielles à partir de la phase aqueuse se fait par le di-éthyle éther. Après la décantation, la fraction organique est traitée par le sulfate de sodium déshydraté pour l'élimination totale d'eau puis il est filtré sous vide. La fraction organique est évaporée pour l'élimination du di-éthyle éther, les huiles récupérées sont conservées à l'abri de la lumière et la chaleur.

II.2.2. Etude quantitative

II.2.2.1. Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols totaux est effectué selon la méthode du bleu de Prusse (Price et Bulter, 1977), modifiée par Graham (1992) pour donner une meilleure stabilité de la couleur.

Afin d'estimer la quantité des polyphénols totaux dans les extraits de nos plantes par cette méthode, une prise d'essai de 0.1 ml des extraits dissouts dans le méthanol est mélangée avec 3 ml d'eau distillée. Quinze minutes après l'addition successive de 1 ml de $K_3Fe(CN)_6$ (0.016 M) et de 1 ml de $FeCl_3$ (0.02 M dans HCl 0.1 N), 5 ml de stabilisant (30 ml gomme arabique (1%), 30 ml acide phosphorique (85%) et 90 ml eau distillée) sont ajoutés et la densité optique est lue à 700 nm.

La concentration des polyphénols totaux est déduite à partir d'une gamme étalon établie avec l'acide gallique comme standard (25-200 $\mu\text{g/ml}$) (**Figure 11**). Les résultats du dosage sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de lyophilisat.

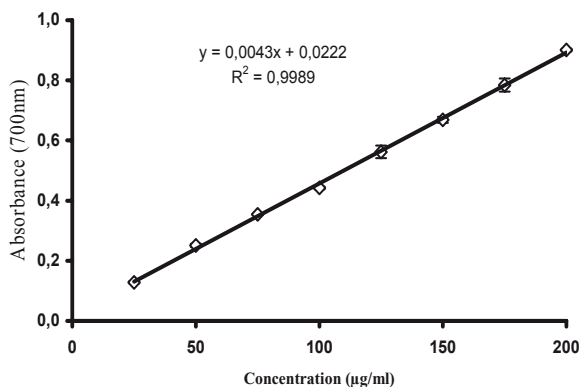


Figure 11: Gamme étalon de l'acide gallique avec le réactif du bleu de Prusse (Moyenne \pm SD, n = 3).

II.2.2.2. Dosage des flavonoïdes

La détermination quantitative des flavonoïdes est effectuée selon la méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun *et al.*, 1996).

Les échantillons sont préparés par la dissolution des lyophilisats dans le méthanol à la concentration de la solution mère 10 mg/ml, on fait des dilutions adéquates, puis on ajoute 1 ml du AlCl_3 (2% dans le méthanol) au 1 ml de chaque extrait. Le mélange est incubé pendant 10 minutes et la densité optique est lue à 430 nm.

Une gamme étalon est établie séparément avec la quercétine et la rutine (1-40 $\mu\text{g/ml}$) (Figure 12) pour calculer la concentration des flavonoïdes dans chaque extrait. Les résultats du dosage sont exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine ou de rutine par gramme de lyophilisat.

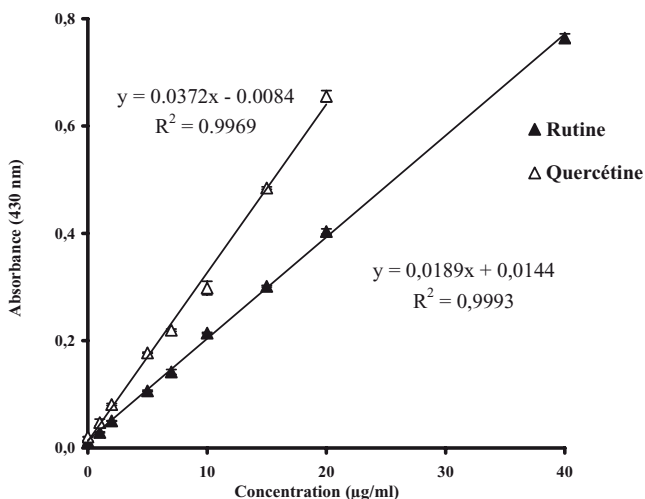


Figure 12: Gamme étalon de la quercétine et de la rutine avec le réactif de l' AlCl_3 (Moyenne \pm SD, n = 3).

II.2.2.3. Dosage des protéines

La quantité des protéines est estimée par la méthode de fixation du colorant (bleu brillant de Coomassie G250). La méthode suivie est celle développée par Bradford (1976) et modifiée par Macard *et al* (1982). Le bleu de Coomassie (G250) à 0.004 % (P/V) est dissous dans un mélange à 4 % éthanol (96 %) et 10 % acide phosphorique (85 %). Le mélange est additionné de SDS 0.1 % (P/V). L'addition du SDS au réactif proposée par Macart a pour effet de diminuer l'intensité de coloration.

Le réactif (2 ml) est ajouté à 1 échantillon (100 μ l) convenablement dilué et mélangé au vortex. L'absorbance est mesurée à 595 nm contre un blanc contenant 100 μ l H₂O et 2 ml de réactif. Une courbe étalon est constituée avec l'albumine sérique bovin (BSA) dissoute dans l'eau distillée 2 mg / ml. Des dilutions de l'étalon de 0.1 à 2 mg / ml sont effectuée et traitées de la même façon que l'échantillon. Une courbe linéaire est obtenue entre 0.1 et 2 mg / ml (Figure 13).

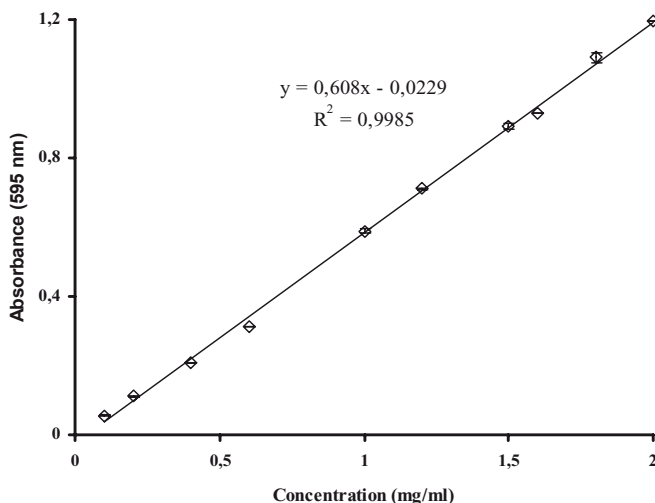


Figure 13: Gamme étalon de l'albumine bovine avec le réactif de Macart (Moyenne \pm SD, n = 3).

II.2.2.4. Electrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide est réalisée selon la méthode de Laemmli (1970) dans un système discontinu, comportant deux gels superposés :

Le gel de séparation (12 %) est composé de 11.7 % acrylamide et 0.3 % bis-(acrylamide) dans un tampon Tris-HCl (0.375 M, pH 8.8) contenant 0.1 % (P/V) SDS, 0.042 % TEMED et 0.033 % persulfate d'ammonium. Le gel de regroupement (5 %) est préparé à partir de 4.876 % d'acrylamide et de 0.12 % de bis-(acrylamide) dans un tampon Tris-HCl (0.125 M, pH 6.8) contenant 0.1 % SDS (P/V) additionné de 0.1 % TEMED et de 0.1 % (P/V) persulfate d'ammonium.

Les échantillons et les standards de poids moléculaire sont dilués avec une solution d'échantillon constituée de 2 volumes de Tris-HCl (1 M, pH 6.8) contenant 4 % (P/V) SDS, 20 % (V/V) glycérol et 1 volume de bleu de bromophenol 0.1 % (P/V) dans Tris-HCl (20 mM, pH 7.0). Les échantillons sont chauffés à 100 °C dans un bain-marie pendant 5 min avant d'être déposés. La quantité de protéine à déposer est généralement de 5-15 µg / puits.

Après le dépôt des échantillons, l'électrophorèse est conduite en utilisant un tampon Tris-HCl (0.025 M, pH 8.3), glycine 0.192 M et 0.1% (P/V) SDS à un ampérage de 10 mA jusqu'à ce que les échantillons pénètrent dans le gel de séparation. L'ampérage est ensuite augmenté à 40 mA. L'électrophorèse est arrêtée lorsque l'indicateur (bleu de bromophénol) est à un centimètre du bas du gel. Le gel est démoulé, fixé dans une solution d'acide trichloroacétique 12.5 % (P/V) pendant 2-4 heures, puis coloré avec une solution contenant le bleu de coomassie R250 (0.1% (P/V) dissous dans un mélange de (45 % (V/V) éthanol, 10 % (V/V) acide acétique et 45 % H₂O). Une solution constituée de 7.5 % (V/V) acide acétique dans l'eau sert à décolorer le gel pour la mise en évidence des bandes protéiques.

Les poids moléculaires des protéines correspondants aux bandes obtenues sur le gel de l'électrophorèse sont calculés à partir d'une courbe étalon (**Figure 14**) de poids moléculaires standards, tracée par les logarithmes décimaux des poids moléculaires ($\text{Log}_{10}(\text{M.W.})$) en fonction des rapports frontaux (Rf).

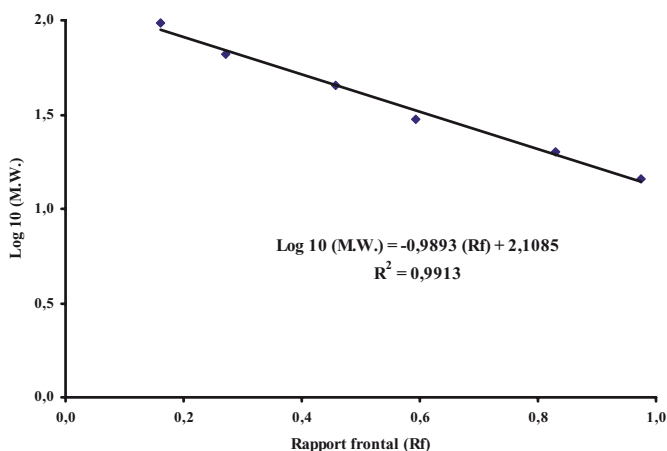


Figure 14 : Courbe étalon des poids moléculaires standard.
M.W. : Molecular Weight (Poids moléculaire).
Rf: Rapport Frontals

II.2.3. Etude de l'activité antioxydante des différents extraits

II.2.3.1. Technique du 2, 2'-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Cette méthode est basée sur la réduction d'un radical libre très stable; le 2,2'-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) en présence d'un antioxydant donneur d'électron (Cuendet, Hostettmann, & Potterat, 1997; Burits & Bucar, 2000). Une solution méthanolique du DPPH est caractérisée par une couleur violette intense, cette couleur violette disparaît en accord avec la réduction du (DPPH) par un antioxydant (Fiorentino *et al.*, 2007). Le mélange réactionnel

est préparé comme suit ; 50 µl de différentes concentrations des extraits, dissous dans le méthanol sont ajoutés à 5 ml de la solution du DPPH (0.004% dans le méthanol). Après une incubation de 30 minutes à la température ambiante, la densité optique est lue à 517 nm.

Le pourcentage d'inhibition du radical libre (DPPH) par les différents extraits (I%) est calculé selon la formule suivante:
$$I\% = (A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{blanc}} * 100$$

A_{blanc} : l'absorbance du control réactif (ne contient pas l'extrait).

A_{Echant} : l'absorbance de l'extrait avec le réactif.

La concentration des extraits provoquant 50% d'inhibition (IC₅₀) est calculée à partir d'un graphe du pourcentage d'inhibition contre la concentration des extraits.

II.2.3.2. Technique de la β-Carotène/ acide linoléique

Dans cet essai, la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition des composés organiques volatils et les diene hydroperoxydes conjugués qui surviennent d'oxydation de l'acide linoléique (Dapkevicius, Venskutonis, Van Beek, & Linssen, 1998). Le mélange réactif (β-carotène/acide linoléique) contient la β-carotène (0.5 mg/ml dans le chloroforme), 25 µl d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Le chloroforme sera complètement s'évaporé on utilisant un évaporateur à vide, puis on ajoute 100 ml d'eau distillée saturée de l'oxygène (100 ml/min de 30 min) avec une agitation vigoureuse. 2500 µl du mélange réactif ont été ajoutés à 350 µl des extraits (2g/l) distribués dans des tubes à essai, et le système de l'émulsion été incubé pour jusqu'à 48 h à la température de la chambre. La même procédure a été répétée avec des antioxydants synthétiques (Acide gallique, quercétine, rutine, acide caféique, catéchine et l'acide tannique), avec le hydroxytoluene butylé (BHT) comme contrôle positif, et avec un blanc qui se soit le méthanol ou l'eau. Après cette période d'incubation, les absorptions des mélanges ont été mesurées à 490 nm dans des temps différents (1h, 2h, 4h, 6h, 24h et 48h) pour obtenir une cinétique. La capacité antioxydante des extraits a été comparée avec ceux du BHT et du blanc.

II.2.3.3. Technique de Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP)

L'essai FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) est réalisé selon la méthode décrite initialement par Benzie et Strain (1996) et modifiée par Pulido et ses collaborateurs (2000). Cette méthode mesure le pouvoir réducteur des antioxydants présents dans un mélange par leur capacité de réduire le tripyridyl-triazine ferrique (Fe^{3+} -TPTZ) en ferreux (Fe^{2+}) à pH acide. Une solution fraîche du réactif FRAP est préparée par mélange de 2,5 ml de la solution du TPTZ (10 mM dans 40 mM HCl) avec 2,5ml du $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20mM) et 25ml du tampon acétate (300 mM d'acétate de sodium, pH conduit à 3,6 par l'acide acétique). 900 μl du réactif FRAP, préalablement incubé à 37°C, sont mélangés avec 90 μl d'eau distillée et 30 μl de l'échantillon (avec dilutions appropriées). La dilution finale des solutions d'échantillons dans le volume final est de 1/34. L'augmentation de l'absorbance à 595 nm est ensuite suivie pendant 30 minutes à 37°C. Les lectures sont effectuées contre l'eau distillée et les absorbances des blancs du réactif (les 30 μL d'échantillon sont remplacés par de l'eau bidistillée) et des échantillons (absorbances des échantillons avec dilutions appropriée sans le réactif FRAP) sont soustraites de l'absorbance finale. Une gamme du $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (étalon réducteur) entre 0 et 2000 μM est utilisée pour calculer les valeurs FRAP des extraits et des antioxydants synthétiques. La valeur FRAP est exprimée en μM du $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, et représente la concentration du standard ou de l'extrait présentant la même absorbance que celle du $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Le paramètre EC1 (concentration équivalente 1), des extraits et standards est calculée à 4 et 30 minutes. L'EC1 est défini comme la concentration de l'antioxydant qui donne une réduction du TPTZ équivalente à 1 mM du $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; c'est la concentration de l'antioxydant donnant une augmentation dans l'absorbance à 593 nm équivalente à la valeur théorique de l'absorbance donnée par une concentration de 1 mM du FeSO_4 déterminée par l'équation de régression correspondante.

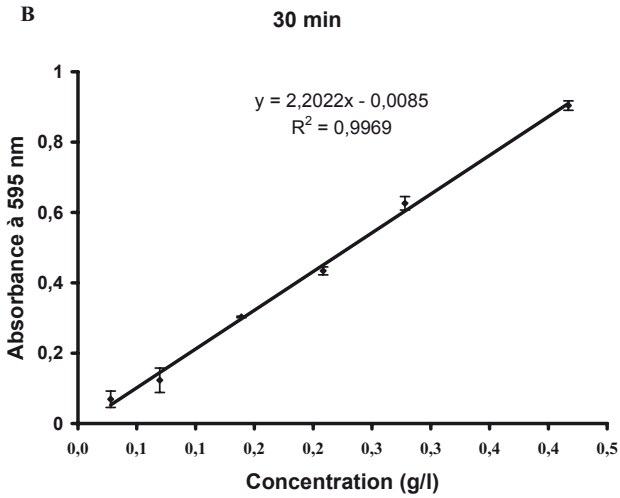
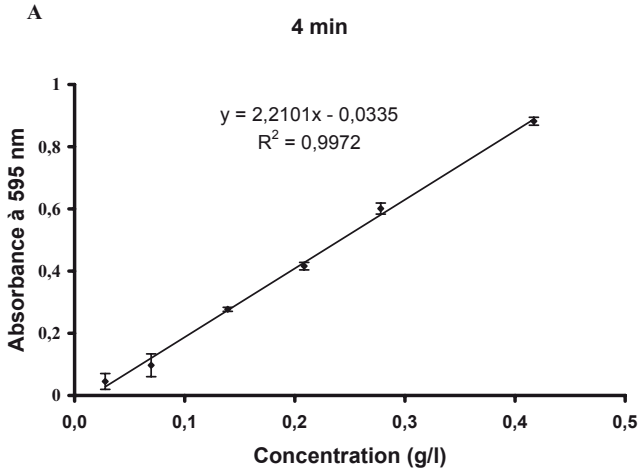


Figure 15: Gamme d'étalonnage du $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (A) : à 4 min, (B) : à 30 min

II.2.4. Etude de l'activité antibactérienne des différents extraits

II.2.4.1. Méthode des puits de diffusion

Pour réaliser ce test on utilise le milieu Muller-Hinton agar pour la culture des différentes souches bactériennes examinées. Le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri (9 cm de diamètre) avec un épaisseur de 4 mm, puis les boîtes sont séchées à 37°C pendant 30 min avant l'utilisation.

A partir de cultures bactériennes de 6 heures en bouillon nutritif avec agitation à 37°C, des dilutions sont faites en eau physiologique stérile (10-1, 10-2), 5 ml de la dilution (10-2) de chaque souche sont versés sur le milieu solidifié et l'excès est éliminé après 2 à 3 min (méthode d'inondation).

A la surface des boîtes inoculées on provoque 1 ou 3 puits de 8mm et chacun est imprégné par 60 µl d'échantillon dissout dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) (Vardar Unlu *et al.*, 2003) ou dans l'eau avec une concentration de 30 mg/ml (1.8 mg/puit).

Après un temps d'incubation (24 h) à 37°C, les zones d'inhibition sont mesurées en millimètres et comparées avec celles du DMSO ou H₂O comme contrôle négatif et d'un antibiotique comme contrôle positif.

II.2.4.2. Méthode des disques de diffusion

De la même façon de la méthode des puits, à partir de cultures bactériennes de 6 heures en bouillon nutritif avec agitation à 37°C, des dilutions sont faites en eau physiologique stérile (10-1, 10-2), 5 ml de la dilution (10-2) de chaque souche sont versés sur le milieu solidifié et l'excès est éliminé après 2 à 3 min.

A l'aide d'une pince stérile 1 ou 3 disques de diffusion sont placés à la surface des boîtes inoculées et chacun est injecté par 10 µl de l'huile essentielle (Gulluce *et al.*, 2003).

Après 24 heures d'incubation à 37°C, les zones d'inhibition sont mesurées en millimètres et comparées avec celle d'un antibiotique.

II.3. Analyse statistique

Les résultats des différentes expériences sont exprimés en moyenne de trois \pm SD, à l'exception des résultats de dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes qui sont exprimés en moyenne de trois \pm SEM.

CHAPITRE III : RESULTATS et DISCUSSION

III.1. Résultats

III.1.1. Extraction et dosage des composés phénoliques

La préparation des extraits à partir des racines de *T. communis* L et *C. caeruleus* L a été effectuée selon la méthode de Markham (1982). Pour obtenir l'extrait brut les broyats des racines, ont été soumises à une extraction par un mélange hydroalcoolique méthanol / eau (85% MeOH, 15% eau). Ce dernier a subi un fractionnement par une série d'extractions avec des solvants à polarité croissante (Hexane (délipidation) → Chloroforme → Acétate d'éthyle). Cette extraction a permis d'obtenir quatre extraits : l'extrait brut (**E.Br**), l'extrait du chloroforme (**E.Ch**), l'extrait d'acétate d'éthyle (**E.Ac**) et l'extrait aqueux (**E.Aq**). Le calcul des rendements par rapport aux poids total de broyats (100g), montre que le rendement de l'E.Br du *T. communis* L est de $(8.052 \pm 0.53\%)$, suivi par l'E.Aq qui représente le rendement le plus élevé $(5.559 \pm 0.650\%)$ en comparaison avec l'E.Ch $(1.126 \pm 0.67\%)$ et l'E.Ac $(0.430 \pm 0.33\%)$ (**Tableau 03**). Suivant les mêmes observations, l'E.Br du *C. caeruleus* L (**Tableau 03**) représente $(9.185 \pm 1.005\%)$ du poids total de broyat, l'E.Aq $(6.837 \pm 0.785\%)$, l'E.Ch $(0.570 \pm 0.049\%)$ et enfin, l'E.Ac avec un rendement de $(0.181 \pm 0.043\%)$.

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé selon la méthode du bleu de Prusse modifiée par Graham (1992). L'acide gallique a été utilisé comme standard (**Figure 11**) et la teneur en polyphénols totaux est exprimée en milligramme d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (**mg EAG/g d'extrait**). Les résultats du dosage des polyphénols (**Tableau 03**) montrent que l'E.Br du *T. communis* L contient 24.756 ± 6.663 mg d'équivalent d'acide gallique/g d'extrait et l'E.Ch représente la fraction phénolique la mieux significative $(78.222 \pm 2.251$ mg/g) puis l'E.Ac $(61.432 \pm 9.466$ mg/g) et avec une faible teneur dans l'E.Aq qui ne contient que $(4.669 \pm 0.62$ mg/g). En ce qui concerne les extraits du *C. caeruleus* L, la teneur en composés phénoliques est relativement faible par rapport à celle des extraits du *T.*

communis L or l'E.Br contient 12.537 ± 0.678 mg d'équivalent d'acide gallique /g d'extrait ; presque la moitié de celle de l'E.Br du *T. communis* L. Cependant, l'E.Ac constitue la fraction la plus riche en polyphénols parmi les extraits du *C. caeruleus* L (37.739 ± 1.312 mg/g) tandis que l'E.Ch ne contient que (18.061 ± 1.205 mg/g). L'E.Aq prend une quantité double de celle de l'E.Aq du *T. communis* L (9.879 ± 0.399 mg/g).

Les flavonoïdes ont été dosés par la méthode du trichlorure d'aluminium (Baharun *et al.*, 1996) en utilisant comme standard la quercétine et la rutine (**Figure 12**). La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalents de quercétine ou rutine par gramme d'extrait (**mg EQ/g d'extrait** ou **mg ER/g d'extrait**). La détermination des taux de flavonoïdes (**Tableau 03**) révèle, que pour le *C. caeruleus* L, l'E.Ch est le plus riche en flavonoïdes par rapport aux autres extraits, suivi par l'E.Ac. Cependant, des faibles quantités sont trouvées dans l'E.Br et l'E.Aq. Par contre, l'E.Ac du *T. communis* L est le plus riche en flavonoïdes que les autres extraits (**Tableau 03**).

III.1.2. Extraction, dosage et électrophorèse des protéines

L'extraction des protéines des deux plantes a été réalisée selon la méthode de (Mahmoud *et al.*, 2003) et (Khan *et al.*, 2003) avec quelques modifications. Cette extraction est réalisée par l'infusion de 10g du broyat des racines de la plante dans 90 ml eau distillée. La détermination quantitative des protéines dans les deux plantes par la méthode de Bradford (1976) modifiée par Macart et Gerbaut (1982) en utilisant une droite étalon de l'albumine bovine (0.1-2 g/l) (**Figure 13**). Celle-ci révèle que la teneur des racines des deux plantes en protéines est faible. La quantité des protéines trouvée chez le *T. communis* L (1.807 ± 0.10 g/l) est un peu plus grande (\approx le double) que celle trouvée dans les racines du *C. caeruleus* L (0.694 ± 0.31 g/l).

L'extrait protéique (**E.Pr**) des racines des deux plantes *T. communis L* et *C. caeruleus L* a été soumis à une électrophorèse (SDS-PAGE). Le chemin électrophorétique obtenu (**Figure 16**) représente trois bandes majeures pour l'extrait du *T. communis L* et deux bandes pour l'extrait du *C. caeruleus L*. Les poids moléculaires des protéines correspondants aux bandes obtenues sur le gel de l'électrophorèse sont calculés à partir d'une courbe étalon (**Figure 14**) de poids moléculaires standards, tracée par les logarithmes décimaux des poids moléculaires ($\log_{10} (M.W.)$) en fonction des rapports frontaux (Rf). Les poids moléculaires sont approximativement 41.100, 15.400, 13.900 KDa pour le *T. communis L* et 22.600, 17.200 KDa concernant le *C. caeruleus L*.

Tableau 03 : Rendement des différents extraits du *T. communis* L. et du *C. caeruleus* L. plus la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes exprimée en (mg EAG/g d'extrait) pour les polyphénols et (mg EQ/g d'extrait ou mg ER/g d'extrait) pour les flavonoïdes.

Extrait	Rendements (%)						Flavonoïdes ²						Polyphénols ¹			
	C _c		T _c	C _c		T _c	C _c		T _c	C _c		T _c	C _c		T _c	
	(a) (mg ER/g d'extrait)		(b) (mg EQ/g d'extrait)	(a) (mg ER/g d'extrait)		(b) (mg EQ/g d'extrait)	(a) (mg ER/g d'extrait)		(b) (mg EQ/g d'extrait)	(a) (mg ER/g d'extrait)		(b) (mg EQ/g d'extrait)	(a) (mg EAG/g d'extrait)		(b) (mg EAG/g d'extrait)	
E.Br	9.185 ± 1.005	8.052 ± 0.53	3.455 ± 0.283	4.320 ± 0.866	2.001 ± 0.144	2.440 ± 0.440	12.537 ± 0.678	24.756 ± 6.663	0.570 ± 0.049	1.126 ± 0.67	18.177 ± 0.156	15.014 ± 1.955	9.542 ± 0.079	7.934 ± 0.993	16.590 ± 2.687	78.222 ± 2.251
E.Ch	0.181 ± 0.043	0.430 ± 0.33	12.556 ± 0.648	19.601 ± 9.627	6.685 ± 0.329	10.265 ± 4.891	37.234 ± 2.384	61.432 ± 9.466	6.837 ± 0.785	5.559 ± 0.65	2.063 ± 0.182	2.051 ± 1.985	1.293 ± 0.093	1.287 ± 1.009	9.879 ± 0.399	4.669 ± 0.616

1 : la méthode du Bleu de Prusse modifiée, 2 : la méthode du Trichlorure d'aluminium, T_c : *Tamus communis* L. C_c : *Carthamus caeruleus* L.

(a) mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait

(b) mg d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait

(c) mg d'équivalent de rutine par gramme d'extrait

Les valeurs représentent la moyenne de 3 à 4 mesures ± SEM

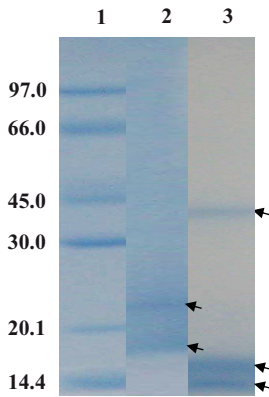


Figure 16 : Electrophorèse (SDS-PAGE) des protéines extraites à partir des racines du *Tamus communis L.* et celles du *Carthamus caeruleus L.*

1 : Standards des poids moléculaires (kDa) : Phosphorylase b 97.000, Albumin 66.000, Ovalbumin 45.000, Carbonic anhydrase 30.000, Trypsin inhibitor 20.100, α -Lactalbumin 14.400.

2 : Protéines du *Carthamus caeruleus L.*

3 : Protéines du *Tamus communis L.*,

III.1.3. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles à partir des racines du *T. communis L* et *C. caeruleus L* a été effectuée par une simple hydrodistillation avec un débit ne dépassant pas 2-4 ml/min. Les rendements calculés par rapport au poids total de broyats (100g) révèle que la teneur des racines des deux plantes en huiles essentielles est très faible. La teneur en huiles essentielles trouvée dans les racines du *C. caeruleus L.* ($0,0290 \pm 0,0188$ %) est presque la même que celle comprise dans les racines du *T. communis L.* ($0,0228 \pm 0,0043$ %).

III.1.4. L'activité antioxydante des différents extraits

Pour évaluer l'effet antioxydant des extraits des deux plantes, trois techniques ont été réalisées : La technique du 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), la technique de la β -Carotène/ acide linoléique et la technique FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma).

III.1.4.1. Le pouvoir scavenger évalué par la technique DPPH

La technique du 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est une technique spectrophotométrique (Cuended *et al.*, 1997; Burits et Bucar, 2000), basée sur la réduction du radical stable (DPPH) par des antioxydants donneurs des protons d'hydrogène. Une solution du DPPH dans le méthanol est caractérisée par une couleur violette intense qui absorbe la lumière à 517 nm. L'absorbance diminue et la couleur disparaît progressivement en accord avec la réduction du DPPH par ces antioxydants. Donc le pouvoir antioxydant des extraits des racines du *T. communis L* et *C. caeruleus L* évalué par cette technique, est inversement proportionnel à la disparition de la couleur violette du DPPH. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (réduction) du DPPH (I %), calculé selon la formule suivante :

$$I\% = (A_{\text{blanc}} - A_{\text{échant}}) / A_{\text{blanc}} * 100$$

Or, A_{blanc} représente l'absorbance du control réactif constitué de 50 μl méthanol et 5 ml de la solution du DPPH (ne contient pas l'extrait). Alors que, $A_{\text{échant}}$ c'est l'absorbance de l'extrait avec le réactif (50 μl d'une dilution de l'extrait + 5 ml de la solution du DPPH).

Les résultats obtenus (**Figure 18 : A, B et C**) montrent que tous les extraits et les standards réduisent d'une manière dose-dépendante le radical DPPH, c'est à dire le pourcentage de réduction (ou d'inhibition) du DPPH augmente avec la concentration des extraits, jusqu'à un seuil où le pourcentage d'inhibition se stabilise avec l'élévation de la concentration des extraits. Cependant, l'E.Pr des deux plantes et de l'albumine bovine se sont précipités au cours de la réaction avec le réactif du DPPH.

La concentration d'un extrait ou d'un standard provoquant 50 % d'inhibition ou de réduction du DPPH (IC_{50}) est calculée à partir de la partie linéaire des courbes de pourcentage

d'inhibition en fonction de la concentration de cet extrait (ou standard), avec un coefficient de régression supérieur à 0.95 ($R^2 > 0.95$) (**Tableau 04**).

L'E.Ch du *T. communis L* semble avoir l'effet inhibiteur le plus puissant sur le radicale DPPH, parmi les différents extraits des deux plantes, avec une IC_{50} de 18.889 ± 0.441 $\mu\text{g/ml}$, suivi par l'E.Ac du *T. communis L* (34.342 ± 1.261 $\mu\text{g/ml}$) puis l'E.Ch du *C. caeruleus L* (52.396 ± 1.448 $\mu\text{g/ml}$). Les valeurs des IC_{50} des différents extraits (**Tableau 04, A**) montrent que les pouvoirs inhibiteurs de l'E.Aq du *T. communis L* et l'E.Ac du *C. caeruleus L* sont les plus faibles. Cependant, les trois autres extraits ; l'E.Br du *T. communis L* et les deux extraits (E.Br, E.Aq) du *C. caeruleus L* expriment des inhibitions plus au moins importantes et proches ($IC_{50} = 185.473 \pm 5.650$, 246.382 ± 4.359 et 220.007 ± 2.731 $\mu\text{g/ml}$) pour l'E.Br/Tc, l'E.Br/Cc et l'E.Aq/Cc respectivement.

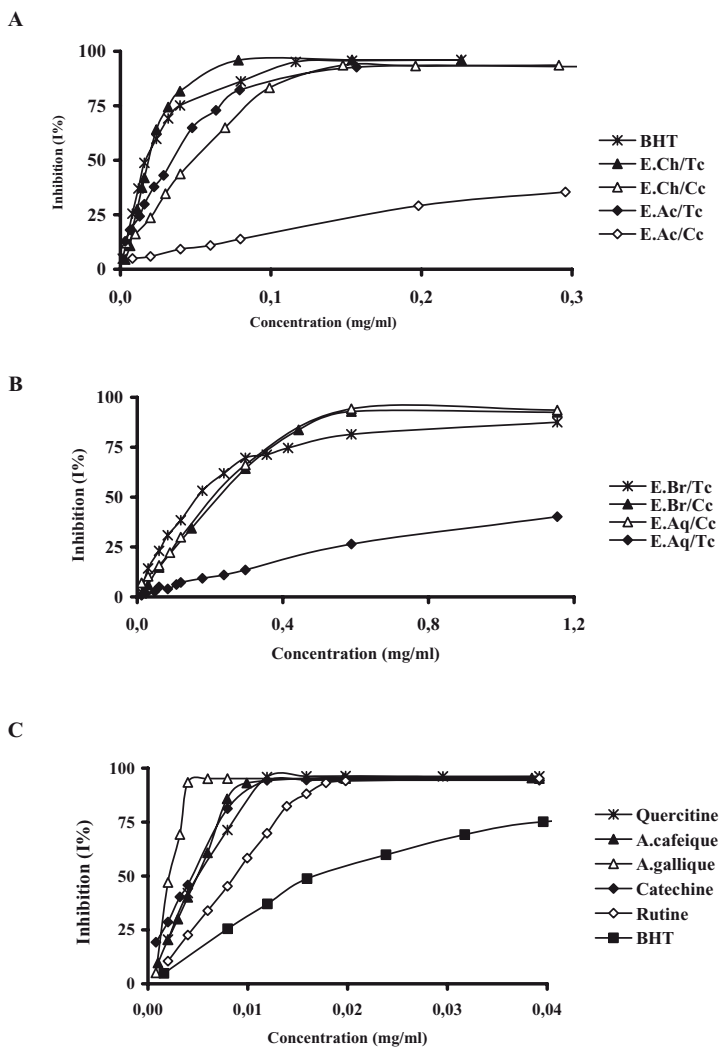


Figure 17 : le pouvoir antioxydant évalué par la technique du DPPH ; **A** : des extraits de *T. communis L* et de *C. caeruleus L* insolubles dans l'eau, **B** : des extraits solubles dans l'eau, **C** : des polyphénols standards, BHT : contrôle positif, (1% = la moyenne de 3 valeurs \pm SD).

En comparaison avec le BHT comme contrôle positif, l'effet inhibiteur des différents extraits des deux plantes est moins important que l'effet du BHT sauf l'E.Ch du *T. communis* L, qui représente un effet identique à celui du BHT ($IC_{50}=18,620 \pm 0.852 \mu\text{g/ml}$). En ce qui concerne les polyphénols standard, ils montrent un effet plus puissant que les effets de nos extraits ainsi que celui du BHT comme un contrôle positif. Cette supériorité apparaît clairement dans les graphes de la figure 18, où les graphes A et B montrent l'importance de l'effet inhibiteur du BHT et de l'E.Ch du *T. communis* L par rapport aux autres extraits. Le graphe C traduit la puissance de l'effet inhibiteur des polyphénols standards en comparaison à celui du BHT, et donc plus puissant que ce des différents extraits. Le **Tableau 04 (B)** représente les IC_{50} des polyphénols standard testés, qui ont été dans l'ordre suivant: A. Gallique ($2.389 \pm 0.291 \mu\text{g/ml}$) < Catéchine ($4.392 \pm 0.113 \mu\text{g/ml}$) < A. Caféique ($5.105 \pm 0.023 \mu\text{g/ml}$) < Quercétine ($5.395 \pm 0.170 \mu\text{g/ml}$) < Rutine ($8.621 \pm 0.309 \mu\text{g/ml}$).

Tableau 04: Les valeurs d' IC_{50} en microgramme par millilitre, (A) : des différents extraits et (B) : des standards testés. BHT : un contrôle positif ($IC_{50} = 18.620 \pm 0.852 \mu\text{g/ml}$, $R^2 = 0,960$), (IC_{50} = la moyenne de 3 valeurs \pm SD).

A

Extraits	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)				
	E.Ch	E.Ac	E.Br	E.Aq	E.Pr
Tc	18.889 ± 0.441 $R^2 = 0.993$	34.342 ± 1.261 $R^2 = 0,982$	185.473 ± 5.650 $R^2 = 0,977$	1640.675 ± 13.74 $R^2 = 0,989$	Précipite
Cc	52.396 ± 1.448 $R^2 = 0,991$	505.408 ± 4.404 $R^2 = 0,966$	246.382 ± 4.359 $R^2 = 0,986$	220.007 ± 2.731 $R^2 = 0,998$	Précipite

B

Standard	A.Gallique	Quercétine	Rutine	A.Caféique	Catéchine	Albumine
IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	2.389 ± 0.291 $R^2 = 0.968$	5.395 ± 0.170 $R^2 = 0,972$	8.621 ± 0.309 $R^2 = 0,997$	5.105 ± 0.023 $R^2 = 0,996$	4.392 ± 0.113 $R^2 = 0,994$	Précipite

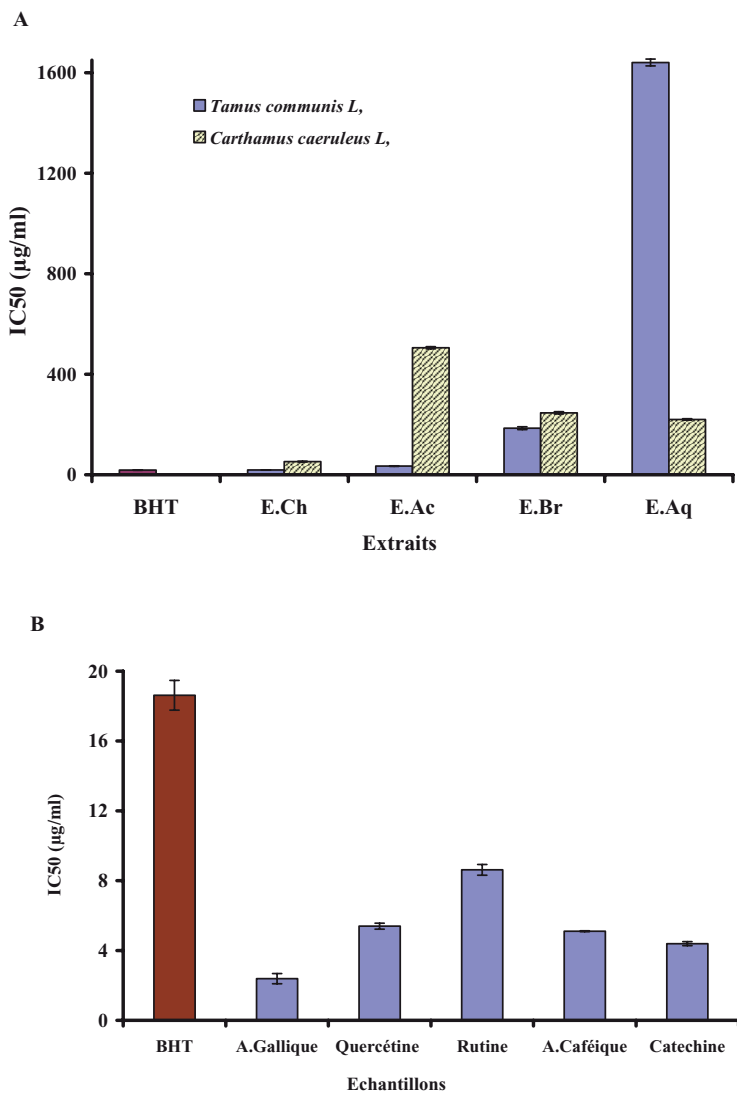


Figure 18 : Comparaison entre les concentrations provoquant 50% d'inhibition (IC₅₀) du radicale DPPH, (A) : des extraits des racines du *T. communis L.* et *C. caeruleus L.*, (B) : des polyphénols standards, BHT : contrôle positif, (IC₅₀ = la moyenne de 3 valeurs ± SD).

III.1.4.2. L'effet antioxydant évalué par la technique de la β -Carotène

Cette technique est basée sur l'inhibition des composés organiques volatils et les diène-hydroperoxydes conjugués qui surviennent de l'oxydation de l'acide linoléique, pour déterminer le pouvoir antioxydant des extraits et des polyphénols standard testés (*Dapkevicius et al., 1998*). Dans l'essai du β -carotène, l'acide linoléique produit des hydroperoxydes comme des radicaux libres durant l'incubation. La présence des antioxydants dans les extraits minimise l'oxydation de la β -carotène par ces radicaux libres. Les hydroperoxydes formés dans ce système vont être neutralisés par les antioxydants contenus dans les extraits ou les standards. On note une corrélation entre la dégradation de la β -carotène et l'oxygénation de celle-ci, alors que, le pourcentage d'inhibition est inversement proportionnel à cette dégradation. L'extrait avec le faible taux de dégradation et le grand pourcentage d'inhibition, possède la forte activité antioxydante.

Les résultats obtenus (**Figure 19 ; A, B et C**) révèlent que tous les extraits et les standards ont des activités antioxydantes faibles que celle du BHT (contrôle positif) sauf la rutine qui représente la même activité. Les différents extraits et les standards présentent un effet acceptable dans l'inhibition de cette oxydation. Cependant, le H₂O et le MeOH (contrôles négatifs) présentent une chute très rapide du pourcentage d'inhibition.

Les extraits insolubles dans l'eau (E.Ch, E.Ac) du *T. communis L* révèlent un pouvoir antioxydant plus ou moins élevé en comparaison avec les mêmes extraits du *C. caeruleus L*. La cinétique d'inhibition d'oxydation de la β -Carotène par ces extraits montre l'ordre suivant de la puissance antioxydant : l'E.Ch/Tc avec un pourcentage d'inhibition de $(89.838 \pm 2,043 \%)$ à 48 h, suivi par l'E.Ac/Tc $(87.991 \pm 1.447 \%)$ puis l'E.Ch/Cc $(78.372 \pm 1.472 \%)$ et en fin l'E.Ac/Cc avec un pourcentage de $71.854 \pm 1.134 \%$ (**Tableau 05, A**). En ce qui concerne les extraits solubles dans l'eau du *C. caeruleus L*, ils montrent ensemble un pouvoir

antioxydant puissant par apport aux extraits du *T. communis L.* l'E.Br/Cc possède le pourcentage d'inhibition le plus élevé ($75,946 \pm 1.236$ %) suivi par l'E.Aq/Cc ($75,329 \pm 0.744$ %) puis l'E.Br et l'E.Aq du *T. communis L.* avec des pourcentages d'inhibition de $71,786 \pm 2,021$ % et $52,386 \pm 1,507$ % respectivement. Ces résultats montrent que l'E.Ch des deux plantes et l'E.Ac du *T. communis L.* ont un pouvoir antioxydant plus puissant parmi les autres extraits, alors que l'E.Ac du *C. caeruleus L.* présente un effet plus ou moins identique à celui de l'E.Br et l'E.Aq de la même plante.

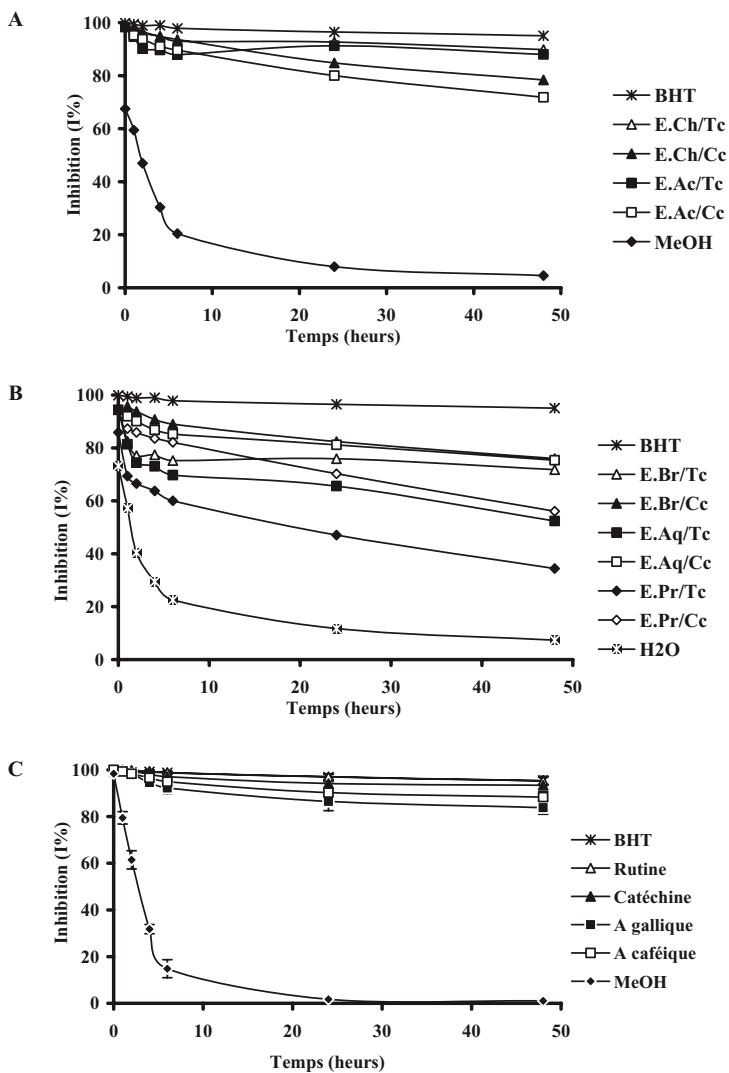


Figure 19 : Cinétique d'inhibition d'oxydation de la β -Carotène par : (A) Les extraits insolubles dans l'eau, (B) Les extraits solubles dans l'eau, (C) des antioxydants standards.

BHT : contrôle positif, (I%= la moyenne de 3 mesures \pm SD).

Les pourcentages d'inhibition des standards (**Tableau 05, B**), ont été dans l'ordre suivant : Rutine > Catéchine > A.Caféique > A.Gallique. Il est important de souligner que les extraits protéiques des deux plantes, montrent un effet antioxydant plus important dans cette technique au contraire du DPPH où les extraits protéiques n'avaient aucun effet sur le radicale DPPH. Le pourcentage d'inhibition effectué par l'E.Pr du *T. communis L* à 48 h, a été 34,411 %. Cependant, l'E.Pr du *C. caeruleus L*, a montré un effet antioxydant plus important que l'E.Pr du *T. communis L* avec un pourcentage d'inhibition à 48 h, de 56,086 % (**Tableau 05, A**).

Tableau 05: Les pourcentages d'inhibition (I %), estimés à 48 heures. (A) : des extraits du *T. communis L* et du *C. caeruleus L* (B) : des standards. BHT : un contrôle positif (I % = 95,321± 1,46 %), R2 =0,960).

A

Extraits	I % à 48 h				
	E.Ch	E.Ac	E.Br	E.Aq	E.Pr
Tc	89,838 ± 2,04	87,991 ± 1,45	71,786 ± 2,02	52,386 ± 1,51	34,411±2,14
Cc	78,372 ± 1,47	71,854 ± 1,13	75,946 ± 1,24	75,329 ± 0,74	56,086 ± 2,41

B

Standard	BHT	A.Gallique	Rutine	A.Caféique	Catéchine
I% à 48 h	95,321± 1,46	83,83 ± 2,85	95,36 ± 1,91	88,31 ± 2,29	93,38 ± 1,49

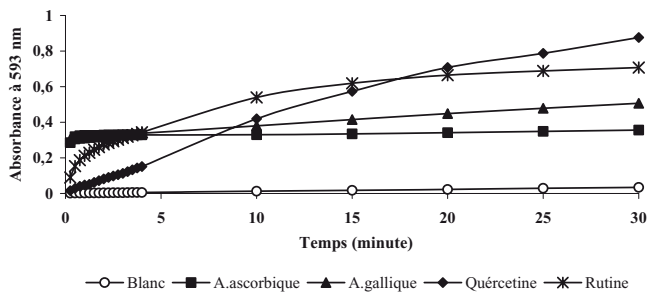
III.1.4.3. Le pouvoir réducteur estimé par la technique FRAP

La technique FRAP décrite initialement par Benzie et Strain (1996) et modifiée par Pulido *et al.* (2000) permet de mesurer le pouvoir réducteur d'un antioxydant qui réagit avec le complexe tripyridyltriazine ferrique (TPTZ-Fe⁺³) et qui produit le tripyridyltriazine ferreux (TPTZ-Fe⁺²). Généralement, les propriétés réductrices sont associées à la présence d'un composé donneur d'un atome d'hydrogène, qui exerce leur action par rupture de la chaîne du radicale libre (Gordon, 1990; Duh, Du, et Yen, 1999). Selon Benzie et Strain (1996), la réduction TPTZ-Fe⁺³ au TPTZ-Fe⁺² d'une couleur bleu, est rapide avec tous les réducteurs ayant des potentiels de la demi réaction de réduction supérieur à celui du couple Fe³⁺/Fe²⁺ et se produit à un pH faible.

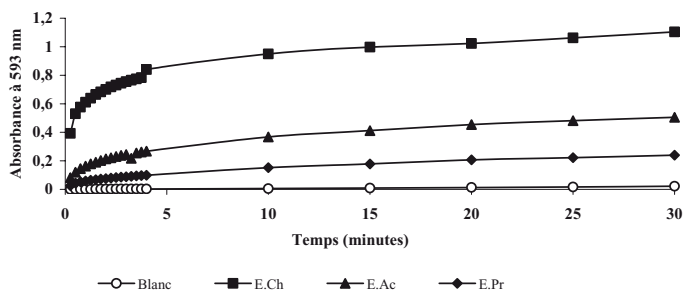
Pour mieux évaluer l'effet antioxydant des extraits des racines des deux plantes et des standards testés, on a mesuré le pouvoir réducteur des échantillons par la technique FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma). La **figure 20** montre la cinétique de la réduction du TPTZ-Fe³⁺ en TPTZ-Fe²⁺ par (A) des antioxydants standard et par les extraits des racines de (B) *T. communis L.*, et (C) *C. caeruleus L.* Comme il peut être observé, l'absorbance continue à augmenter après 4 minutes de réaction et même double à 30 minutes (cas de la quercétine, la rutine, l'E.Ch/Tc et l'E.Ch/Cc) par contre, la réaction de l'acide ascorbique est stable sans changement apparent dans l'absorbance après les premières quatre minutes.

Les standards; acide gallique, quercétine et rutine ainsi que les extraits des racines de *T. communis L.* et *C. caeruleus L.*; E.Ch, E.Ac, E.Br, E.Aq et E.Pr sont des "antioxydants à effet prolongé". Dont la réduction continue même après trente minutes (temps de la réaction). Contrairement aux autres standards (acide ascorbique) "à action rapide" dont l'absorbance n'augmente pas après les premières quatre minutes de la réaction.

A



B



C

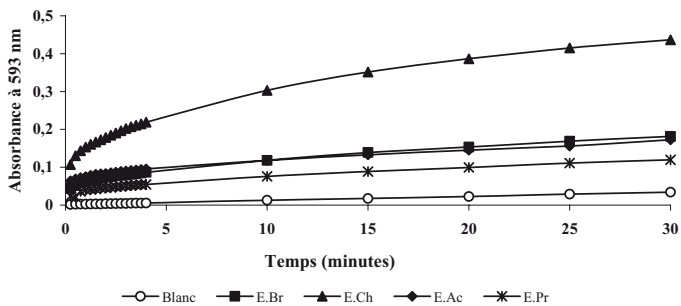


Figure 20: Cinétique de la réduction du TPTZ-Fe³⁺ en TPTZ-Fe²⁺ par (A) les antioxydants standards (250µM), (B) les extraits des racines de *T. communis L.* (0.8 mg/ml) et (C) les extraits des racines de *C. caeruleus L.* (0.5 mg/ml) (n=2).

Le paramètre EC₁ (concentration équivalente 1), des extraits et standards est calculée à 4 et 30 minutes. L'EC₁ est défini comme la concentration de l'antioxydant qui donne une réduction du TPTZ équivalente à 1 mM du FeSO₄.7H₂O ; la concentration de l'antioxydant donnant une augmentation dans l'absorbance à 593 nm qui est équivalente à la valeur théorique de l'absorbance donnée par une concentration de 1 mM du FeSO₄ et déterminée par l'équation de régression correspondante.

Les valeurs de la concentration équivalente 1 (EC 1) des antioxydants standards dans le **Tableau 05 (A)**, révèlent que la quercétine possède le pouvoir réducteur le plus élevé par rapport aux autres standards utilisés, avec une EC 1 de (257 µM à 4 min et 174.4 à 30 min), suivi par l'acide gallique (284.56 µM à 4 min et 204.62 à 30 min), puis la rutine (399.9 µM à 4 min et 200.2 à 30 min) et en fin, l'acide ascorbique avec une EC 1 de (404.5 µM à 4 min et 386.9 à 30 min).

En ce qui concerne les extraits des deux plantes, les E.Ch ont montré l'effet réducteur le plus puissant en comparaison avec les autres extraits. L'EC 1 de l'E.Ch du *T. communis L.* (0.524 g/l à 4 min et 0.390 g/l à 30 min) est la moitié de l'EC 1 de l'E.Ch du *C. caeruleus L.* Les valeurs des EC 1 des différents extraits sont dans l'ordre suivant (**Tableau 05, B et C**): l'E.Ch/Tc, l'E.Ch/Cc, l'E.Ac/Tc (2.216 g/l à 4 min et 1.182 g/l à 30 min), l'E.Aq/Cc (6,818 g/l à 4 min et 4,698 g/l à 30 min), l'E.Br/Cc, l'E.Ac/Cc, l'E.Br/Tc et finalement l'E.Aq/Tc. D'après ces résultats, on peut remarquer que les extraits insolubles dans l'eau du *T. communis L.* ont le pouvoir réducteur le plus puissant que les extraits du *C. caeruleus L.*, alors que c'est le contraire pour les extraits hydrosolubles, or l'E.Br et l'E.Aq du *C. caeruleus L.* ont montré un pouvoir réducteur du Fe³⁺ plus puissant que l'E.Br et l'E.Aq du *T. communis L.* et plus important ou égale à l'effet de l'E.Ac du *C. caeruleus L.*

Par cette technique les E.Pr des deux plantes ont révélé des EC 1 plus élevés en comparaison aux extraits méthanoliques, ils réagissent lentement avec le complexe Fe^{3+} -TPTZ. Ce résultat se traduit par le faible potentiel réducteur des protéines sur le fer.

Tableau 06 : La concentration équivalente 1 (EC1) : (A) des antioxydants standards, (B) des extraits du *T. communis L.* et (C) des extraits du *C. caeruleus L.*

A

Temps	Quercetine	Rutine	A. Gallique	A. Ascorbique
EC1 à 4 min (μ M)	257	399,9	284.56	404.5
EC1 à 30 min (μ M)	174.4	200,2	204.62	386.9

B

Temps	E.Ch	E.Ac	E.Aq
EC1 à 4 min (g/l)	0.524 \pm 0.022	2.216 \pm 0.052	16.418 \pm 0.299
EC1 à 30 min (g/l)	0.390 \pm 0.045	1.182 \pm 0.022	8.955 \pm 0.149

C

Temps	E.Ch	E.Ac	E.Aq
EC1 à 4 min (g/l)	1.537 \pm 0.097	7.366 \pm 1.054	5.722 \pm 0.136
EC1 à 30 min (g/l)	0.812 \pm 0.028	3.110 \pm 0.334	3.521 \pm 0.029

III.1.5. L'activité antibactérienne

Les extraits méthanoliques, protéiques et les huiles essentielles du *T. communis* et du *C. caeruleus* sont testés contre une série de bactéries : **Gram-positif** (*Staphylococcus aureus* ATCC 2592 3, *Bacillus sp*) et **Gram-négatif** (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomeran*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Service de *C.H.U.* de l'hôpital universitaire de Sétif). L'activité antibactérienne des différents extraits des deux plantes contre les neuf souches testées dans cette étude et leur puissance, sont qualitativement et quantitativement réparties par la présence ou l'absence d'une zone d'inhibition et le diamètre de cette zone.

III.1.5.1. L'activité antibactérienne des extraits méthanoliques et protéique

Pour évaluer la sensibilité des bactéries à nos extraits et connaître l'effet antibactérien des polyphénols et des huiles essentielles de nos plantes, on a appliqué deux types d'antibiogramme de diffusion ; l'un par l'utilisation des disques et l'autre par provoquer des puits à la surface du milieu de culture gélosé.

En ce qui concerne la méthode des puits de diffusion, à la surface des boîtes inoculées on provoque 1 ou 3 puits de 8 mm et chacun est imprégné par 60 µl d'échantillon dissout dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) (*Vardar et al., 2003*) ou dans l'eau, avec une concentration de 30 mg/ml (1.8 mg/puit). Après un temps d'incubation (24 h) à 37°C (*Bacillus sp* incubé à 30°C), les zones d'inhibition sont mesurées en millimètres et comparées avec celles du DMSO ou H₂O comme contrôle négatif et des disques d'antibiotiques comme contrôle positif. Par cette concentration, les extraits et les polyphénols standards n'ont aucun effet sur ces souches bactériennes, or, les zones d'inhibition ne dépassent pas le diamètre des puits. Par contre, l'augmentation de la concentration à 100 mg/ml (6 mg/puit), montre que les extraits solubles

dans l'eau (l'E.Br, l'E.Aq et l'E.Pr) n'ont aucun effet sur toutes les souches bactériennes (**Tableau 07**), alors que les extraits insolubles dans l'eau (l'ECh, l'EAc) et les polyphénols standards, présentent un effet plus ou moins important contre quelques souches bactériennes.

Les résultats obtenus dans le Tableau 07 montrent que l'E.Ch des deux plantes a le plus grand pouvoir antibactérien en comparaison avec les autres extraits or, l'ECh du *T. communis* a la capacité d'inhiber quatre souches bactériennes (*S. aureus*, *Bacillus sp*, *E. agglomerans*, *S. marcescens*) (**Figure 21**) avec des zones d'inhibition comprises entre 10 et 14 mm. L'E.Ch du *C. caeruleus* provoque des zones d'inhibition entre 9 et 18 mm de diamètre contre (*S. aureus*, *E. Coli*, *Bacillus sp*, *K. pneumoniae*) (**Figure 21**). L'E.Ac du *T. communis* a montré des zones d'inhibition contre trois souches bactériennes, entre 9 et 11 mm. Tandis que, les zones d'inhibition provoquées par l'E.Ac du *C. caeruleus L*, ont été contre deux souches bactériennes (09 et 13 mm).

Parmi les polyphénols standards testés, l'acide gallique est le plus actif sur les différentes souches surtout sur le *Bacillus sp* et sur le *S. aureus* avec des zones d'inhibition de 19 et 20 mm respectivement, suivi par la rutine sur deux souches *Bacillus sp* et *P. aeruginosa* (13 et 11 mm respectivement) puis la quercétine sur les même deux souches (11 et 10 mm respectivement). Cependant, le BSA n'a aucun effet sur les différentes souches bactériennes testées (**Tableau 07**).

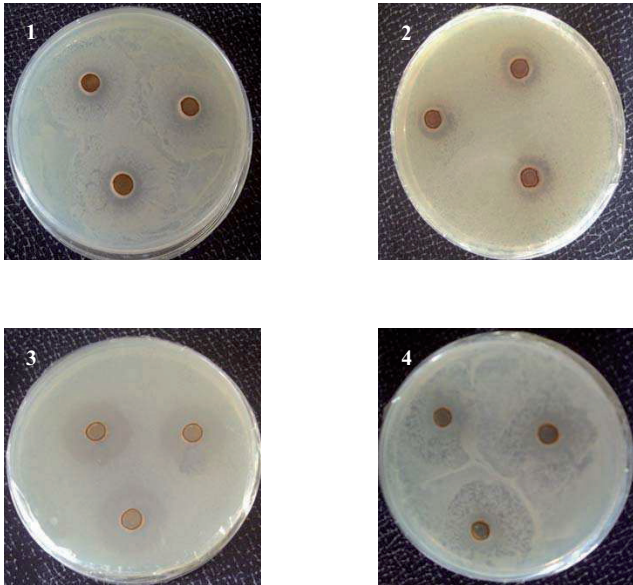


Figure 21: Les zones d'inhibition effectuées par : (1) l'E.Ch du *T. communis L* contre le *S. aureus*, (2) l'E.Ch du *T. communis L* contre l'*E. agglomerans*, (3) l'E.Ch du *C. caeruleus L* contre le *S. aureus* et (4) l'E.Ch du *C. caeruleus L* contre l'*E. coli*. (la méthode des puits de diffusion), (n = 3).

Tableau 07 : Les diamètres des zones d'inhibition (DD en millimètre) des souches bactériennes provoquées par les extraits des deux plantes, les standards et les contrôles positifs.

Souches	E.Ch		E.Ac		E.Br		E.Aq		E.Pr		Standards			Contrôle négatif		
	Tc	Cc	Tc	Cc	Tc	Cc	Tc	Cc	Tc	Cc	Rut	Quer	Agall	BSA	DMSO	H2O
<i>Bacillus sp</i>	10 ± 0.58	09 ± 0.58	-	-	-	-	-	-	-	-	13	11	19	-	-	-
<i>S. aureus</i>	14 ± 0.58	15 ± 1.00	11 ± 1.00	13 ± 0.58	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-
<i>C. freundii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-
<i>E. agglomerans</i>	14 ± 1.53	-	10 ± 1.00	09 ± 0.58	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	09 ± 1.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	10	12	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	18 ± 1.53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-	-
<i>S. typhi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-
<i>S. marcescens</i>	12 ± 0.58	-	09 ± 0.58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-

Tc : *Tamias communis* L, Cc : *C. caeruleus* L. Rut : rutine, Quer : quercétine, A. Gall : acide gallique, BSA: Albumine bovine.
(-) : aucun effet. DD = la moyenne de 3 estimations ± SD.

III.1.5.2. L'activité antibactérienne des huiles essentielles

Les résultats donnés dans le **Tableau 08**, montrent que les huiles essentielles du *C. caeruleus*, ont montré un effet inhibiteur sur six souches bactériennes, mais très faible. Les zones d'inhibition ne dépassent pas 10 mm de diamètre. Cependant, les huiles essentielles du *T. communis* avaient une forte activité antibactérienne contre sept souches bactériennes parmi les neuf testées. Les valeurs maximales de diamètres des zones d'inhibition étaient dans l'intervalle (19 - 25 mm), or les bactéries à Gram-positif; *Bacillus sp* et *Staphylococcus aureus*, présentent la plus grande sensibilité avec des zones d'inhibition; 25 et 24 mm de diamètre, successivement. *P. aeruginosa* et *S. marcescens* ont montré une résistance aux huiles essentielles des deux plantes. Alors que, l'*E. agglomerans* présente leur résistance aux huiles essentielles de *C. caeruleus*.

Tableau 08: Les diamètres des zones d'inhibition (DD en millimètre) des souches bactériennes provoquées par les huiles essentielles des deux plantes, les standards et les contrôles positifs

Souches bactériennes	Huiles essentielles (DD en mm)	
	<i>Tc</i>	<i>Cc</i>
<i>Bacillus sp</i>	25 ± 0.00	09
<i>S. aureus</i>	24 ± 1.00	10
<i>C. freundii</i>	21 ± 0.71	09
<i>E. agglomerans</i>	19 ± 1.00	-
<i>K. pneumoniae</i>	19 ± 1.00	08
<i>E. coli</i>	24 ± 0.71	08
<i>P. aeruginosa</i>	-	-
<i>S. typhi</i>	20 ± 0.00	08
<i>S. marcescens</i>	-	-

Tc : *Tamus communis* L, *Cc* : *Carthamus caeruleus* L.
 (-) : aucun effet. (DD = la moyenne de 2 estimations ± SD).

Les effets antibactériens des différents extraits, standards et huiles essentielles, ont été comparés à ceux de 14 antibiotiques sous forme de disques standards : Polymyxine (PB 300 UI), Néomycine (Néo 30 UI), Nibiol (Nib 20 µg), Doxycycline (Dot 30 UI), Cloramphénicol (Cmp 30 µg), Gentamicine (Gen 10 UI), Erythromycine (E 15 UI), Amoxicilline + Acide

clavulanique (AMC 20/10 µg), Penicilline (Pen 06 µg), Cefazoline (CZ 30 µg), Amoxicilline (AMX 25 µg), Lincomycine (Lin 15 µg), Sulfamides Forts (Suf 200 µg), Cefotaxime (CTX 30 µg). Parmi les antibiotiques testés le Pen et Lin n'ont aucun effet sur les neuf souches examinées. Les quatre antibiotiques (AMC, CZ, CTX, Suf) ont inhibé la culture bactérienne seulement des deux mêmes souches (*K. pneumoniae* et *E. coli*). Cependant, l'E a inhibé le *S. aureus* et *S. marcescens*, alors que, l'AMX a exercé leur effet contre une seule souche qui est l'*E. coli* (Tableau 08). Les autres antibiotiques sont dans l'ordre suivant, en terme d'efficacité antibactérienne (Tableau 08): (1) le Nib inhibe toutes les souches testées sauf le *P. aeruginosa* (Figure 22). Les zones d'inhibition ont été entre 20 et 22 mm à l'exception du *S. aureus* avec une zone d'inhibition ne dépasse pas 08 mm. (2) le Néo inhibe toutes les souches testées à l'exception du *P. aeruginosa* avec des zones d'inhibition comprises entre 11 et 16 mm. (3) le PB a montré un effet antibactérien contre toutes les souches testées mais les zones d'inhibition ont été dans l'intervalle (11 – 14 mm). (4) les deux antibiotiques Dot et Cmp ont inhibé les mêmes souches à l'exception de *E. agglomerans*, *P. aeruginosa* et *S. typhi*. Les diamètres d'inhibition ont été comme suit : de 09 à 18 mm pour le Dot et de 11 à 23 pour le Cmp. (5) le dernier antibiotique (Gen) inhibe quatre souches (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. marcescens*).

Les activités antibactériennes des extraits insolubles dans l'eau (E.Ch, E.Ac) des deux plantes sont comparables aux activités des antibiotiques testés. Les huiles essentielles du *C. caeruleus* L, ont montré un effet plus ou moins important en comparaison aux antibiotiques qui n'ont aucun effet ou agissent sur une ou deux souches bactériennes parmi les neuf examinées. Tandis que, les huiles essentielles du *T. communis* L, ont présenté une excellente inhibition de sept souches en comparaison avec tous les extraits, les standards et les antibiotiques examinés (Figure 22).

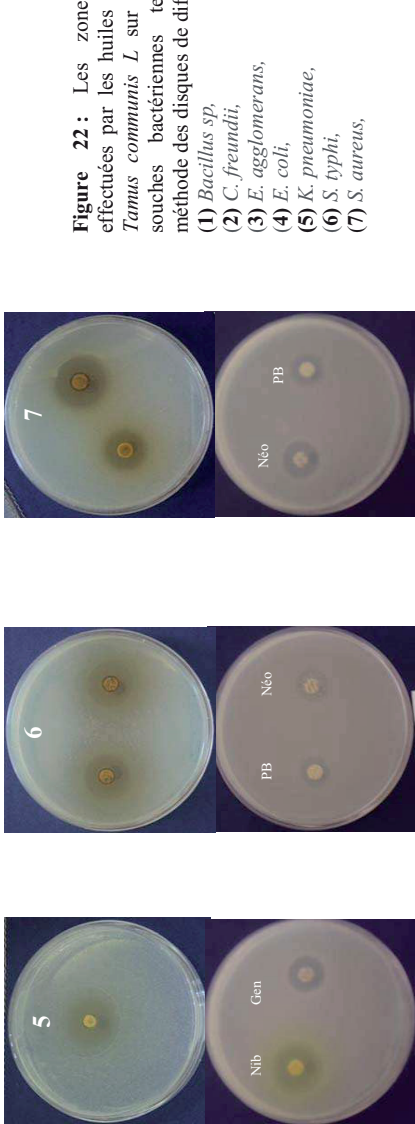
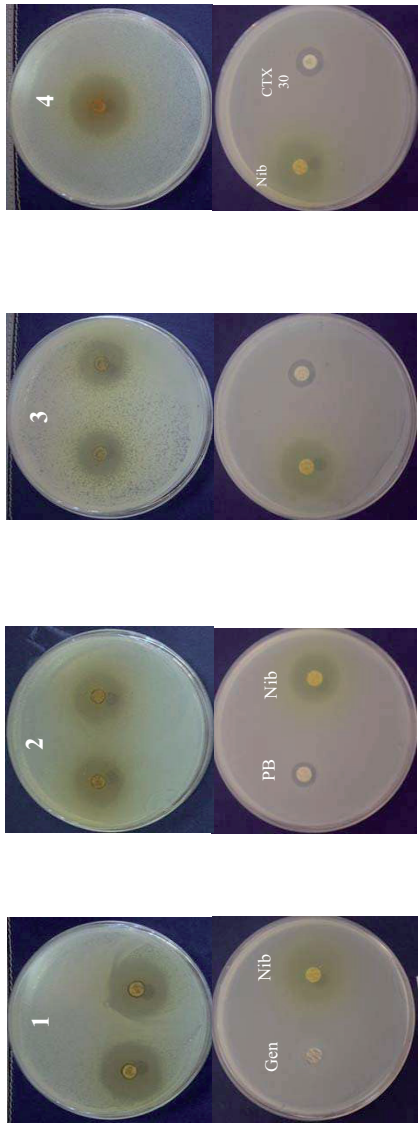


Figure 22 : Les zones d'inhibition effectuées par les huiles essentielles du *Tamoxifen communis L.* sur les différentes souches bactériennes testées par la méthode des disques de diffusion:

- (1) *Bacillus sp.*,
- (2) *C. freundii*,
- (3) *E. agglomerans*,
- (4) *E. coli*,
- (5) *K. pneumoniae*,
- (6) *S. typhi*,
- (7) *S. aureus*,

Tableau 09: Les diamètres des zones d'inhibition (DD en millimètre) des souches bactériennes provoquées par les antibiotiques standards.

	<i>Bacillus</i> sp	<i>S. aureus</i>	<i>C. freundii</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. marcescens</i>
PB (300 UI)	11	12	12	12	14	13	13	13	12
Néo (30 UI)	16	16	14	11	16	16	-	15	15
Nib (20 µg)	22	08	21	22	22	22	-	21	20
Dot (30 UI)	11	12	13	-	16	18	-	-	09
Cmp (30 µg)	15	11	16	-	17	23	-	-	15
Gen (10 UI)	-	-	-	-	16	16	11	-	16
E (15 UI)	-	09	-	-	-	-	-	-	10
AMC (20/10 µg)	-	-	-	-	19	16	-	-	-
Pen (6 µg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CZ (30 µg)	-	-	-	-	15	15	-	-	-
AMX (25 µg)	-	-	-	-	-	16	-	-	-
Lin (15 µg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Suf (200µg)	-	-	-	-	14	09	-	-	-
CTX (30µg)	-	-	-	-	12	13	-	-	-

III.2. DISCUSSION

III.2.1. Caractérisation des extraits méthanoliques et protéiques

En Algérie, le *T. communis* et le *C. caeruleus* sont appliqués dans la médecine traditionnelle et afin de confirmer le rôle des composés phénoliques et en particulier des flavonoïdes dans leurs activités, nous avons choisi une méthode d'extraction basée sur le degré de solubilité des flavonoïdes dans les solvants organiques (Markham, 1982). Cette extraction a permis d'obtenir trois extraits pour chaque plante en plus de l'extrait brut. Ces extraits présentent des rendements dans l'ordre suivant, pour les deux plantes: l'E.Br avec un rendement plus élevé, suivi par l'E.Aq, et avec des faibles rendements pour l'E.Ch et l'E.Ac (**Tableau 07, section résultats**). Ce résultat est concorde avec ceux trouvés par Boumerfeg *et al.* (2009) utilisant la même méthode d'extraction sur les racines du *T. communis*.

L'utilisation des solvants, avec des polarités différentes dans cette extraction, permet de séparer les flavonoïdes selon leur degré de solubilité et donc selon leur degré de glycosylation (flavonoïdes aglycones, mono, di, tri et tetra-glycosylés). D'après Newman *et al.* (1997) et Markham (1982), les composés que pourraient contenir les différents extraits préparés serait comme suit; l'extrait brut peut contenir des flavonoïdes, des aminoacides, des terpènes, des cires et des tannins, l'extrait chloroformique riche en flavonoïdes aglycones, peut contenir aussi des terpénoïdes, l'extrait d'acétate d'éthyle renferme des flavonoïdes glycosidiques, notamment les mono et les diglycosidiques, des flavonoïdes sulfatés et des coumarines. Finalement, l'extrait aqueux peut contenir des flavonoïdes les plus polaires (di, tri et tetraglycosidiques), des alcaloïdes, des acides aminés, des tannins, des acides phénoliques et des coumarines.

Dans le but de caractériser les extraits préparés à partir des racines des deux plantes, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué, du fait que la majorité des effets

pharmacologiques des plantes médicinales sont attribués à ces substances. La méthode choisie pour le dosage des polyphénols c'est la méthode modifiée du bleu de Prusse (Graham, 1992). Cette méthode a été retenue vu sa fiabilité, faisabilité et reproductibilité. La détermination des polyphénols totaux montre que la quantité de ces composés dans l'E.Ch du *T. communis*, est relativement importante en comparaison avec les autres extraits, suivi par l'E.Ac, puis l'E.Br et enfin l'E.Aq avec une faible teneur (**Tableau 07 : section résultats**). Cependant, pour le *C. caeruleus*, l'E.Ac représente la fraction la plus riche en polyphénols avec une teneur double de celle trouvée dans l'E.Ch. Le dosage des flavonoïdes par la méthode du trichlorure d'aluminium (Baharun *et al.*, 1996) montre que la fraction chloroformique est la plus riche en flavonoïdes (18.177 ± 0.156) dans les racines du *C. caeruleus*. Cependant, l'extrait d'acétate d'éthyle renferme plus de ces substances (19.601 ± 9.627) parmi les extraits de *T. communis*. Alors que la quantité est très faible dans les extraits bruts et aqueux des deux plantes.

Parejeo et ses collaborateurs (2003) ont dosé, par la méthode de Folin-Ciocalteu, les polyphénols totaux dans les différents extraits obtenus par une méthode d'extraction (l'extrait brut méthanolique fractionné par l'hexane, le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle, respectivement) proche de celle qu'on a utilisé dans notre étude. Ils ont trouvés que la teneur en polyphénols dans les extraits bruts des neuf plantes varie entre 32.2 et 269 mg EAG/g d'extrait (mg Equivalent Acide Gallique / g d'extrait), dans la fraction du dichlorométhane entre 24.5 et 173.8 mg EAG/g d'extrait, dans la fraction d'acétate d'éthyle entre 102.4 et 409.5 mg EAG/g d'extrait et dans la fraction aqueuse entre 71 et 211.5 mg EAG/g d'extrait. La comparaison entre la teneur en polyphénols dans les racines de nos plantes et les neuf plantes étudiées par Parejeo *et al.* (2003) nous a permis de déduire que les teneurs en polyphénols dans les différents extraits de *T. communis* et de *C. caeruleus* est relativement faibles par rapport aux neuf plantes. L'E.Ch de *T. communis* est riche en phénols en comparaison à l'extrait du dichlorométhane (solvant équivalent du point de vue polarité au chloroforme) de trois plantes parmi les neufs étudiées par Parejeo et ses collaborateurs. Il est

important de souligner que l'utilisation des parties différentes de plante (feuilles, fleurs, racines ou graines) et des différentes méthodes d'extraction et de dosage, rendent la comparaison difficile entre les deux études du fait que Parejeo et ses collaborateurs ont étudié la partie aérienne des neuf plantes.

La teneur en polyphénols et en flavonoides, peut diffère d'une espèce à une autre et d'un organe végétale à un autre, influencée par plusieurs facteurs tel que, le lieu géographique de cueillette, le stade de la croissance et les conditions de culture de la plante. Dixon *et al.*, (1995) et Nacz *et al.*, (2004), ont constaté que la synthèse et l'accumulation des polyphénols dans les plantes est généralement stimulé en réponse aux stress biotique / abiotique comme la salinité qui stimule la production des composés phénoliques (Navarro *et al.*, 2006), l'Ultraviolet (Winkel-Shirley, 2002), or les organes végétaux les plus exposés aux rayonnements UV sont les plus riches en flavonoides, tel que, les couches cellulaires épidermiques des feuilles, le pollen et le méristème apicale. Il y a aussi une nouvelle évidence qui annonce que les flavonoides interviennent dans la résistance à la toxicité par l'aluminium dans le maïs (Kidd *et al.*, 2001). Les racines de la plante des maïs qui sont exposées à l'aluminium présentent des quantités plus élevées en composés phénoliques et 15 fois plus élevées en flavonoides lorsque ces racines sont prétraitées par la silicone.

L'extraction des protéines par la méthode de (Mahmood *et al.*, 2003) et (Khan *et al.*, 2003) a montrer la pauvreté des racines des deux plantes en protéines avec une teneur double dans l'E.Pr de *T. communis*. L'électrophorèse en présence du (SDS-PAGE) a montré des différences dans les profils protéiques des deux extraits. Il est à noter que l'extrait protéique de *T. communis* présente trois protéines majeures avec les poids moléculaires suivants 38.000, 16.300, 14.400 KDa alors que l'extrait de *C. caeruleus* présente deux protéines majeures de 23.100 et 18.200 KDa.

III.2.2. L'activité antiradicalaire estimée par la méthode DPPH

La méthode DPPH est une méthode rapide, simple et non coûteuse pour mesurer la capacité antioxydante. Elle implique l'utilisation du radical libre, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Le DPPH est largement utilisé pour évaluer la capacité des composés agissant comme des scavengers des radicaux libres ou donateurs d'hydrogènes et pour évaluer l'activité antioxydante des aliments. Il a aussi été utilisé pour quantifier les antioxydants dans les systèmes biologiques complexes (Prakash, 2001).

D'après nos résultats nous remarquons que les différents extraits et les standards ont la capacité de réduire le radical libre DPPH de la couleur violette au radical stable jaune DPPH-H, d'une manière dose-dépendante. Tous les standards ont montrés un pouvoir scavenger du radical DPPH plus élevé que le BHT (contrôle positif). Ce résultat est en accord avec celui trouvé par Katalinic et ses collaborateurs (2004) qui ont trouvé que tous les standards examinés (catéchine, quercétine, vitamine C et Trolox) ont présenté des pouvoirs scavenger du radical DPPH exprimé en pourcentage d'inhibition (94.4 %, 95.3 %, 91.5 % et 92.63 % respectivement) plus élevé que le BHT qui a présenté un pourcentage d'inhibition de 49.2 %.

Les pouvoirs réducteurs des extraits E.Ch et E.Ac sont les plus importants parmi les quatre extraits de *T. communis*. Cet effet peut être expliqué par la présence de taux relativement élevés de flavonoïdes dans ces deux extraits en comparaison avec les extraits hydrosolubles qui en sont les plus pauvres. Cependant, les extraits hydrosolubles du *C. caeruleus L*, représentent des effets relativement plus élevés que l'E.Ac. La comparaison des effets scavengers des extraits de *T. communis*, a montré que les extraits insolubles dans l'eau, ont un pouvoir antiradicalaire plus puissant que les extraits hydrosolubles; cela indique l'existence d'une corrélation entre l'activité des extraits et leur contenu en composés phénoliques. Par contre, cette corrélation est absente dans le cas des extraits de *C. caeruleus* ou l'E.Br et l'E.Aq présentent un pouvoir scavenger du radical

DPPH plus élevé malgré leurs contenus très faibles en polyphénols et en flavonoïdes en comparaison avec l'E.Ac. On peut observer aussi que les extraits insolubles dans l'eau, de *T. communis* sont plus actifs que les extraits de *C. caeruleus*, alors que, les extraits hydrosolubles de *C. caeruleus* ont un pouvoir scavenger plus élevé que ceux de *T. communis*. En ce qui concerne les E.Pr des deux plantes et l'albumine bovine (standard), ont été précipités en contact du réactif DPPH. Cette observation a été constatée il y a presque 50 ans par Marsden Blois en 1958 (Molyneux, 2004). Il a découvert cette technique, en travaillant dans l'Université de Stanford (Blois, 1958). Il a noté que certains composés, tel que le cystéine, le glutathion, l'acide ascorbique, la Vitamine E, les flavonoïdes, les tanins, réduisent et décolorent le radical DPPH par leur capacité en donnant l'hydrogène (Blois, 1958; Yokozawa *et al.*, 1998). Cependant, les phénols monohydriques (comme tyrosine), les sucres simples (comme le glucose), purines et pyrimidines, ne réagissent pas avec le DPPH. Alors que les protéines se précipitent pendant la réaction avec le DPPH.

III.2.3. L'activité antioxydante estimée par la technique de la β -Carotène

Dans la technique de la β -Carotène, l'acide linoléique produit des hydroperoxydes comme des radicaux libres. La présence des antioxydants dans les extraits minimise l'oxydation de la β -carotène par les hydroperoxydes. De ce fait, le pouvoir antioxydant des extraits est traduit par leur capacité à stabiliser la β -Carotène contre l'oxydation par les hydroperoxydes. Par cette technique, tous les extraits et les standards ont exprimé une activité antioxydante faible que le BHT (Gulluce *et al.*, 2003 ; Sokmen *et al.*, 2004 ; Tepe *et al.*, 2005 ; Sahin *et al.*, 2004). Cependant, la rutine a montré le même effet que le BHT. L'ordre des antioxydants utilisés comme standard, en terme d'efficacité antioxydante, est le suivant : la rutine, le catéchine, l'acide caféique puis l'acide gallique. Tous les standards ont exprimé un pouvoir antioxydant plus puissant que les différents extraits des deux plantes.

Les extraits insolubles dans l'eau (E.Ch et E.Ac) de *T. communis* sont plus actifs que les extraits hydrosolubles, indiquant l'existence d'une corrélation entre le contenu en composés phénoliques et le pouvoir antioxydant. Cependant, cette corrélation est absente dans le cas des extraits du *C. caeruleus* où l'E.Br, l'E.Aq ont présenté des pouvoirs antioxydants plus importants que l'E.Ac ; qui est le plus riche en composés phénoliques. D' autre part, l'E.Ch de cette plante réserve le premier rang dans la série des extraits de cette plante, en terme d'activité antioxydante. Par cette technique, Othman et ses collaborateurs (2007) ont montré que les extraits hydrosolubles ont une activité antioxydante puissante que les extraits insolubles dans l'eau, malgré que la teneur en polyphénols, est plus élevée dans les extraits insolubles dans l'eau.

Les extraits protéiques des deux plantes ont présenté un effet antioxydant relativement importante, mais plus bas que les autres extraits.

III.2.4. Le pouvoir réducteur estimée par la technique FRAP

La technique FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) décrite initialement par Benzie et Strain (1996) et modifiée par Pulido *et al.* (2000), était développée pour déterminer la capacité des solutions fluides et aqueuses des molécules, à réduire le fer ferrique en fer ferreux. Dans la méthode originale de Benzie et Strain (1996), la réaction de la réduction du TPTZ-Fe³⁺ en TPTZ-Fe²⁺ est conduite pendant 4 minutes puisque la réaction, avec les substances utilisées, se stabilise après. Pulido et autres (2000) ont observé dans leur expérience sur les polyphénols, que la réaction de réduction ne se stabilise pas au cours des 4 minutes, l'absorbance augmente avec le temps, et de ce fait ils ont prolongé le temps de la réaction à 30 minutes tout en gardant la lecture à 4 minutes à des fins comparatives.

Généralement, les propriétés réductrices sont associées avec la présence de composés donneurs d'hydrogène, qui exercent leur action par rupture de la chaîne du radical libre (Gordon, 1990; Duh *et al.*, 1999). Cette réduction est rapide avec tous les réducteurs ayant des potentiels de la demi réaction de réduction supérieur à celui du couple Fe³⁺/Fe²⁺.

L'E.Ch du *T. communis* a montré un pouvoir réducteur plus puissant que tous les autres extraits de la même plante et de *C. caeruleus*. De la même façon que les deux premières techniques, l'E.Ch de *T. communis* est suivi par l'E.Ch de *C. caeruleus* puis l'E.Ac de *T. communis*. Les extraits hydrosolubles de *C. caeruleus* sont plus actifs que l'E.Ac de la même plante et que l'E.Br et l'E.Aq de *T. communis*.

L'ordre des antioxydants utilisés comme standard, en terme d'efficacité réductrice, est en accord avec les résultats de Pulido et ses collaborateurs (2000), qui ont montré que la quercétine représenté l'antioxydant le plus puissant parmi les onze standards utilisés suivi par l'acide tannique, l'acide gallique, l'acide caféique, le BHA, la rutine, Trolox, catéchine, l'acide ferulique, l'acide ascorbique et enfin le resviratrol. Dans notre étude l'ordre des standards est le suivant : la

quercétine > l'acide gallique > la rutine > l'acide ascorbique qui exerce son effet au cours des premières minutes. Les valeurs des EC1 par contre diffèrent en raison des conditions différentes des deux manipulations. Les résultats de cette étude ont montré que les polyphénols sont plus puissants que l'acide ascorbique et le Trolox, et que leur activité dépend de leur taux d'hydroxylation et de conjugaison. Divers autres études ont utilisé la technique FRAP pour évaluer le pouvoir antioxydant total des plantes comestibles (Soong et Barlow, 2004; Luczaj et Skrzydlewska, 2005; Nilsson *et al.*, 2004; Katalinic *et al.*, 2005).

Les protéines dans cette étude (E.Pr) réagissent lentement avec le complexe TPTZ-Fe³⁺, elles montrent un pouvoir réducteur relativement faible. Ou *et al.* (2002), ont annoncé que les thiols ne réagissent pas ou très lentement dans cet essai parce que leur potentiel de réduction est généralement inférieur à celui du couple Fe³⁺/Fe²⁺. D'autre part, Benzie et Strain, (1996) et Lotito et Frei (2004) ont constaté que cette technique est non adéquate pour la détermination de l'activité antioxydant de l'acide ascorbique, le glutathion et l'albumine qui sont concédés comme des antioxydants plus importants.

III.2.5. Relation entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits

A la lumière des différences entre le grand nombre de techniques disponibles, les résultats d'un seul essai ne peuvent donner que une simple suggestion des propriétés antioxydantes des extraits et doivent être interprétés avec prudence. De plus, la complexité chimique des extraits, souvent une mixture de douzaines de composés avec de groupes fonctionnels, des polarités et des comportements chimiques différents, pourrait causer des résultats dispersés, selon le test employé. Donc, une approche avec des techniques multiples dans la projection du travail est extrêmement conseillée (Tepe *et al.*, 2006). Parmi la variété de méthodes qui peuvent être utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante, (TEAC, TRAP, LDL, DMPD, FRAP, ORAC, DPPH, PCL, et β -carotène / acide linoléique) très peu d'entre eux (TEAC, DPPH, PCL) sont utiles pour déterminer

l'activité antioxydante d'espèces hydrophiles que lipophiles, en garantissant ainsi une meilleure comparaison des résultats et en couvrant une plus large gamme d'applications possibles (Sacchetti *et al.*, 2005).

Dans la présente étude, l'activité antioxydante des quatre extraits méthanoliques et de l'extrait protéique de nos plantes a été évalué par trois différents tests complémentaires : l'effet scavenger du DPPH, β -carotène / acide linoléique et la technique FRAP. En général, les différents extraits de *T. communis* et de *C. caeruleus*, essentiellement E.Ch et E.Ac ont montré une bonne activité antioxydante, scavengers du radical DPPH, neutralisants des hydro-péroxydes et de bons réducteurs du fer ferrique en fer ferreux, quand comparé aux antioxydants synthétiques comme le BHT, les polyphénols standards et l'acide ascorbique. De plus, il existe une bonne corrélation entre l'activité antioxydante des extraits du *T. communis* estimée par les trois techniques (DPPH, β -carotène et FRAP) et leurs teneurs en polyphénols et flavonoides. L'effet antioxydant des extraits des deux plantes peut donc être dû aux composés phénoliques et en particulier aux flavonoides.

De nombreuses études ont montré l'existence d'une corrélation positive entre l'activité antioxydante et antiradicalaire des extraits de plantes et leur contenu en composés phénoliques (Katalinic *et al.*, 2005 ; sokmen *et al.*, 2005 ; Parejo *et al.*, 2003). Kumaran et Karunakaran (2007) ont utilisé six techniques pour évaluer le pouvoir antioxydant des extraits méthanoliques de cinq espèces de *Phyllanthus* (*P. debilis*, *P. urinaria*, *P. virgatus*, *P. maderaspatensis*, *P. amarus*), et ils ont trouvé que les différents extraits ont la capacité scavenger du radical DPPH, le peroxyde d'hydrogène, l'oxyde-nitrique, l'anion superoxyde et de réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} . Egalement ils ont montré une corrélation entre ces activités et les polyphénols totaux des différents extraits. Ainsi, l'activité scavenger du radical DPPH d'extraits peut surtout être rattachée à leurs groupes phénoliques hydroxylés. Les composés phénoliques présents dans les extraits sont de bons donateurs d'électrons ; ils peuvent accélérer la conversion de H_2O_2 en H_2O (Ruch *et al.*, 1984). Comme ils ont la capacité réductrice. Nakagawa et Yokozawa (2002) ont montré que le thé vert

peut directement scavenger NO et $O_2^{\cdot -}$ et que son action est attribuée à ses composantes phénoliques.

Les polyphénols alimentaires ont un pouvoir de protéger des cellules de Mammifères et de bactérie de la cytotoxicité induite par le peroxyde d'hydrogène, surtout les composés avec la structure orthodihydroxy phénolique tel que, quercétine, catéchine, l'acide gallique et l'acide caféique (Nakayama, 1994; Nakayama, *et al.*, 1993). Cette information est confirmée clairement dans notre étude où tous les polyphénols standards testés (quercétine, rutine, catéchine, l'acide gallique et l'acide caféique) ont montré une activité antiradicalaire puissante par apport aux antioxydants synthétiques (BHT).

Barros *et al.* (2007) ont déterminé le pouvoir réducteur des extraits méthanoliques sur le fer ferrique en utilisant la méthode de Oyaizu (1986), ils ont utilisé les techniques du DPPH et de la β -carotène pour estimer l'effet scavenger des radicaux libres et l'effet neutralisant des hydroperoxydes, la quatrième technique élaborée permet d'évaluer le pouvoir de ces extraits à inhiber l'hémolyse des érythrocytes (Miki *et al.*, 1987). Barros et ses collaborateurs ont trouvé une forte relation entre ces activités et le contenu des extraits en polyphénols.

Les polyphénols et en particulier les flavonoïdes sont connus pour leur activité anti-oxydante en général et leur pouvoir piègeur du radical $O_2^{\cdot -}$, en particulier (Cos *et al.*, 1998). Le faible potentiel redox des flavonoïdes (Javanovic *et al.*, 1994) les rend thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants tel que le radical superoxyde. Le piégeage de ce dernier est d'une grande importance; ce radical ubiquitaire dans les cellules en aérobose est, à côté de sa haute réactivité, un précurseur potentiel du radical hydroxyle hautement destructeur (Grisham et Granger, 1988). Plusieurs recherches ont été consacrées pour l'étude de l'activité antioxydante des flavonoïdes (Kim *et al.*, 2001 ; La Casa *et al.*, 2000 ; Montoro *et al.*, 2005 ; Rice-Evans, 2001 ; Schroeter *et al.*, 2001 ; Schubert *et al.*, 1999 ; Zhao *et al.*, 2004). Dans une étude importante, Firuzi

et ces collaborateurs (2005), ont estimé l'activité antioxydante des flavonoides par la technique FRAP, les flavonoides étudiés appartiennent à différentes classes (Flavones, flavanols, flavanones, flavanols, isoflavones). L'activité de ces flavonoides est comparée à celle du Trolox, l'acide urique et le resviratrole. Les différents flavonoides testés ont montré une bonne activité en comparaison aux antioxydants connus (resveratrole, Trolox et l'acide urique), avec l'existence d'une corrélation linéaire entre l'activité FRAP et la concentration de ces flavonoides. Cette observation est supportée aussi bien par Pulido et ses collaborateurs (2000).

En utilisant la technique du DPPH, Okawa et ses collaborateurs (2001) ont étudié l'activité antioxydante de 27 flavonoides purifiés à partir différentes plantes. Ces flavonoides appartiennent à cinq sous classes ; sept flavones C-glycosides, un flavone (baicaline), trois flavanols (quercétine, kaempferol et la rutine), quatre flavanols (gallocatéchine, epicatéchine), trois isoflavones et deux flavonolignans. Les résultats obtenus par Okawa et ses collaborateurs ont montré que les flavanols ont la plus forte activité antiradicalaire que les flavonoides des autres sous classes testées. Les IC_{50} ont été entre 6.9 et 11.7 μM , suivi par les flavanols (IC_{50} = 8.9 – 41.2 μM), puis les flavones de groupe Sinapoyl et Feruloyl et le baicaline (IC_{50} = 15.5 -51.1 μM). Les flavonoides restants ont une faible activité (IC_{50} = 188 -> 1000 μM). Ils ont constaté que plus la molécule est riche en groupements hydroxyles plus l'activité anti- DPPH est forte, mais le nombre des -OH n'est pas important dans tous les cas. Malgré isovitexine possède trois groupements -OH, il ne montre aucune activité (IC_{50} >1000 μM) alors que le baicaline ne contient aucun -OH dans le cycle B, il montre un effet scavenger plus puissant que les autres flavones testés (IC_{50} = 15.5 μM). Aussi le procyanidine C-1 contient un grand nombre des -OH que l'épicatéchine mais ce dernier révèle un pouvoir réducteur du DPPH plus fort que le premier. Okawa et ses collaborateurs ont conclu que la position des groupements hydroxyles a la grande importance dans l'activité scavenger du DPPH.

Les flavonoides peuvent exercer ces activités antioxydantes par plusieurs méthodes (Tripoli *et al.*, 2007) : (1). Activité antiradical OH^\cdot (hydroxyl), O_2 , $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ (superoxyde); (2). Activité antilipoperoxydation (R^\cdot , ROO^\cdot , RO^\cdot); (3). Activité de chélation des métaux.

De nombreuses études cinétiques sur les réactions de formation et de décomposition du radical aroxy ont démontrés que la capacité antioxydante des flavonoides est associée à leurs structures chimiques particulières. Trois groupes structurels sont importants dans l'évaluation de la capacité antioxydante des flavonoides (Tripoli *et al.*, 2007): (A) la structure ortho-dihydroxy (catechol) dans le noyau B qui confère une grande stabilité au radical aroxy ; (B) La double liaison 2-3 conjuguée à une fonction 4-oxo, responsable de la dislocation des électrons de noyau B et (C) La présence de deux groupements hydroxyle 3-(a) et 5-(b) ensemble. C'est évident que la capacité antioxydante des flavonoides est associée à ces éléments de structure chimique, par exemple la présence ou l'absence d'un glycoside (glycosides or aglycones) et la présence des hydroxyles libres ou le nombre et la position des hydroxyles sont éventuellement estérifiés.

III.2.6. L'activité antibactérienne

Dans la présente étude, les activités des extraits méthanoliques, des extraits protéiques, des standards et des huiles essentielles extraites à partir des racines du *T. communis* et du *C. caeruleus* contre neuf souches bactériennes, *Staphylococcus aureus* ATCC 2592 3, *Bacillus sp*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Serratia marcescens*, et leurs puissances, sont qualitativement et quantitativement réparties par la présence ou l'absence d'une zone d'inhibition. Ces zones d'inhibition sont comparées à celles des antibiotiques standard cités dans le (Tableau 09, section résultats).

III.2.6.1. L'activité antibactérienne des extraits méthanoliques et protéiques

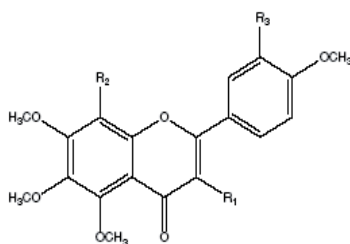
L'application des différents extraits méthanoliques testés sur trois souches bactériennes de référence et six souches de prélèvements divers, a montré que les deux fractions insolubles dans l'eau sont les seuls qui ont présenté une activité contre quelques souches bactériennes des deux Gram, positif et négatif, dans la mesure où l'E.Ch des deux plantes, riche en flavonoïdes aglycones, possède le spectre d'activité le plus large car ils exercent une action inhibitrice sur la croissance de quatre souches bactériennes ; *S. aureus*, *Bacillus sp*, *E. agglomerans* et *S. marcescens*, inhibées par l'E.Ch du *T. communis* avec des zones d'inhibition (14, 10, 14 et 12 mm respectivement), alors que ; *S. aureus*, *E. Coli*, *Bacillus sp* et *K. pneumoniae* ont été inhibées par l'E.Ch du *C. caeruleus* avec des zones (15, 18, 09 et 09 mm respectivement). Ces résultats sont comparables à ceux trouvés par Sokmen et ses collaborateurs (2003), qui ont montré que l'extrait chloroformique de *Achillea sintenisii* avait une activité sur *Staphylococcus aureus* (10 mm), sur *Escherichia coli* (11 mm) et sur *Klebsiella pneumoniae* (11 mm), au temps que la fraction polaire n'a aucun effet sur les différentes souches testées. Ali-Emmanuel *et al.*, (2002), ont montré que les extraits alcooliques des trois plantes *Cassia alata*, *Lantana camara* et *Mitracarpus scaber*, sont plus actifs que les extraits aqueux, contre *Dermatophilus congolensis* isolé au Bénin. Ils ont expliqué ces résultats par la

différence de composition entre les deux extraits, or l'alcool permettant une meilleure extraction de composés moins polaires. D'autre part, l'E.Ch du *C. caeruleus* a présenté une action inhibitrice plus importante sur *E. coli* en provoquant une zone d'inhibition de 18 mm. Cette activité peut être due à la présence importante des composés phénoliques et des flavonoïdes dans ces extraits. Parmi les différents standards testés, l'activité antibactérienne la plus importante a été révélée par l'acide gallique et ce vis-à-vis des différentes souches bactériennes surtout sur les deux souches à Gram⁺ ; *S. aureus* et *Bacillus sp.* Sharififar *et al.*, (2007), ont testé l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques polaires et non polaires fractionnés par le chloroforme sur neuf souches bactériennes ; *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens* et *Shigella flexneri*. Ils ont montré que les extraits chloroformiques (non-polaires) sont effectifs contre les souches à Gram négatif (*Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*), mais l'inhibition la plus puissante a été contre le *Staphylococcus aureus*, ces résultats sont en accord avec ceux de notre étude. Ils ont constaté que l'activité antibactérienne des extraits doit être attribuable à la présence de plusieurs types de composés appartenant à différentes classes, tel que les flavonoïdes (Guillen et Manzanos, 1998).

Les activités antibactériennes des extraits insolubles dans l'eau (E.Ch, E.Ac) des deux plantes et les activités des standards (A. gallique, Rutine et Quercétine) sur les souches bactériennes testées, sont comparables aux activités des antibiotiques utilisés comme contrôle positif. La plupart des antibiotiques examinés ont montré une action inhibitrice contre une, deux ou quatre souches, alors que d'autres antibiotiques n'ont aucun effet contre toutes les souches bactériennes (**Tableau 09, section résultats**). Les cinq antibiotiques avec le large spectre d'activités antibactériennes (Nib, Néo, PB, Dot et Cmp) dans ce teste, ont provoqué des zones d'inhibition ne dépassent pas 23 mm de diamètre (**Tableau 09, section résultats**).

Les flavonoïdes ont été reportés surtout pour leurs propriétés bactériostatiques modérées, par exemple, la concentration inhibitrice minimale (MIC) évaluées pour le myricétine contre

Staphylococcus aureus, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* sont établies d'être 125, 256 et 64 µg/ml, respectivement (Xu et Lee, 2001 ; Ohemeng *et al.*, 1993). Tripoli et ses collaborateurs (2007), ont constaté que la structure du flavonoïde joue un rôle très important dans leur activité, or les flavonoïdes aglycones sont plus actifs contre les souches bactériennes que les flavonoïdes glycosylés. Plusieurs flavones polyméthoxylés (**Figure 23**), ont été trouvés fortement inhibitrices des lipopolysaccharides bactériennes induisant l'expression du TNF- α , tandis que les flavonoïdes glycosylés ont été inactifs (Manthey *et al.*, 1999). En particulier, l'hespéridine possède une activité inhibitrice significative dans l'inflammation, car il est capable de réduire les lipopolysaccharides et les infections induisant la production du TNF- α et inhibe l'infection induisant un choc léthal. Hespéretine (le hespéridine glycosylé), possède une activité antibactérienne modérée contre le *Salmonella typhi* et *S. typhimurium* (Kawaguchi *et al.*, 2004).



R1	R2	R3	
H	H	H	Scutellarein
H	H	OCH3	Sinensetin
H	OCH3	H	Tangeretin
OCH3	H	OCH3	Hexamethoxyflavone
H	OCH3	OCH3	Nobiletin
OCH3	OCH3	OCH3	Heptamethoxyflavone

Figure 23 : Flavones polyméthoxylés.

III.2.6.2. L'activité antibactérienne des huiles essentielles

A. Extraction des huiles essentielles

La teneur des huiles essentielles trouvées dans les racines des deux plantes est presque la même. Ces rendements sont considérés comme faibles mais comparables aux valeurs obtenues par Saroglou *et al.* (2006), de huit espèces d'*Anthemis* qui ont été très faibles; 0.66 % pour *A. chia*, 0.012 % pour *A. tomentosa*, 0.007 % pour *A. auriculata*, 0.028 % pour *A. wernerii*, 0.047 % pour *A. altissima*, 0.011 % pour *A. melanolepis*, 0.096 % pour *A. tinctoria* et 0.028 % pour *A. cotula*. De même les rendements obtenus des fleurs, des feuilles et des tiges d'*A. altissima* sont 0.03 %, 0.05 % et 0.01%, respectivement (Javidnia *et al.*, 2004).

Des valeurs relativement supérieures sont obtenues par Uzel *et al.* (2004) à partir de différentes parties d'*A. xylophora* : un rendement de 0.54 % à partir des fleurs, 0.38% à partir des feuilles. La partie aérienne d'*A. triumfetti* a fourni un rendement de 0.4 % (Pavlovic *et al.*, 2006). Omoto *et al.*

(1998) ont obtenu un rendement en huile pour *A. nobilis* de 0.5 %. Le rendement des feuilles et des fleurs d'*A. altissima* est de 0.6% (Abdolhossein *et al.*, 2004). La valeur du rendement obtenue par Aghajani *et al.* (2005) à partir de la partie aérienne d'*A. talyshensis* reste la plus élevée par rapport aux résultats qui nous sont disponibles (0.8%).

Ces différences sont dues, selon Haeckel et Omar (1993), à plusieurs facteurs: la technique d'obtention, les facteurs environnementaux (la température et l'humidité), l'espèce végétales elle-même, l'organe végétal, la période et le lieu géographique de cueillette, Le stade de la croissance et les conditions de culture de la plante. Des études sur *Mentha piperita L.* ont montré que la lumière stimule la production des huiles essentielles et que l'obscurité a diminuer le rendement en huiles volatiles de 1.43 % à 1.09 %. De même, le pourcentage du menthol dans l'huile essentielle est diminuer de 61.8 % à 57.5 %. L'irrigation a un effet positif sur la croissance végétative. Il est démontré que l'insuffisance ou l'excès d'eau a un effet négatif sur le rendement en huiles essentielles. Le pourcentage de l'huile volatile est passé de 1.4 % (pendant la période des jours longs) à 0.7 % (pendant la période des jours courts) (El-Zakhem, 2003).

B. L'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle brut de *T. communis* testée sur trois souches de référence et six souches de prélèvements divers, a été relativement significative contre sept souches bactériennes parmi les neuf testées. Cette activité est traduite par des zones d'inhibition d'un diamètre de : (25 mm) sur *Bacillus sp*, (24 mm) sur *S. aureus*, (21 mm) sur *C. freundii*, (19 mm) sur *E. agglomerans*, (19 mm) sur *K. pneumoniae*, (24 mm) sur *E. coli* et (20 mm) sur *S. typhi* (**Figure 22, section résultats**). Les bactéries à Gram-positif ; *Bacillus sp* et *S. aureus*, présentent la plus grande sensibilité aux huiles essentielles de *T. communis* avec des zones d'inhibition de 25 et 24 mm, respectivement. Cependant, les deux souches bactériennes *P. aeruginosa* et *S. marcescens*, ont montré une résistance aux huiles essentielles des deux plantes.

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle brute de *T. communis* est comparable aux activités de l'huile brute de *Satureja hortensis* étudiée par Gulluce *et al.* (2003), qui a été active sur vingt-trois souches bactériennes. Les zones d'inhibition contre les bactéries testées dans cette étude, ont été : (21 – 26 mm) sur cinq espèces du genre *Bacillus*, (13 mm) sur *Escherichia coli*, (23 mm) sur *Klebsiella pneumoniae*, (27 mm) sur *Pseudomonas aeruginosa* et (22 mm) sur *Staphylococcus aureus*.

L'huile essentielle de *C. caeruleus* a montré un effet relativement faible contre six souches bactériennes, où les zones d'inhibition ne dépassent pas 10 mm de diamètre (**Tableau 08, section résultats**). Cet huile avait des activités sur *S. aureus* (10 mm), sur *Bacillus sp* (09 mm), sur *E. coli* (08 mm), sur *S. typhi* (08 mm), sur *K. pneumoniae* (08 mm) et sur *Citrobacter freundii* (09 mm). Ces résultats sont comparables avec ceux trouvés par Tepe et ses collaborateurs (2004) sur l'huile de *Salvia cryptantha* et l'huile de *Salvia multicaulis*. Ils ont trouvé que les activités de ces huiles essentielles ont été comme suit : l'huile de *Salvia cryptantha* avait une activité sur *Staphylococcus aureus* (09 mm) et sur *Klebsiella pneumoniae* (09 mm), mais n'ont aucun effet sur *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* et sur *Pseudomonas aeruginosa*. En ce qui concerne l'huile de *Salvia multicaulis*, elle avait une activité sur *Staphylococcus aureus* (09 mm), sur *Bacillus cereus* (10 mm), sur *Klebsiella pneumoniae* (09 mm) et sur *Escherichia coli* (08 mm) et non effective contre *Enterobacter aerogenes* et *Pseudomonas aeruginosa*. Aussi, Sokmen et ses collaborateurs (2003), ont trouvé que l'huile brut d'*Achillea sintenisii* de la même famille de *C. caeruleus* (Asteraceae), n'a aucun effet sur *Escherichia coli* et sur *Pseudomonas aeruginosa* et avait un effet faible sur *Staphylococcus aureus* (10 mm), sur *Bacillus cereus* (09 mm), sur *Klebsiella pneumoniae* (08 mm) et sur *Enterobacter aerogenes* (07 mm).

Les huiles essentielles du *C. caeruleus*, ont montré un effet plus ou moins important En comparaison avec les antibiotiques qui n'ont aucun effet (Pen et Lin) ou agissent sur une ou deux souches bactériennes parmi les neuf examinées (AMC, CZ, CTX, Suf) (**Tableau 09, section**

résultats). Tandis que, les huiles essentielles du *T. communis*, ont présenté une action inhibitrice significative par rapport aux différents extraits, les standards et les antibiotiques examinés (**Figure 22**).

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et les possibles effets synergiques entre les composants. Ainsi la nature des structures chimiques qui la constituent, mais aussi leurs proportions jouent un rôle déterminant (Pibiri, 2006). Plusieurs études ont montré les dommages de cellules de quelques microorganismes en citant : *Staphylococcus aureus* en contact avec des huiles essentielles riches en monoterpénols et en phénols (Franchomme et Pénéol, 1990), des cellules d'*Escherichia coli* visiblement très endommagées par l'Origan compact qui collapsent après 1 minute de contact (Burt et Reinders, 2003) et la lyse de cellules fongiques provoquée par la Citronnelle de Java, *Cymbopogon nardus* (Pibiri, 2006).

Les phénols sont responsables de dégâts irréversibles au niveau de la membrane. Le thymol et l'eugénol sont responsables de l'activité fongicide (Bennis et Chami, 2004) et bactéricide des huiles essentielles qui en contiennent (Cox *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2003). La molécule de thymol a un effet inhibiteur et létal sur diverses souches, dont *Echericha coli* et *Staphylococcus aureus*, sur lesquelles elle provoque des fuites d'ions potassium K⁺. En revanche elle n'est pas active sur *Pseudomonas aeruginosa* (Walsh *et al.*, 2003). Plus les teneurs en phénols sont élevées, plus les huiles essentielles sont efficaces (Cosentino *et al.*, 1999). Cependant les phénols ne sont pas les seuls responsables de l'intégralité de l'activité ; la totalité de la composition chimique doit être prise en compte (Co sentino *et al.*, 1999).

Chaque souche de microorganisme répond de manière variable aux différents composés des huiles essentielles, mais il a été souligné dans plusieurs études que les bactéries Gram (+) semblent

plus sensibles que les bactéries Gram (-) (Hulin *et al.*, 1998; Holley et Patel, 2005). La susceptibilité des bactéries est en effet indépendante du Gram (Dorman et Deans, 2000), et dépend des huiles essentielles utilisées (Deans et Ritchie, 1987). Il semblerait tout de même qu'en règle générale, les bactéries à Gram négatif soient plus résistantes aux huiles essentielles. Ces résultats sont confirmés par de nombreuses expériences (Cosentino *et al.*, 1999). Comme il a été rapporté auparavant, le mode d'action principal des huiles essentielles consiste en la lyse de la paroi bactérienne du fait de leurs propriétés lipophiles. La paroi des bactéries à Gram (-) est plus épaisse, elle est constituée de deux membranes plasmiques séparées par une couche de peptidoglycane, alors que celle des bactéries à Gram (+) est formée d'une seule membrane cellulaire et une couche de peptidoglycane. Les antibiotiques sont, également, plus actifs sur les bactéries Gram (+) que sur les bactéries G (-) (Perry *et al.*, 2004).

Conclusion

Dans ce présent travail, on s'est intéressé aux effets anti-oxydants et antibactériens des racines de *T. communis* L et *C. caeruleus* L. En ce qui concerne l'activité antioxydante, trois techniques ont été examinées; test du DPPH, test de β -carotène / acide linoléique et la technique FRAP. Dans tous les tests réalisés, on a remarqué l'existence d'une corrélation significative entre l'activité des extraits méthanoliques et leurs teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes. Par les trois techniques les extraits (E.Ch/Tc, E.Ac/Tc et E.Ch/Cc) dans cet ordre représente les fractions les plus actives parmi tous les extraits testés, sans négliger les effets, les plus ou moins importants des autres fractions. Ces activités sont attribuées des polyphénols et en particulier des flavonoïdes qui peuvent exercer leur activité antioxydante via plusieurs manières. Notre étude confirme cette puissante activité antioxydante de quelques polyphénols et flavonoïdes tel que l'acide gallique, catéchine, acide caféique, quercétine et rutine.

Nous avons testé l'activité antibactérienne *in vitro* des extraits méthanoliques, des extraits protéiques et des huiles essentielles à partir des racines des deux plantes *T. communis* et *C. caeruleus* et ce ci sur trois souches ATCC (*S. aureus* ATCC 2592 3, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853) et sur six souches de prélèvements (*Bacillus* sp, *S. typhi*, *K. pneumoniae*, *E. agglomerans*, *C. freundii*, *S. marcescens*). Les résultats ont montré que les deux extraits insolubles dans l'eau (E.Ch et E.Ac) sont les seuls qui ont présenté une activité contre des souches bactériennes des deux Gram, positif et négatif, dans la mesure où l'E.Ch des deux plantes, riche en flavonoïdes aglycones, possède le spectre d'activité le plus large. Les huiles essentielles de *C. caeruleus* ont montré des activités assez intéressantes sur les bactéries testées. Tandis que, les huiles essentielles de *T. communis* se sont montrées très active sur les bactéries des deux Gram.

Parmi les perspectives immédiates de cette étude est de déterminer une valeur de concentration bactéricide minimale des échantillons, d'évaluer la cytotoxicité des huiles sur des modèles animales

et de faire des tests complémentaires sur d'autres souches bactériennes, des champignons microscopiques et des virus.

Il serait intéressant de faire l'analyse chimique des huiles essentielles et de réaliser les essais avec des phénols synthétiques, thymol et carvacrol, et comparer leurs activités avec celles des huiles essentielles.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdolhossein, A., Azar, P. A., Mehran, M., Shiva, M., Nazak, A. (2004). Volatile constituents of three compositae herbs: *Anthemis altissima* L. var. *altissima*, *Conyza canadensis* (L.) Cronq. and *Grantina aucheri* Boiss. growing wild in Iran. *J. of Essent. Oil Res.* **16**: 579–581.
- Acar, J., Rostel, B. (2001). Antimicrobial resistance: An overview. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **20** (3): 797–810.
- Aghajani, Z., Masoudi, S., Abdolhossein, R. (2005). Volatile oils of *Anthemis talyshensis* and *Sclerorhachis platyrachis* Boiss. from Iran. *J. Essent. Oil Res.* **17** : 355–357.
- Ahmad, I., Aqil, F. (2007). In vitro efficacy of bioactive extracts of 15 medicinal plants against ESBL-producing multidrug-resistant enteric bacteria. *Microbiological Research.* **162**: 264–275.
- Ali-Emmanuel, N., Moudachirou, M., Akakpo, A. J., Quetin-Leclercq, J. (2002). Activités antibactériennes in vitro de *Cassia alata*, *Lantana camara* et *Mitracarpus scaber* sur *Dermatophilus congolensis* isolé au Bénin. *Pathologie Infectieuse Communication.* **55** (3) : 183–187.
- Allen, U., Dobson, R. S., Embree, J., Langley, J., Moore, D., Pekeles, G., Samson, L. É., Harsany, R., MacDonald, N., Halperin, S., Naus, M., Pickering, L., (2006). Les produits antimicrobiens à domicile : Le problème de l'antibiorésistance. *Paediatr Child Health.* **11** (3): 177–182.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. (1996). DNA damage by endogenous oxidants and mitogenesis as causes of aging and cancer. In *Molecular Biology of Free Radical Scavengers System* (JG Scandalios, ed), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY. 1–22.
- Aquino, R., Behar, I., Simone, F., Pizza, C., (1985 b). Natural dihydrophenantrene derivatives from *Tamus communis*. *J. Nat. Prod.* **48**: 811–813.
- Aquino, R., Behar, I., Simone, F., Pizza, C., Senatoe, F., (1985 a). Phenanthrene derivatives from *Tamus communis*. *Biochem. Syst. Ecol.* **13**: 251–252.
- Aquino, R., Conti, C., Simone, F., Orsi, N., Pizza, C., Stein, M.L. (1991). Antiviral activity of constituents of *Tamus communis*. *J. Chemother.* **3**: 305–309.
- Ardestani, A., Yazdanparast, R. (2006). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chemistry.*
- Asmus, K. D, Bonifacic, M. (2000). Free radical chemistry. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O, editors. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Amsterdam: Elsevier. p. 3–53.
- Azzi, A., Davies, K. J. A., Kelly, F. (2004). Free radical biology- terminology and critical thinking. *FEBS Letters.* **558**: 3–6.
- Bagchi, D., Kuszynski, C., Balmoori, J., Bagchi, M., Stohs, S. J. (1998). Hydrogen peroxide-induced modulation of intracellular oxidated states in cultured macrophage J774A. 1 and neuroactive PC-12 cells, and protection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Phytother Res.* **12**: 568–571.

- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Din, T., Vasseur, J., Gazin, J. C. Pinkas, M., Luyckx, M., Gazin, M. (1996). Oxygen species scavenging activity of pharmaceutical preparation. *Arzneimittel forschung /Drug Research*: 1–6.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*. **46**: 446–475.
- Baril, D. (2007). Les oncogènes brisent la molécule d'ADN : Une découverte de Gerardo Ferbeyre permet de mieux comprendre un mécanisme naturel de protection contre le cancer. *FORUM* : **41(17)**.
- Barros, L., Ferreira, M. J., Queiros, B., Ferreira, C. F. R. I., Baptista P. (2007). Total phenols, ascorbic acid, b-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. **103**: 413–419.
- Belaiche. (1979). *Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie*. Tome I, L'Aromathérapie. Maloire S.A., Paris.
- Benkrief, R., Brum, B. M., Tillequin, F., Koch, M. (1990). Alcaloides et flavonoides des parties aériennes de *Hammada articulata* ssp. *Scoparia*. *Ann Pharmaceutiques Française*. **48 (4)**: 219–224.
- Bennis, S., Chami, F. S. (2004). Surface alteration of *Saccharomyces cervisiae* induced by thymol and eugenol. *Letters in Applied Microbiology*. **38**: 454–458.
- Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem*. **239**: 70–76.
- Betts, T. J. (2001). Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. *J. Chromatogr. A* **936**: 33–46.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. **181**: 1199–1200.
- Bloomfield, S.F. (2002). Significance of biocide usage and antimicrobial resistance in domiciliary environments. *J Appl Microbiol*. **92** Suppl: 144S–57S.
- Borrel, T. (2000). *Les infections nosocomiales, cours Maladie. L'homme et son environnement*. Université Lumière Lyon II.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Method Enzymol*. **186**: 343–355.
- Bouhdid, S., Idaomar, M., Zhiri, A., Baudoux, D., Skali, N. S., Abrini, J. (2006). *Thymus* Essential Oils: Chemical Composition and *in vitro* antioxidant and antibacterial activities. *Biochimie, Substances Naturelles et Environnement*. Pp : 324–327.
- Boullard, B. (2001). *Plantes Médicinales Du Monde (Réalités & Croyances)*, ESTEM, ISBN 2 84371 1177. pp 515 – 516.

- Boumerfeg, S., Baghiani, A. R., Messaoudi, D., Khennouf, S., Arrar, L. (2009). Antioxidant Properties and Xanthine Oxidase Inhibitory Effects of *Tamus communis* L. Roots. *Phytother. Res.* **23**:
- Boveris, A., Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* **134** : 707–716.
- Bowles, E. J. (2003). Chemistry of Aromatherapeutic Oils. Allen & Unwin, ISBN 174114051X.
- Bruneton, J. (1987). Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie. Technique & Documentation Lavoisier, Paris.
- Bruneton, J. (1993). Composés phénoliques: Shikimate-acétates. In: « Pharmacognosie : phytochimie, Plantes médicinales ». *Technique et Documentation-Lavoisier* (Paris) ; Chap. 3 : 199–383.
- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème Ed Tec&Doc. Paris: 309–353.
- Burits, M., Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research.* **14**: 323–328.
- Burt, S. A., Reinders, R. D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology.* **36(3)**: 162–167.
- Capasso, F., Simone, F., Senatore, F. (1983). Sterol constituents of *Tamus communis* L. *J. Ethnopharmacol.* **8**: 327–329.
- Carr, A. C., Zhu, B. Z., Frei, B. (2000). Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circ Res.* **7(5)**: 349–354.
- Carson, C. F., Riley, T. V. (1995). Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Malaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology.* **78**: 264–269.
- Cermak, R., Follmer, U., Wolffram, S. (1998). Dietary flavonol quercetin induces chloride secretion in rat colon. *Am J Physiol.* **275**: G1166–G1172.
- Chen, K., Suh, J, Carr, A. C., Morrow, J. D., Zeind, J., Frei, B. (2000). Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **279(6)**: 1406–1412.
- Cheung, T.K., Chu, Y.W., Chu, M.Y., Ma, C.H., Yung, R.W., Kam, K.M., 2005. Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Hong Kong. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**: 586–589.
- Coraline, B., Aurélie, B., Tanguy, C., Aurélie, L. G. (2006). Les Huiles Essentielles. *U.C.O Bretagne Nord*.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A. V., Berghe, D. K. (1998) Structure-activity relationship and classification of flavonoids as

- inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod.* **61**: 71–76.
- Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Lett Appl Microbiol.* **29**(2): 130–135.
- Cotelle, N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem.* **1**: 569–590.
- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology.* **88**(1): 170–175.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists.
- Cuended, M., Hostettmann, K., and Potterat, O. (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *fagrava blumei*. *Helvetica chimica acta.* **80**: 1144–1152.
- Cushnie, T. P., Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents.* **26**: 343–56.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T. A., and Linssen, P. H. (1998). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the science of food and agriculture.* **77**: 140–146.
- Davies, K. J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life.* **50**: 279–89.
- Day, A. J., Williamson, G. (1999). Human metabolism of dietary quercetin glycosides. In: “Plants polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology”. Eds. Gross et al. *Kluwer Academic* (New York): 415–434.
- De Carlo, G., Autore, G., Izzo, A. A., Maiolino, P., Mascolo, N., Viola, P., Diurno, M. V., Capasso, F. (1993). Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats : structure-activity relationships. *J Pharm Pharmacol.* **45**(12): 1054–1059.
- De Groot, H., Rauhen, U. (1998). Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharm.* **12**: 249–255.
- De Whalley, C. V., Rankin, S. M., Hault, J. R. S., Jessup, W., Leake, D. S. (1990). Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem Pharmacol.* **39**: 1743–1750.
- Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M. J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* **324**(Pt 1): 1–18.
- Deans, S. G., Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology.* **5**: 162–180.
- Didry, N., Dubreuil, L. (1993). Activité antibactérienne du thymol, du carvacrol et de l'aldehyde

- cinnamique seuls ou associés. *Pharmacize*. **48**(H4): 301–304.
- Dorman, H. J. D., Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. **88**(2): 308–316.
- Duh, P. D., Du, P. C., Yen, G. C. (1999). Action of methanolic extract of mung hulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology*. **37**: 1055–1061.
- Duke, J.A., (2002). *Handbook of Medicinal Herbs*. CRC Press, London.
- Edeas, M. (2006). Les antioxydants. PepsiCo France 1 place de la Boule 92024 Nanterre cedex.
- El Zakhem, M. (2003). Effets antifongiques des huiles essentielles extraites de *Origanum syriacum* L. et de *Salvia libanotica* Boiss et Gaill contre les *Candida* : *albicans*, *holmii*, et *famata*. Mémoire de Diplôme d'Études Approfondies (DEA) en Agroalimentaire et Assurance-Qualité. Institut National Agronomique Paris-Grignon (INA-PG).
- Falquet, J., Hurni, J.P. (2006). Spiruline Aspects Nutritionnels. Antenna Technologies.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Actualité chimique. Mécanismes biochimiques. 108–115.
- Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., Saso, L. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by ferric reducing antioxidant powerQ assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1721**: 174–184.
- Fleurette, J., Freney, J. (1995). Antiseptie et désinfection.
- Forkmann, G. (1993). Biosynthesis and biodegradation of polyphenols. In: “polyphenolic phenomena”. Ed. Scalbert A. *INRA* (Paris). Chap 2: 65–71.
- Formica, J. V., Regelson, W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*. **33**(12): 1061–1080.
- França, M. B., Panek, A. D., Eleutherio, E. C. A. (2007). Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A. **146**: 621–631.
- Franchomme, P., Pénoël, D. (1990). Clefs pour l'aromathérapie. La molécule aromatique: matière, énergie, information. L'aromathérapie exactement. R. J. Editeur. Limoges. **2**: 73–227.
- Fraschini, F., Demartini, G., Esposti, D. (2002). Pharmacology of silymarin. *Clin Drug Invest*. **22**: 51–65.
- Gafner, S., Wolfender, J. L., Mavi, S., Hostettmann, K. (1996). Antifungal and antibacterial chalcones from *Myrica serrata*. *Planta Medica*. **62**: 67–69.
- Gamet, Payrastra L., Manenti S., Gratacap MP., Tulliez J., Chap H., Payrastra B. (1999). Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *General Pharmacology*. **32**. 279–286.
- Garcia-Viguera, C., Bridle, P., Ferreres, F., Tomas, B. F. A. (1994). Influence of variety, maturity

- and processing on phenolic compounds of apricot juices and jams. *Z Lebensm Unters Forsch.* **199**: 433–436.
- Garo, E., Maillard, M., Antus, S., Mavi, S., Hostettmann, K. (1996). Five flavans from *Mariscus psilostachys*. *Phytochemistry*. **43**: 1265–1269.
- Ghestem A., Seguin E., Paris M. et Orecchioni A.M. (2001). Le préparateur en pharmacie, dossier 2, Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie, Homéopathie. Ed. TEC et DOC.
- Giasson, B. I., Duda, J. E., Murry, I. V. J. (2000). Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science*. **290**: 985–989.
- Gordon, M. H. (1990). The mechanism of antioxidant action in-vitro. In B. J. F. Hudson (Ed.), *Food antioxidants* (pp. 1–18). London: Elsevier Applied Science.
- Graham, H. D. (1992). Modified Prussian Blue assay for total phenols. *Journal of Agricultural and food chemistry*. **40**: 801–805.
- Granger, D. N. (1988). Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia reperfusion injury. *Am.J. Physiol.* **255**: 1269–1275.
- Granger, D.N., Rutili, G., Mc Cord, J. M. (1981). Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*. **81**: 22–29.
- Grayer, R. J., Harborne, J. B., Kimmins, E. M., Stevenson, F. C., Wijayagunasekera, H. N. P. (1994). Phenolics in rice phloem sap as sucking deterrents to the brown plant hopper *Nilaparvata lugens*. *Acta Horticulturae*. **381**: 691–694.
- Griffin, S. G., Wyllie, S. G. (1999). The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*. **14**: 322–332.
- Grisham, M. B., Granger, D. N. (1988) Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. *Dig Dis Sci*. **33**: 6S–15S.
- Gryglewski, R. J., Korbut, R., Robak, J., Swies, J. (1987). On the mechanism of anti-thrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol*. **36**: 317–322.
- Guillen, M. D., Manzanos, M. J. (1998). Composition of the extract in dichloromethane of the aerial parts of a Spanish wild growing plant *Thymus vulgaris* L. *Flavour and Fragrance Journal*. **13**: 259–262.
- Gulluce, M., Sokman, M., Daferera, D., Agar, G., Ozkan, H., Kartal, N., polissiou, M., Sokmen, A., Sahin, F. (2003). In vitro antibacterial, Antifungal, and Antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *satureja hortensis* L. *Journal of Agricultural and food chemistry*. **51**: 3958–3965.
- Gumowski, P. I., Grange, F. (1987). Asthmes intrinsèques et réactivité aspécifique aux moisissures. *Médecine et Hygiène*. **45**: 153–157.
- Hagerman, A. E., Butler, L. G. (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *J Agr Food Chem*. **26**: 809–812.

- Hagerman, A. E., Butler, L. G. (1989). Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *J Chem Ecol.* **15(6)**: 1795–1810.
- Hahlbrock, K. (1981). Flavonoids. In: “The biochemistry of plants”. *Academic Press, Inc* (London). **7** (Chap 14): 425– 455.
- Hajhashemi, V., Ghannadi, A., Sharif, B. (2003). Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *J. Ethnopharmacol.* **89**: 67–71.
- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* **59**: 1609–1623.
- Halliwell, B. (2007). Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health?. *Cardiovascular Research.* **73**: 341– 347.
- Halliwell, B., Aruoma, O.I. (1993). DNA damage by oxygen-derived species: its mechanism and measurement using chromatographic methods. In *Molecular Biology of Free Radicals Scavenger System*. (JG Scandalios, ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press. NewYork. 47– 67.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V. (2003). Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology.* **95(4)**: 853– 860.
- Haraguchi, H., Tanimoto, K., Tamura, Y., Mizutani, K., Kinoshito, T. (1998). Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Gly-cyrrhiza inflata*. *Phytochemistry.* **48**: 125–129.
- Harborne, J.B. (1994). Phenolics. In: *Natural products: their chemistry and biological significance*. Eds. Mann, J., Davidson, R. S., Hobbs, J.B., Harborne, J.B. Longman (London). Chap. 6: 361–388.
- Harborne, J.B., Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* **55**: 481–504.
- Harbowy, M. E., Balentine, D. A. (1997). Tea chemistry. *Crit Rev Plant Sci.* **16**: 415–480.
- Hartmann, A., Niess, A. M. (2000). Oxidative DNA damage in exercise. In: Sen CK, Packer, L., Hanninen, O., editors. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Amsterdam: Elsevier. p. 195–217.
- Hartwell, J.L., (1969). Plants used against cancer. A survey. *J. Nat. Prod.* **32**: 79– 107.
- Haslam, E. (1993). Polyphenol complexation. In: « Polyphenolic phenomena ». Ed. Scalbert A. *INRA* (Paris). Chap. 2: 23–31.
- Haslam, E., Lilley, T. H. (1988). Natural astringency in foodstuffs: a molecular interpretation. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **27(1)**: 1–40.
- Havsteen, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol.* **32**: 1141–1148.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol*

Ther. **96**: 67– 202.

- Haxhe, J. J., Zumofen, M. (1999). Notions d'hygiène hospitalière. Faculté de Médecine. Université Catholique de Louvain.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem.* **13**: 572– 84.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E. M., (2004). Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy. Churchill Livingstone. Edinbrugh: pp. 245–252.
- Helander, I. M., Alakomi, H. L. (1998). Characterisation of the action of selected essential oil components on Gram- bacteria. *Journal of Agriculture Food Chemistry.* **46**: 3590–3595.
- Hendrich, B. A. (2006). Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica.* **27(1)**: 27– 40.
- Hermal, C. (1993). Activité bactériostatique de sept émulsions d'huiles essentielles et de deux associations d'émulsions d'huiles essentielles. Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier 1 (87).
- Holley, R. A., Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology.* **22 (4)**: 273–292.
- Hooper, D.C. (2000). Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones, *Clinical Infectious Disease.* **31 (Suppl 2)**. S24–S28.
- Hopkins, K.L., Davies, R.H., Threlfall, E.J. (2005). Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int. J. Antimicrob. Agents* **25 (5)**, 358–373.
- Hosein S. R., Lytle M. (2001). Les Antioxydants. C.A.T.I.E. Feuillet d'information.
- Hulin, V., Mathot, A. G., Mafart, P., Dufossé L. (1998). Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'aromes. *Sciences des aliments.* **18**: 563–582.
- Hurst, C. J. (1997). Manuel of environmental microbiology. Aerobiology. Washington, D.C., *ASM PRESS*.
- Hwang, E. S., Kim, G.H. (2007). Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. *Toxicology.* **229**: 1–10.
- Iinuma, M., Tsuchiya, H., Sato, M., Yokoyama, J., Ohyama, M., Ohkawa, Y., Tanaka, T., Fujiwara, S., Fujii, T. (1994). Flavanones with antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* **46**: 892–895.
- Iniesta-Sanmartin, E., Barberan, F. A. T., Guirado, A., Lorents, F. T. (1990). Antibacterial Flavonoids from *Helichrysum picardii* and *H. italicum*. *Planta Medica.* **56** : 648– 649.
- Januel, C. (2003). Stress Oxydant Au Niveau Des Plaquettes Sanguines Humaines Dans Le Contexte Du Diabète : Étude Du Glutathion Et De La Glutathion Péroxydase 4. Thèse Doctorale : Biochimie. Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science-Santé. Université Lyon I/

- Javanovic, S. V., Steenken, S., Tomic, M., Marjanovic, B., Simic, M. J. (1994). Flavonoids as antioxidants. *J Am Chem Soc.* **116**: 4846–4851.
- Javidnia, K., Miri, R., Kamalinejad, M., Sarkarzadeh, H., Jamalian, A. (2004). Chemical composition of the essential oils of *Anthemis altissima* L. grown in Iran. *Flavour Frag. J.* **19** (3): 213 – 216.
- Jenner, P., Olanow, C. W. (1996). Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology.* **47**: 161–170.
- Ji, L. L. (2001). Exercise at old age: does it increase or alleviate oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci.* **928**: 236– 247.
- Jones, M.E., Draghi, D.C., Thornsberry, C., Karlowsky, J.A., Sahm, D.F., Wenzel, R.P. (2004). Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit – a European and North American Surveillance study (2000–2002). *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 3, 14.
- Jorgensen, L. V. (1998). Flavonoids and other naturally occurring antioxidants: physico-chemical aspects of their antioxidant mode of action. Ph. D. Thesis. The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark.
- Kandaswami, C., Middleton, E. (1994). Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv Exp Med Biol.* **366**: 351–376.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M. (2005). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry.* xxx: xxx–xxx.
- Katalinic, V., Milos, M., Modun, D., Music, I., Boban, M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chemistry.* **86**: 593 – 600.
- Kawaguchi, K., Kikuchi, S., Hasunuma, R., Maruyama, H., Yoshikawa, T., Kumazawa, Y. (2004). A citrus flavonoid hesperidin suppresses infection-induced endotoxin shock in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* **27**(5): 679 – 683.
- Khalil, A. (2002). Molecular mechanisms of the protective effect of vitamin E against atherosclerosis. *Can J Physiol Pharmacol.* **80**(7): 662 – 669.
- Khan, M. A.U., Ashfaq, M. K., Znberi, H. S., Mahmood, M. S., and Gilani, A. H. (2003). The in vivo antifungal activity of aqueous extract from *Nigella sativa* seeds. *Phytotherapy Research.* **17**: 183–186.
- Kidd, P. S., Llugany, M., Poschenrieder, C., Gunsé, B., Barceló, J. (2001). The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three variety of maize (*Zea mays* L.). *J Exp Bot.* **52**: 1339 – 1352.
- Kim, H., Kim, Y. S., Kim, S. Y., Suk, K. (2001). The plant flavonoid wogonin suppresses death of activated C6 rat glial cells by inhibiting nitric oxide production. *Neuroscience Letters.* **309**: 67–71.
- Kim, H.J., Wood, E.R., Shin, C.G., Park, H. (1998). A new flavonol gallate ester from *Acer* and its

- inhibitory activity against HIV-1 integrase. *Journal of Natural Products* **61**: 145–148.
- Knoepfel, L., Steinkühler, C., Carri, M. T., Rotilio, G. (1994). Role of zinc coordination and of the glutathion redox susceptibility of human transcription factor Sp1. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **201**: 971–877.
- Koehclin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygen, oxidative stress and anti oxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolisme.* **20**: 165–177.
- Kovacs, A., Forgo, P., Zupkoc, I., Rethy, B., Falkay, G. Szabo, P. and Hohmann J. (2007). Phenanthrenes and a dihydrophenanthrene from *Tamus communis* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry* **68**: 687–691.
- Kumaran, A., Karunakaran, R. J. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT.* **40**: 344–352.
- Kunle, O., Okogun, J. (2003). Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. *Phytomedicine.* **10**: 59–61.
- La Casa, C., Villegas, I., Alarcon de la Lastra, C., Motilva, V., Martin Calero, M.J. (2000). Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *Journal of Ethnopharmacology.* **71**: 45–53.
- Lahlou, M. (2004). Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research.* **18**: 435–448.
- Lamarti, A., Badoc, A., Deffieux, G., Carde, J.P. (1994). Biogénèse des monoterpènes : la chaîne isoprenique. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* **133** : 79 – 99.
- Lambert, R. J.W., Skandamis, P.N., Coote, P. J., Nychas G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology.* **91** (3): (453–462).
- Lee, H., Wang, H. W., Su, H. Y., Hao, N. J. (1994). The structure-activity relationships of flavonoids as inhibitors of cytochrome P-450 enzymes in rat liver microsomes and the mutagenicity of 2-amino-3-methyl-imidazo[4;5-f]quinoline. *Mutagenesis.* **9** (2): 101–106.
- Leeuwenburgh, C., Heinecke, J. W. (2001). Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem.* **8**: 829–38.
- Lesgards, J. F., Prost, M., Lehucher-Michel, M. P. (2002). Le stress oxydatif et ses implications Myalgies international supplément scientifique (Marseille, France). Vol **2** (3) : 1631–1641.
- Levesque, E. (2006). Oligo-Elements Et Stress Oxydant. *Alimentation & Santé. Actualités IMAAGE* : p. 1–5.
- Li, B.Q., Fu, T., Yan, Y.D., Baylor, N.W., Ruscetti, F.W., Kung, H.F. (1997). Inhibition of HIV by baicalin. *Cellular Molecular Bio- logical Research* **39**, 119–124.
- Liebert, C.A., R.M. Hall., Summers, A.O. (2000). Transposon Tn21, flagship of the floating genome, *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **63**. 507–522.

- Lin, Y.M., Anderson, H., Flavin, M.T., Pai, Y.H.S., (1997). In vitro anti-HIV activity of bi-avonoids from *Rhus succedanea*. *Journal of Natural Products* **60**, 884–888.
- Lonchamp, M., Guardiola, B., Sicot, N., Bertrand, M., Perdrix, L., Duhault, J. (1989). Protective effect of a purified flavonoid fraction against reactive oxygen radicals *in vivo* and *in vitro* study. *Arzneim-Forsch/Drug Res.* **39**: 882–885.
- Lotito, SB., Frei, B. (2004). The increase in human plasma antioxidant capacity after apple consumption is due to the metabolic effect of fructose on urate, not apple-derived antioxidant flavonoids. *Free Radic Biol Med.* **37**: 251–258.
- Luczaj, W., and Skrzydlewska E. (2005). Antioxidative properties of black tea. *Preventive Medicine.* **40**: 910–918.
- Mahmood, M. S., Gilani, A. H., Khwaja, A., Rashid, A., Ashfaq, M.K. (2003). The invitro effect of aqueous extract of *Nigella sativa* seeds on nitric oxide production. *Phytotherapy Research.* **17** : 921–924.
- Maire, R. (1959). Flore de l’afrique du nord Vol VI publié par les soins de P. Quézel.Eds. LECHEVALIER Paris, 394p.
- Malhotra, B., Onyilagha, J.C., Bohm, B.A., Towers, G.H.N., James, D., Harborne, J.B., French, C.J. (1996). Inhibition of tomato ring-spot virus by flavonoids. *Phytochemistry* **43**, 1271–1276.
- Mandel, S., Amit, T., Reznichenko, L., Weinreb, O., Youdim, M.B. (2006). Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelators–antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders. *Mol Nutr Food Res.* **50**: 229–34.
- Manthey, J. A., Grohmann, K., Montanari, A., Ash, K., & Manthey, C. L. (1999). Polymethoxylated flavones derived from citrus suppress tumor necrosis factor- α expression by human monocytes. *Journal of Natural Products*, **62**, 441–444.
- Markham, K. R. (1982). Techniques of flavonoid identification. Academic Press (London) Chap 1 et 2: 1–113.
- Mc Cord, J. M. (1974). Free radicals and inflammation protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science.* **185**: 529–531.
- Mc Manus, J. P., Davis, K. G., Lilley, T., Haslam, E. (1981). The association of proteins with polyphenols. *J Chem Soc Chem Co*: 309–311.
- Medeiros, A. A. (1997). Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* **24** (1): S19–S45.
- Mehansho, H., Butler, L. G., Carlson, D. M. (1987). Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: interaction, induction and defense mechanisms. *Annu Rev Nutr.* **7**: 423.
- Mehrotra, M., Dougherty, J., Poppe, C. (2003). La résistance aux antimicrobiens : De quo s’agit-il?. *Recherche sur les politiques de santé (Canada).* **6**: 6–10.
- Mezzetti, A., Pierdomenico, S. D., Costantini, F., Romano, F., De Cesare, D., Cuccurullo, F.,

- Imbastaro, T., Riario-Sforza, G., Di Giacomo, F., Zuliani, G., Fellin, R. (1998). Copper/zinc ratio and systemic oxidant load: effect of aging and aging-related degenerative diseases. *Free Radic Biol Med.* **25**(6): 676–681.
- Middleton E., Kandaswami C., Theoharides TC. (1992). Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Biochem Pharmacol.* **43**: 1167–1179.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. (2000). The effect of flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*; **52** (4): 651–674.
- Miki, M., Tamia, H., Mino, M., Yamamoto, Y., Niki, E. (1987). Free radical chain oxidation of rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by α -tocopherol. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **258**: 373–380.
- Mioulane, P. (2004). Encyclopédie universelle des 15000 plantes et fleurs de Jardin. Larousse. ISBN.
- Miura, S., Watanabe, J., Tomita, T., Sano, M., Tomita, I. (1994). The inhibitory effect of tea polyphenols (Flavan-3-ol derivatives) on Cu^{2+} mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *Biol Pharm Bull.* **17**(12): 1567–1572.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for stimulating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **26** (2): 211–219.
- Montoro, P., Braca, A., Pizza, C., De Tommas, N. (2005). Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chemistry.* **92**: 349–355.
- Morris, M.E., Zhang, S. (2006). Flavonoid–drug interactions: effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sci*; **78**:2116–2130.
- Morton, L. W., Amsha, A., Caccetta, R., Puddey, I. B., Croft, K. D. (2000). Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: Relevance to cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **27**: 152–159.
- Nakagawa, T., Yokozawa, T. (2002). Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food and Chemical Toxicology.* **40**: 1745–1750.
- Nakayama, T. (1994). Suppression of hydroperoxide-induced cytotoxicity by polyphenols. *Cancer Research.* **54**: 1991s–1993s.
- Nakayama, T., Niimi, T., Osawa, T., Kawakishi, S. (1992). The protective role of polyphenols in cytotoxicity of hydrogen peroxide. *Mutat Res.* **281**: 77–80.
- Nakayama, T., Yamaden, M., Osawa, T., Kawakishi, S. (1993). Suppression of active oxygen-induced cytotoxicity by flavonoids. *Biochemical Pharmacology.* **45**: 265–267.
- Narayana, K. R., Reddy, M. S., Chaluvadi, M. R., Krishina, D. R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Ind J Pharmacol.* **33**: 2–16.

- Newman, P. R., Timmerman, B. N., Marby, T. J. (1997). Laboratory manual for the systematic identification of flavonoids.
- Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn, D. E. C., Boelens, P. G., van Norren, K., van Leeuwen, P. A. M. (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nut.* **74**: 418–425.
- Nilsson, J., Stegmark, R., Akesson, B. (2004). Total antioxidant capacity in different pea (*Pisum sativum*) varieties after blanching and freezing. *Food Chemistry.* **86**: 501–507.
- Ohemeng, K. A., Schwender, C. F., Fu, K. P., Barrett, J. F. (1993). DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones. *Bioorg Med Chem Lett.* **3**: 225–230.
- Okawa, M., Kinjo, J., Nohara, T., Ono, M. (2001). DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) Radical Scavenging Activity of Flavonoids Obtained from Some Medicinal Plants. *Biol. Pharm. Bull.* **24** (10): 1202–1205.
- Omoto, T., Asai, I., Ishimaru, K., Shimomura, K. (1998). Geranyl isovalerate accumulation in adventitious root culture of *Anthemis nobilis*. *Phytochemistry.* vol. 48 (6): 971-974.
- Opal, S.M., Mayer, K. H., Medeiros, A. A. (2000). Mechanisms of bacterial antibiotic resistance. 5e éd. New York: 2213–2243.
- Oszmianski, J., Wojdylo, A., Lamer-Zarawska, E., Swiader, K. (2007). Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. *Food Chemistry.* **100**: 579–583.
- Othman, A., Ismail, A., Abdul Ghani, N., Adenan, I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry.* **100**: 1523–1530.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., Deemer, E. K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J Agric Food Chem.* **50**: 3122–3128.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition.* **44**: 307–315.
- Paolisso, G., D'amore, A., Giugliano, D., Ceriello, A., Varrichio, M., D'onofrio, F. (1993). Pharmacologic doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulin-dependant diabetic patients. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**: 650–656.
- Parejeo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Saavedra, G., Murcia, M. A., Códina, C. (2003). Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sci.* **73**: 1667–1681.
- Paris, M., Hurabille, M. (1981). Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie. Masson (Paris). 339.
- Park, W. H., Han, Y. W., Kim, S. H., Kim, S. Z. (2007). A superoxide anion generator, pyrogallol induces apoptosis in As 4.1 cells through the depletion of intracellular GSH content. *Mutation Research. Model MUT-10408.* 1–12.

- Pavlovic, M., Kovačević, N., Tzakou, O., Couladis, M. (2006). Essential oil composition of *Anthemis triumfetti* (L.) D.C. *Flavour Fragr. J.* **21**(2): 297–299.
- Perry, J. J., Staley, J. T., Lory, S. (2004). *Microbiologie. Cours et questions de révision.* Ed. Dunod.
- Perry, N. S., Bollen, C., Perry, E. K., Ballard, C. (2003). Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **75**: 651–659.
- Pibiri, M. C. (2006). Assainissement Microbiologique de l'Air et des Systèmes de Ventilation au Moyen d'Huiles Essentielles, Thèse pour l'obtention du grade de docteur ès sciences. Lausanne, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL).
- Picardo, M., Marchese, C., De Luca, C., Fuggioni, A., Schmidt, R. J., Santucci, B. (1992). Paraphenylenediamine, a contact allergen, induces oxidative stress and ICAM-1 expression in human keratinocytes. *Br. J. Dermatol.* **126**: 450–455.
- Pichersky, E., Noel, J. P., Dudareva, N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science.* **311**: 808–811.
- Picman, A.K., Schneider, E.F., Pieman, J. (1995). Effect of flavonoids on mycelial growth of *Verticillium albo-atrum*. *Biochemical Systematics and Ecology* **23**, 683–693.
- Pierpoint, W. S. (1986). Flavonoids in the human diet. In "Plant flavonoids in biology and medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships". Eds. Cody, V., Middleton, E., Harborne, J. B., Alan, R. Liss. Inc (New York): 125–140.
- Pincemail, J., Lecomte, J., Collart, E., Castiaux, J. P., Defraigne, J. O. (2003). Stress oxydant, antioxydants et exercice physique. *MEDECINE INTERNE.* **6** (5) : 1–3.
- Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., Defraigne, J. O. (1999). Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. *Vaisseaux, Coeur, Poumons.* **4** (4) : 6–11.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Compl. Altern. Med.* **6**: 39.
- Prakash, A. (2001). Antioxidant Activity. *Medallion Laboratories, Analytical Progress,* **19** (2).
- Price, M. P. Butler, L. G. (1977). Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal of Agricultural and food chemistry* **25**, 1268–1273.
- Proctor, P. H., Reynolds, E. S. (1984). Free radicals and disease in man. *Chem Phys.* **16**: 175–195.
- Pulido, R., Bravo, L., Saura – Carlixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined modified ferric reducing / Antioxidant Power Assay. *Journal of Agricultural and food chemistry.* **48**: 3396–3402.
- Quezel, P., Santa, S. (1963). *Nouvelle Flore d'Algerie et des regions Désertiques Méridionales.* Tome I et II. CNRS. 1160–1170.
- Reichheld, J. P., Meyer, E., Khafif, M., Bonnard, G., Meyer, Y. (2005). AtNTRB is the major mitochondrial thioredoxin reductase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **579**(2): 337–342.

- Reisch, J., Bathory, M., Nova'k, I., Szendrei, K., Minker, E., (1972). Stickstoff-freie Phenanthren-Derivate als Pflanzeninhaltsstoffe. *Herba Hung.* **11**, 61–71.
- Reisch, J., Bathory, M., Szendrei, K., Minker, E., Nova'k, I., (1969). Stickstoff-freie Phenanthren-Derivate aus dem Rhizom von *Tamus communis*. *Tetrahedron Lett.* **10**, 67–68.
- Reisch, J., Bathory, M., Szendrei, K., Nova'k, I., Minker, E., (1973). Weitere Phenanthrene aus dem Rhizom von *Tamus communis*. *Phytochemistry* **12**, 228–229.
- Rice-Evans, C. (1995). Plant polyphenols: Free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? In: “Free radicals and oxidative stress: environment, drug and food additives”. Eds. Rice-Evans, C., Halliwell, B., Lunt, G. G. *Portland Press* (London): 103–116.
- Rice-Evans, C. (2001). Flavonoid Antioxidants. *Current Medicinal Chemistry.* **8**: 797–807.
- Rios, J. L., Recio, M.C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology.* **100**: 80–84.
- Robert, A., Halberstein, P. H. D. (2005). Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. *Ann Epidemiol.* **5**: 686–699.
- Ruch, R. J., Chung, S. U., and Klaunig, J. E. (1984). Spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals. *Methods in Enzymology.* **105**: 198–209.
- Rylander, R. (1998). Microbial cell wall constituents in Indoor Air and their relation to diseases. *Indoor Air Supplement.* **4** : 59–65.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry.* **91**: 621–632.
- Sahin, F., Gulluce, M., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polission, M., Agar, G., Ozer, H. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *origanum vulgare* ssp. *Vulgare* in the eastern anatolia region of Turkey. *Food control.* **15**: 549–557.
- Sajduda, A., Dziadek, J., Dela, A., Zalewska-Schonhaler, N., Zwalska, Z., Fadden, J.M.C. (1998). DNA finger printing as an indicator of active transmission of multi drug-resistant Tuberculosis in Poland. *Int. J. Infect. Dis.* **3**: 12–17.
- Salthammer, T. (1999). *Organic indoor air pollutants: occurrence - measurement –evaluation.* Wiley-VCH.
- Santos-Buelga, C., Scalbert, A. (2000). Proantocyanidins and tanninlike compounds-nature, occurrence dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* **80**, 1094–1117.
- Saroglou, V., Dorizas, N., Kyriotakis, Z., Skaltsa H.D. (2006). Analysis of the essential oil composition of eight *Anthemis* species from Greece. *Journal of Chromatography.* **1104** (1): 313–322.
- Schmidt, R. J., Khan, L., Chung, L. Y. (1990). Are free radicals and not quinone the haptenic species

derived from urushiols and other contact allergenic mono and dihydric alkylbenzenes? The significance of NADH, glutathione and redox cycling in the skin. *Arch. Dermatol. Res.* **282**: 56–64.

- Schmidt, R. J., Moul, S. P. (1983). The dermatitic properties of black bryony (*Tamus communis* L.). *Contact Dermatitis.* **9**: 390–396.
- Schrader, M., Fahimi, H. D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1763**: 1755–1766.
- Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C.L., Hollenberg, N.K., (2006). Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**: 1024–1029.
- Schroeter, H., Spencer, J. P. E., Rice-Evans, C., Williams R. J. (2001). Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochem. J.* **358**: 547–557.
- Schubert, Y. S., Lansky, E. Ph., Neeman, I. (1999). Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology* **66**: 11–17.
- Seigniez, C., Pibiri, M. C. (2001). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles et leurs effets sur le bien-être des occupants. CISBAT 2001, Lausanne, LESO, EPFL.
- Serrano, F., Klann, E. (2004). Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Research Reviews.* **3**: 431–443.
- Sharififar, F., Moshafi, M. H., Mansouri, S. H., Khodashenas, M., Khoshnoodi, M. (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control.* **18**: 800–805.
- Silva, J., Abebe, W., Sousa, S. M., Duarte, V. G., Machado, M. I. L., Matos, F. J. A. (2003). Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *J. Ethnopharmacol.* **89**: 277–283.
- Soares, A. F. (2005). Effets Du Stress Oxydant Sur Le Fonctionnement Des Adipocytes : Adiponectine et Prostaglandines. Thèse Doctorale : Biochimie. Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science-Santé. N° : 2005-ISAL- **00123** : 35–43.
- Sokmen, A., Gulluce, M., Akpulat, A. H., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., Sokmen, M., Sahin, F. (2004). The invitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanols extracts of endemic *thymus spathulifolins*. *Food control.* **15**: 627–634.
- Sokmen, A., Vardar-Unlu, G., Polissiou, M., Daferera, D., Sokmen, M., Donmez, E. (2003). Antimicrobial Activity of Essential Oil and Methanol Extracts of *Achillea sintenisii* Hub. Mor. (Asteraceae). *PHYTOTHERAPY RESEARCH.* **17**: 1005–1010.
- Soong, Y. Y. and Barlow, J. Ph. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry.* **88**: 411–417.

- Steinberg, D. (1993). Modified forms of low-density lipoprotein and atherosclerosis. *J. Intern. Med.* **233**: 227–232.
- Steinmoen, H., Knutsen, E., Håvarstein, L.S. (2002). Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**. 7681–7686.
- Stermitz, F. R., Scriven, L. N., Tegos, G., Lewis, K. (2002). Two flavonols from *Artemisia annua* which potentiate the activity of berberine and Norfloxacin against a resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Planta Med.* **68**: 1140–1141.
- Talbott, G. A., Sharar, S. R., Harlan, J. M., Winn, R. K. (1994). Leukocyte-endothelial interactions and organ injury: the role of adhesion molecules. *New Horiz.* **2**: 545–54.
- Tepe, B., Donmez, E., Unlu, M., Candan, F., Daferera, D., Vardar-Unlu, G., Polissiou, M., Sokmen, A. (2004). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanols extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food Chemistry*. **84**: 519–525.
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H. A., Yumrutas, O., Sokmen, A. (2006). Screening of antioxidative properties of the methanolic extracts of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl., *Verbascum wiedemannianum* Fisch. & Mey., *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Benth.) Borm., *Centaurea mucronifera* DC. and *Hieracium cappadocicum* Freyn from Turkish flora. *Food Chemistry*. **98**: 9–13.
- Tepe, B., Sokmen, M., Sokmen, A., Daferera, D., Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Cyclotrichium organifolium* (Labill.) Manden. and Scheng. *Journal of Food Engineering*. **69**: 335–342.
- Tim Cushnie, T. P., Lamb, J. A. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **26**: 343–356.
- Tomas-Barberan, F. A., Maillard, M., Hostellman, K. (1988). Antifungal flavonoids from the leaf structures of *Helichrysum nitens* and from the stem bark of *Erythrina berteroana*. In: “Progress in Clinical and Biological Research”. Eds. Cody, V., Middleton, E., Harborne, J.B., Beretz, A. Alan R Liss (New York). Chap. **280**: 61–65.
- Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D., Giammanco, M. (2007). *Citrus* flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*. **104**: 466–479.
- Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (1972). *Dioscoreaceae*. *Flora Europaea*. Cambridge University Press vol. **5**: 84–85.
- Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (1980). *Flora Europaea*. Cambridge University Press vol. **5**.
- Uzel, A., Guvensen, A., Cetin, E. (2004). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Anthemis xylopoda* Schwarz from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*. **95**: 151–154.

- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **64**: 178–189.
- Vanaclocha, B., Canigueral, S. (2003). Fitoterapia In: Vademecum de prescripcion, fourth ed. Masson, Barcelona. 354–355.
- Vardar-Unlu, G., Candan, F., Sokmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, M., Donmez, E., and Tepe, B. (2003). Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of thymus pectinatus fisch. etMey. Var. Pectinatus (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and food chemistry*. **51**: 63–67.
- Varin, L., Barron, D., Ibrahim, R. K. (1987). Enzymatic assay for flavonoid sulfotransferase. *Anal Biochem*. **161**: 176–180.
- Vistaropoulou, V. E., Vajias, C. (1986). Methylated flavones from Teucrium polium. *Planta Med*. **5**: 343–432.
- Walsh, S. E., Maillard, J. Y., Russell, A. D., Catrenich, C. E., Charbonneau, D. L., Bartolo R. G. (2003). Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. **94** (2): 240–247.
- Wang, M., Tran, J.H., Jacoby, G.A., Zhang, Y., Wang, F., Hooper, D.C. (2003). Plasmid mediated quinolone resistance in clinical isolates of E. coli from Shanghai, China. *Antimicrob. Agents Chemother*. **47**: 2242–2248.
- Waridel, P. (2003). Investigation phytochimique des plantes aquatiques Potamogeton pectinatus L., P. lucens L., P. perfoliatus L. et P. crispus L. (Potamogetonaceae). Thèse de doctorat présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne. FACULTE DES SCIENCES.
- Watterson, J. J., Butler, L. G. (1983). Occurrence of an unusual leucoanthocyanidin and absence of proanthocyanidins in sorghum leaves. *J Agr Food Chem*; **31**: 41–45.
- Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*. **5**: 218–223.
- Wolin, M. S. (1996). Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. *Microcirculation*. **3** (1): 1–17.
- Wolters, M., Hermann, S., Golf, S., Katz, N., Hahn, A. (2005). Selenium and antioxidant vitamin status of elderly German women. *Eur J Clin Nutr*. Vol **24**.
- Xu, H. X., Lee, S. F. (2001). Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. *Phytother Res*. **15**: 39–43.
- Yang, K., Lamprecht, S. A., Liu, Y., Shinozaki, H., Fan, K., Leung, D., Newmark, H., Steele, V. E., Kelloff, G. J., Lipkin, M. (2000). Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. *Carcinogenesis*. **21**(9): 1655–1660.
- Yokozawa, T., Chen, C. P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G. I., Nishioka, I. (1998). Study on the

inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochemical Pharmacology*. **56**: 213–222.

Yoshikawa, T., Yamamoto, Y., Naito, Y. (2000). *Free radicals in chemistry, Biology and Medicine*, Ed. Oica International, Londres.

Zafrilla, P., Mulero, J., Xandri, J. M., Santo, E., Caravaca, G., Morillas, J. M. (2007). Stress Oxydatif Dans Différents Stades De La Maladie D'Alzheimer. *Maladie D'Alzheimer Et Déclin Cognitif*: 12 (14): 131-137.

Zaika, L. L. (1988). Spices and Herbs - Their Antimicrobial Activity and Its Determination. *Journal of Food Safety*. **9** (2): 97–118.

Zhao, Y., Gao, Z., Li, H., Xu, H. (2004). Hemin/nitrite/H₂O₂ induces brain homogenate oxidation and nitration: effects of some flavonoids. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1675**: 105– 112.

Zini, A., Del, R. D., Stewart, A.J., Mandrioli, J., Merelli, E., Sola, P. (2006). Do flavan-3-ols from green tea reach the human brain? *Nutr Neurosci*. **9**: 57– 61.

**More
Books!** 

yes
I want morebooks!

Oui, je veux morebooks!

Buy your books fast and straightforward online - at one of the world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at

www.get-morebooks.com

Achetez vos livres en ligne, vite et bien, sur l'une des librairies en ligne les plus performantes au monde!

En protégeant nos ressources et notre environnement grâce à l'impression à la demande.

La librairie en ligne pour acheter plus vite

www.morebooks.fr

OmniScriptum Marketing DEU GmbH
Bahnhofstr. 28
D - 66111 Saarbrücken
Telefax: +49 681 93 81 567-9

info@omniscrptum.com
www.omniscrptum.com

OMNIScriptum 

