REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE LôENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

سطيف -جامعـة فرحـات عبـاس

UNIVERSITE FARHAT ABBES ï SETIF-

MEMOIRE

Présenté à la Faculté des Sciences
Département de Biologie
Pour lôobtention du Diplôme de

MAGISTER
EN MICROBIOLOGIE

Option : Microbiologie Appliquée

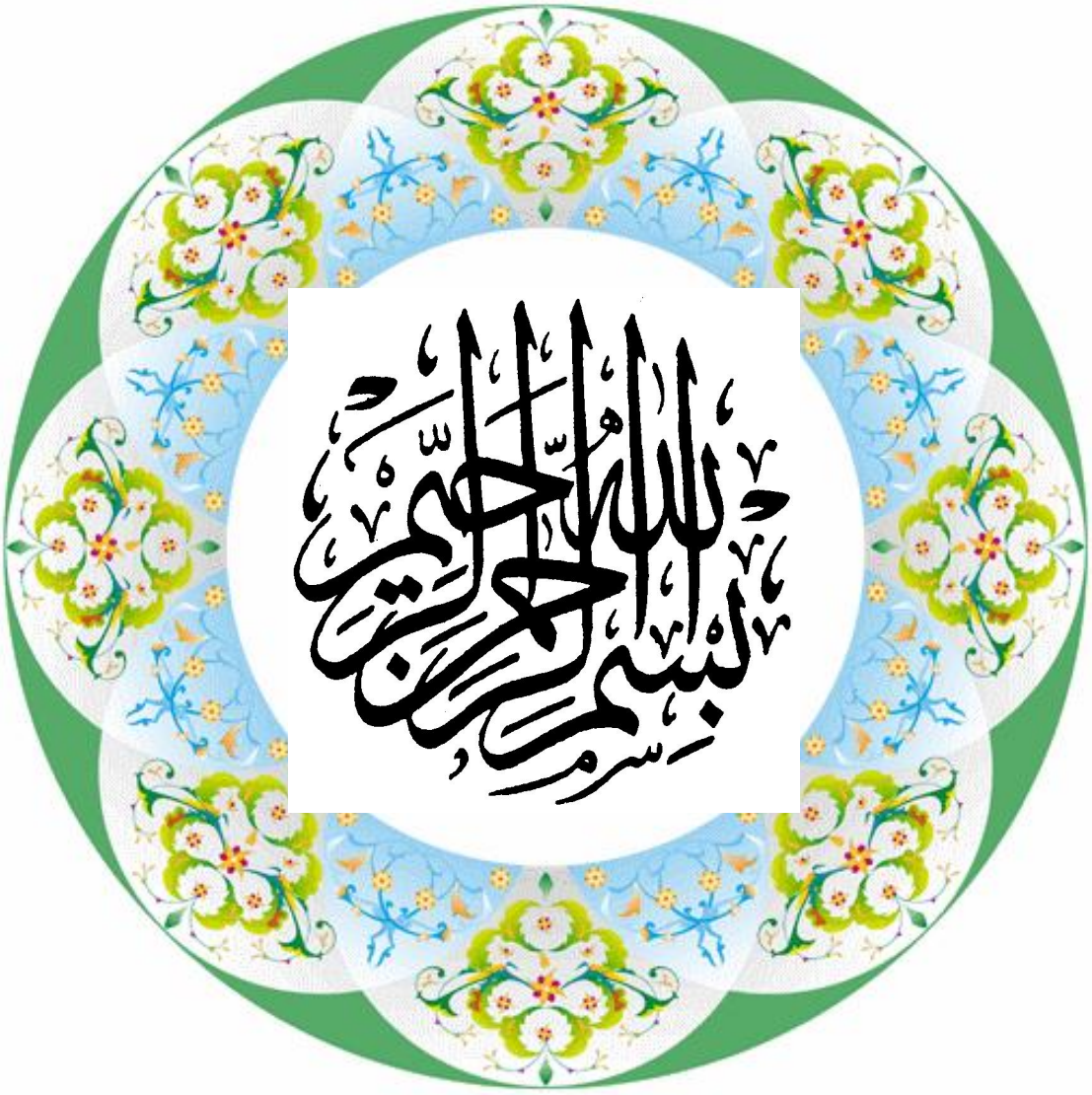
Par
BELKHIRI Farida

THEME

Activité antimicrobienne et antioxydante des extraits du *Tamus communis L.* et *Carthamus caeruleus L.*

Soutenu le : 06/07/2009 Devant la Commission dôExamen

Président	**Pr GUECHI Abdelhadi**	**Pr**	**Université de Sétif**
Rapporteur	**Dr BAGHIANI Abderrahmane**	**MC**	**Université de Sétif**
Examinateurs	**Pr ARRAR Lekhmici**	**Pr**	**Université de Sétif**
	Pr HARZALLAH Daoud	**Pr**	**Université de Sétif**


بسم الله الرحمن الرحيم

Remerciements

*Avant tout, je remercie **Allah** de m'avoir donné la volonté afin d'arriver à la finalité de ce modeste travail.*

*Je tiens à remercier également mon promoteur Mr: **BAGHIANI Abderrahmane,** Maître de conférence à l'université de Sétif, qui m'a suivi et guidé tout au long de ce travail et pour sa confiance et ses encouragements.*

*Je remercie très vivement Mr: **GUECHI Abdelhadi**, professeur à l'université de Sétif, pour l'honneur qu'il me fait pour avoir accepter la présidence du jury.*

*Mes vifs remerciements vont aussi à messieurs: **ARRAR Lekhmici**, professeur à l'université de Sétif, et **HARZALLAH Daoud**, professeur à l'université de Sétif, pour l'honneur d'avoir accepter d'examiner ce travail.*

*J'exprime mes profonds remerciements et mes sentiments de gratitudes à mon mari **AYAD mouloud**, pour ces conseils les plus importants, pour leur patience.*

*J'adresse, d'autre coté, mes remerciements à Mme. **BOUMERFEG Sabah**, Chargée de cours au centre universitaire de Bourj-Bou-Arreridj, pour ses conseils pratiques et scientifiques.*

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 potentielle antioxydant des échantillons était évalué en utilisant trois techniques complémentaires, l'inhibition du radical libre DPPH, le test du ß-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 IC_{50} de 18.9 µg/ml presque égale à ce du BHT (18.6 µg/ml). Cette fraction était capable d'inhiber l'oxydation de la ß-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 mois 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 µg/ml; almost equal to that of BHT (18.6 µg/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*.

الملخص:

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم الخصائص المضادة للأكسدة والمضادة للبكتيريا للمستخلصات الميثانولية والبروتينات والزيوت الطيارة لجذور نبتتين تستعمل في الطب التقليدي الجزائري: الكرمة السوداء وقرص مرص. تم قياس النشاطية المضادة للأكسدة بثلاث تقنيات: تثبيط الجذر الحر DPPH ، تقنية بيطا كاروتين/ حمض لينوليك وتقنية FRAP . بيّن اختبار ضد الأكسدة أن المستخلصات الميثانولية غير المستقطبة كانت أكثر نشاطية من المستخلصات المستقطبة. من بين هذه المستخلصات، أعطى مستخلص الكلوروفورم للكرمة السوداء في اختبار الـــ DPPH IC_{50} يقر بـــ 18.9 مكغ/ملل تعادل قيمة IC_{50} الـــ BHT (18.6 مكغ/ملل). أظهر هذا المستخلص القدرة على تثبيط أكسدة البيطا كاروتين بمعدل 89.8 % . التركيز المكافيء 1 (EC1) لهذا المستخلص بتقنية FRAP كان 0.5 غ/ل عند الدقيقة الرابعة 0.4 غ/ل عند الدقيقة 30. بالنسبة للاختبار المضاد للبكتيريا أظهرت الزيوت الطيارة للكرمة السوداء تثبيط نمو سبع سلالات بكتيرية من أصل تسعة مشكلة مناطق تثبيط أقطارها من 19 إلى 25 مم. كما أظهرت المستخلصات الميثانولية غير القطبية نشاطية مضادة للبكتيريا جد معتبرة مقارنة بالمستخلصات المستقطبة والبروتينات.

الكلمات المفتاحية: النشاطية المضادة للبكتيريا، النشاطية المضادة للأكسدة، الزيوت الطيارة.

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 dôacétate dôéthyle
E.Ac/ *Cc* : Extrait dôacétate dôéthyle de *Carthamus caeruleus L.*
E.Ac/ *Tc* : Extrait dôacétate dôéthyle de *Tamus communis L.*
E.AG : Equivalent dôacide gallique
E.Aq : Extrait aqueux
E.Aq/ *Cc* : Extrait aqueux de *Carthamus caeruleus L.*
E.Aq/ *Tc* : Extrait aqueux de *Tamus communis L.*
E.Br : Extrait brut
E.Br/ *Cc* : Extrait brut de *Carthamus caeruleus L.*
E.Br/ *Tc* : Extrait brut de *Tamus communis L.*
E.Ch : Extrait du chloroforme
E.Ch/ Cc : Extrait du chloroforme de *Carthamus caeruleus L.*
E.Ch/ *Tc* : Extrait du chloroforme de *Tamus communis L.*
E.Pr : Extrait protéique
E.Pr/ *Cc* : Extrait protéique de *Carthamus caeruleus L.*
E.Pr/ *Tc* : Extrait protéique de *Tamus communis L.*
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

IC_{50}	: Concentration provocant 50 % dõinhibition
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 lôoxygène)
SD	: Standard Deviation
SDS	: Sodium dodecyl sulphate
SDS-AGE	: Sodium dodecyl sulphate ï Polyacrylamid Gel Electrophoresis
SIDA	: Syndrome Immunodéficitaire 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 dõImmunodéficience Humain

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : LôO2, à lôorigine des radicaux libres ---------- 05
Figure 2 : Production de ROS dans la cellule ---------- 07
Figure 3 : Cibles de lôaction des antibiotiques ---------- 18
Figure 4: Structure générale des flavonoides ---------- 24
Figure 5: Structure chimique de certains monoterpènes ---------- 36
Figure 6: Structure chimique de certains sesquiterpènes ---------- 36
Figure 7 : Structure chimique de certains composés aromatiques ---------- 37
Figure 8 : Prise de vue du *Tamus communis L* et leurs parties ---------- 44
Figure 9 : Prise de vue du *Carthamus caeruleus L*. et leurs fleurs ---------- 49
Figure 10: Les étapes d'extraction des flavonoides par les solvants organiques ---------- 50
Figure 11: Gamme étalon de l'acide gallique avec le réactif du bleu de Prusse ---------- 52
Figure 12: Gamme étalon de la quercétine et de la rutine avec le réactif de l'AlCl3 ---------- 53
Figure 13: Gamme étalon de l'albumine bovine avec le réactif de Macart ---------- 54
Figure 14 : Courbe étalon des poids moléculaires standard ---------- 56
Figure 15: Gamme dôétalonnage du FeSO47H2O ---------- 59
Figure 16 : Electrophorèse (SDS-PAGE) des protéines ---------- 64
Figure 17 : Le pouvoir antioxydant évalué par la technique du DPPH ---------- 67
Figure 18 : Comparaison entre les concentrations provoquant 50% dôinhibition (IC50) du radicale DPPH ---------- 69
Figure 19 : Cinétique dôinhibition dôoxydation de la ß-Carotène ---------- 71
Figure 20: Cinétique de la réduction du TPTZ-Fe3+ en TPTZ-Fe2+ ---------- 75
Figure 21: Les zones dôinhibition effectuées par quelques extraits ---------- 81
Figure 22 : Les zones dôinhibition effectuées par les huiles essentielles du *Tamus communis* L. sur les différentes souches bactériennes testées ---------- 84
Figure 23 : Flavones polymethoxylés ---------- 103

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Quelques pathologies du stress oxydant ---------- 10
Tableau 2: Structure des différentes classes de flavonoides ---------- 25
Tableau 3 : Rendements des différents extraits ---------- 62
Tableau 4: Les valeurs dôIC50 en microgramme par millilitre, des différents échantillons BHT -- 68
Tableau 5 : La concentration équivalente 1 (EC1) ---------- 73

Tableau 6: Les zones d'inhibition des souches bactériennes ---------- 77
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. ---------- 80
Tableau 8: Les diamètres des zones d'inhibition (DD en millimètre) des souches bactériennes provoquées par les huiles essentiels des deux plantes, les standards et les contrôles positifs ---- 82
Tableau 9 : Les diamètres des zones d'inhibition (DD en millimètre) des souches bactériennes provoquées par les antibiotiques standard ---------- 85

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
I.4.2.1. Les terpènes ---------- 35
A. Les monoterpènes ---------- 35
B. Les sesquiterpènes ---------- 36
I.4.2.2. Les composés aromatiques ---------- 37
I.4.3. Activité biologique et utilisations des huiles essentielles ---------- 37
I.4.4. Activité antimicrobienne des huiles essentielles ---------- 38
I.4.5. Activité liée à la composition chimique ---------- 40
I.5. LES PLANTES MEDICINALES ---------- 43
I.5.1. *Tamus communis L.* ---------- 43
I.5.1.1. Description ---------- 43
I.5.1.2. Distribution géographique ---------- 44
I.5.1.3. Actions et utilisations médicinales ---------- 45
I.5.2. *Carthamus caeruleus L.* ---------- 46
I.5.2.1. Description ---------- 46
I.5.2.2. Distribution géographique ---------- 47
I.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 ß-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 ---------- 64
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 ---------- 66
III.1.4.2 Lœffet antioxydant évalué par la technique de la ß-Carotène ---------- 71
III.1.4.3 Le pouvoir réducteur estimé par la technique FRAP ---------- 74
III.1.5 L'activité antibactérienne ---------- 79
III.1.5.1 L'activité antibactérienne des extraits méthanoliques et protéique ---------- 79
III.1.5.2. Lôactivité antibactérienne des huiles essentielles ---------- 82
III.2 Discussion ---------- 87
III.2.1 Caractérisation des différents extraits ---------- 87
III.2.2 Lôactivité antiradicalaire estimée par la méthode DPPH ---------- 90
III.2.3 Lôactivité antioxydante estimée par la technique de la ß-Carotène ---------- 92
III.2.4 Le pouvoir réducteur estimé par la technique FRAP ---------- 93
III.2.5 Relation entre les composés phénoliques et lôactivité antioxydante des extraits -- 94
III.2.6 Lôactivité antibactérienne ---------- 99
III.2.6.1 Lôactivité antibactérienne des extraits méthanoliques et protéiques ---------- 99
III.2.6.2 Lôactivité antibactérienne des huiles essentielles ---------- 102
A. Extraction des huiles essentielles ---------- 102
B. Lôactivité antibactérienne ---------- 103
Conclusion ---------- 107
Bibliographie ---------- 108

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 (Rȩos 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, gastrointestinal et les systèmes biliaires, aussi bien que sur la peau. En cas de *Melaleuca alternifolia*, par exemple, l'utilisation dȩhuile 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 lôathérosclérose au cancer en passant par le diabète, le SIDA ou toutes les maladies à caractère inflammatoire (arthrite rhumatoïde, endotoxémie, é), sont dues notamment au stress oxydant (Pincemail *et al.,* 2003). Ce dernier se définit comme la conséquence dôun 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 dôespèces chimiques (atomes ou molécules) possèdent un électron célibataire (ou non apparié), ils sont générés entre autres dans les mitochondries lors du transfert dôélectrons, dans les cellules phagocytaires lors dôun processus inflammatoire et au cours de processus physiologiques dôoxydoréduction. 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, caroténoïdesé), les oligo-éléments (sélénium, zinc, cuivre,é), 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, lôeffet protecteur des fruits et légumes vis-à-vis des maladies de civilisation (maladies cardiovasculaires, diabèteé) serait dôailleurs 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 lôapplication des racines de la plante, grattées en patte, 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 lôAsie (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 dôune crème préparée dans le lait ou lôeau.

Dans ce présent travail nous avons essayé dôextraire les polyphénols (flavonoides), les protéines et les huiles essentielles à partir des racines des deux plantes *Tamus communis L* et *Carthamus caeruleus L.* Lôactivité antioxydante des différents extraits a été évaluée en utilisant trois techniques complémentaires ; lôactivité scavenger du radicale 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), La technique de la ß-Carotène/acide linoléique et la technique FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma). Lôactivité 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, lôoxygène est normalement transformé en molécules dôeau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction est cruciale puisquôelle apporte à la cellule la majorité dôénergie nécessaire (sous forme dôadénosine triphosphate (ATP)) pour assurer ses multiples fonctions (Favier, 2003). Le processus nôest toutefois pas parfait car une faible partie de lôoxygène (2 à 5%) est convertie en espèces réactives de lôoxygène (ROS) (Pincemail *et al.,* 2003). Le stress oxydant se définira donc comme un déséquilibre de la balance entre la formation des espèces réactives de lôoxygène 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 dôénergie, lôoxygène moléculaire intervient seulement comme lôaccepteur terminal des quatre électrons transférés par la chaîne des électrons (Leeuwenburgh et Heinecke, 2001 ; França *et al.*, 2007). Comprendre que lôoxygène moléculaire représente finalement quôun accepteur dôélectrons permet de faire le lien entre oxygène, radicaux libres, et ROS.

Par sa configuration électronique, lôoxygène 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 lôorganisme 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: lôanion superoxyde ($O_2^{\bullet}$) (Boveris et Chance, 1973). Côest ainsi que dans la mitochondrie, à lôétat physiologique, il existe lors du transport électronique le long de la chaîne respiratoire, une fuite dôélectrons, à lôorigine de la production de lô$O_2^{\bullet}$ (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 dôanion superoxyde (Ji, 2001). Ce radical superoxyde va alors con-1duire au cours de véritable chaîne dôoxydoréductions à la formation de nombreuses espèces très réactives (Koechlin-Ramonatxo *et al.*, 2006).

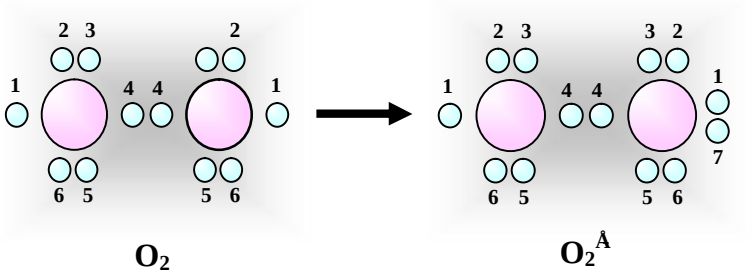


Figure 1 : LôO$_2$, à lôorigine des radicaux libres (Koechlin-Ramonatxo *et al.*, 2006).

I.1.2.1. 1. Les dérivés ac0tifs 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 $O2^{Å}$ et le radical hydroxyle $OH^{Å}$, ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NOÅ(Yoshikawa *et al.*, 2000). D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet $^{1}O2$, 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 ($O_2^{Å}$). 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:

$$\mathbf{NADPH + 2\ O_2} \xrightarrow[Oxydase]{NADPH} \mathbf{NADP^{+} + 2\ O_2^{\cdot -} + H^{+}}$$

L'$O_2^{Å}$ 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'$O2^{Å}$ peut être neutralisé par un H^{+} et transformé en radical hydroperoxyle ($HOO^{Å}$) ou réagir avec le $NO^{Å}$(diminuant ainsi la disponibilité de $NO^{Å}$ et donc la vasorelaxation endothélium-dépendante) pour former l'anion peroxynitrite

(ONOO$^-$). Celui-ci peut nitrer des protéines au niveau des résidus tyrosines ou engendrer un radical nitrite $NO_2^{Å}$ et le radical hydroxyle ($HO^{Å}$) (**Figure 2**) (Januel, 2003).

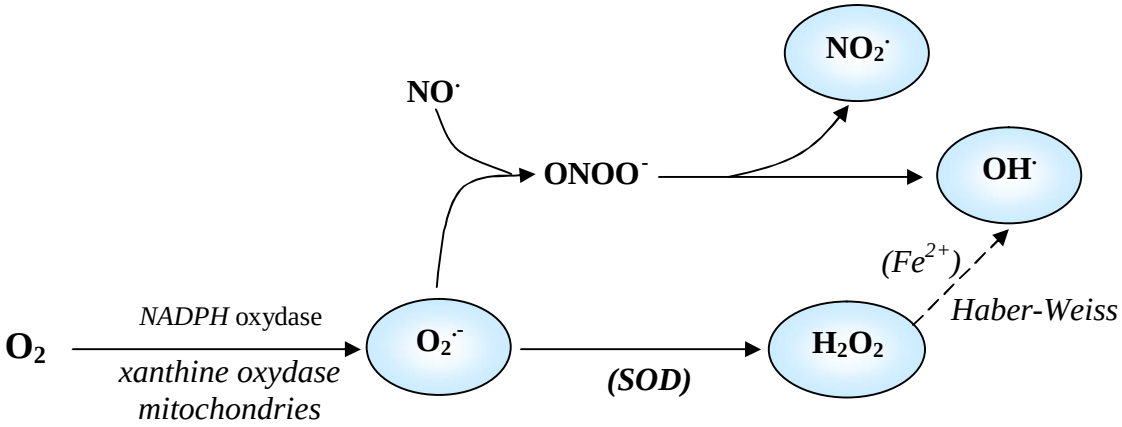


Figure 2 : Production de ROS dans la cellule (Januel, 2003).

Le peroxyde dôhydrogène (H_2O_2) 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 dôhydrogène est formé secondairement par la dismutation de lôanion superoxyde :

$$2\ O_2^{\cdot-} + 2\ H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

La dismutation de $O_2^{Å}$ spontanée ou catalysée par les superoxydes dismutases est la source majeure de H_2O_2 (Park *et al.*, 2007). De plus, H_2O_2 est aussi produit in vivo par différentes oxydases, incluant les aminoacides oxydases est la xanthine oxydase. H_2O_2 nôest pas un radical libre mais a la capacité de générer des radicaux hautement réactifs. Le H_2O_2 peut être réduit suivant la réaction dôHaber-Weiss engendrant alors un ion OH^- inoffensif et un radical hydroxyle $HO^{Å}$ plus agressif (Januel, 2003) :

$$H_2O_2 + O_2^{Å} \longrightarrow O_2 + OH^- + HO^{Å}$$

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

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow HO^{Å} + OH^{-} + Fe^{3+}$$

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 dôhydrogène sur les liaisons insaturées (Januel, 2003).

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

Lors dôun 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, lôADNé directement à leur contact (Koechlin-Ramonatxo *et al.*, 2006).

Lôattaque 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 dôéchange, de barrière et dôinformation (Davies, 2000).

La toxicité des ROS sôexerce 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, lôhistidine, sur lesquels le radical $OH^{Å}$ sôadditionne, 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, lôoxydation par les radicaux libres conduit à la formation de ponts disulfures, donc à lôagrégation 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 $OH^{Å}$, mais aussi lôanion superoxyde $O_2^{Å}$, sôattaquent également aux protéines des tissus de soutien, comme le collagène du tissu conjonctif. Lôoxydation 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.

LôADN est également une cible majeure des ROS. Les radicaux $O_2^{Å}$ et $OH^{Å}$ provoquent des lésions de lôADN. Ceux-ci peuvent en effet interagir avec les désoxyriboses de lôADN mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques. Ces altérations structurales lorsquôelles ne sont « réparées » entraînent à long terme des altérations géniques : cassures chromosomiques, mutations, délétions, amplifications, à lôorigine dôun 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 lôathérosclérose au cancer en passant par le diabète, le SIDA ou toutes les maladies à caractère inflammatoire (arthrite rhumatoïde, endotoxémie, é) (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Quelques pathologies du stress oxydant.

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

$$2\ O_2^{\cdot -} + 2\ H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

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:

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2\ H_2O + O_2$$

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 (Reichheld *et al.*, 2005; Schrader *et al.*, 2006). Les réactions mises en jeu sont les suivantes:

$$ROOH + 2\ GSH \xrightarrow{GPx} ROH + GSSG + H_2O$$

$$H_2O_2 + 2\ GSH \xrightarrow{GPx} 2\ H_2O + GSSG$$

ROH :
ROOH :
GSH : Glutathion réduit
GSSG : Glutathion oxydé

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 clefs 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, lôorganisme peut fabriquer ses propres antioxydants à partir des nutriments suivants qui se trouvent dans la nourriture et les suppléments nutritionnels tel que lôacide 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 lôorganisme, dont : vitamine C, vitamine E, polyphénols (flavonoides, taninsé), caroténoïdes mixtes comme lôalphacarotène, le bêta-carotène et le lycopène (Serrano et Klann, 2004 ; Edeas, 2006).

A. La vitamine C

La vitamine C empêche lôoxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs dôespèces réactives de lôoxygène (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 lôacide ascorbique et que sans cette synergie, les tocophérols sont inactifs (Carr *et al.*, 2000). Lors de lôinitiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, lôŬ-tocophérol (Ŭ-TocH), connu comme inhibiteur de la propagation lipidique, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO_2, 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 péroxydase) qui intervient dans la protection contre les espèces oxygénées réactives. Il semble impliqué dans lôélimination 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 détoxication serait responsable des effets anti-cancéreux et anti-vieillissement, 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 lôinduction de protéines antioxydants comme les métallothionéines. Le zinc protège également les groupements thiols des protéines. Le zinc peut inhiber partiellement les réactions de formation dôespèces 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 déclancher des maladies

respiratoires de type allergique chez des personnes prédisposées et sensibles, ou déclancher 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 lôaffection qui a motivé son intervention. Elles sont soit liées à un soin (ou une intervention) ou simplement dues à lôenvironnement 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 lôapparition est favorisée par lôusage des antibiotiques: bactéries à Gram positif tel que *Staphylococcus*, *Enterococcus* et bactéries à Gram négatif comme les *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Klebsiella sp.*,é), *Pseudomonadaceae* (Haxhe et Zumofen, 1999).

La capacité des microorganismes de créer une infection chez lôhomme découle de plusieurs facteurs dont la nature du microbe et la réceptivité de lôhôte (Haxhe et Zumofen, 1999). La sensibilité des malades peut être due à certaines conditions comme lôâge 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 dôimmunodépresseurs, de stéroïdes ou de radiothérapie (Borrel, 2000). La nature mais aussi la taille des cellules sont déterminantes pour les risques encourus lors dôune 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 jusquôaux bronchioles et alvéoles, ne sont pas expulsés facilement lors de lôexpiration.

I.2.2. Les agents antimicrobiens

Un agent antimicrobien ou désinfectant est défini par son pouvoir de tuer des populations microbiennes. On attend dôun 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 sôassurer de lôactivité bactéricide de lôagent 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 dôaction

Les mécanismes dôaction 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, côest à dire quôil entraîne la mort de lôindividu. On le nomme par le suffixe ï CIDE : virucide, bactéricide, fongicide, insecticide. Le second correspond à une inhibition de croissance en présence du produit actif. On le nomme avec le suffixe ï 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 lôeau oxygénée, les halogénés (chlore et iode) et lôoxyde dôéthylène, 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 dôautres.

Les inhibiteurs de croissance avec un effet BIOSTATIQUE comprennent essentiellement les métaux (mercuriels et dérivés du cuivre, du zinc, de lôargent,é) 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, lôaccès 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 lôaction 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. Dégradation 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 dôaction des antibiotiques est connu car ils sont développés en fonction de leur « cible » (**Figure 3**), côest à dire de lœffet destructeur désiré (Ros, 1999). On les classe dôailleurs 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 lôADN.
5. Antibiotiques agissant par inhibition compétitive (exemple dôautres mécanismes).

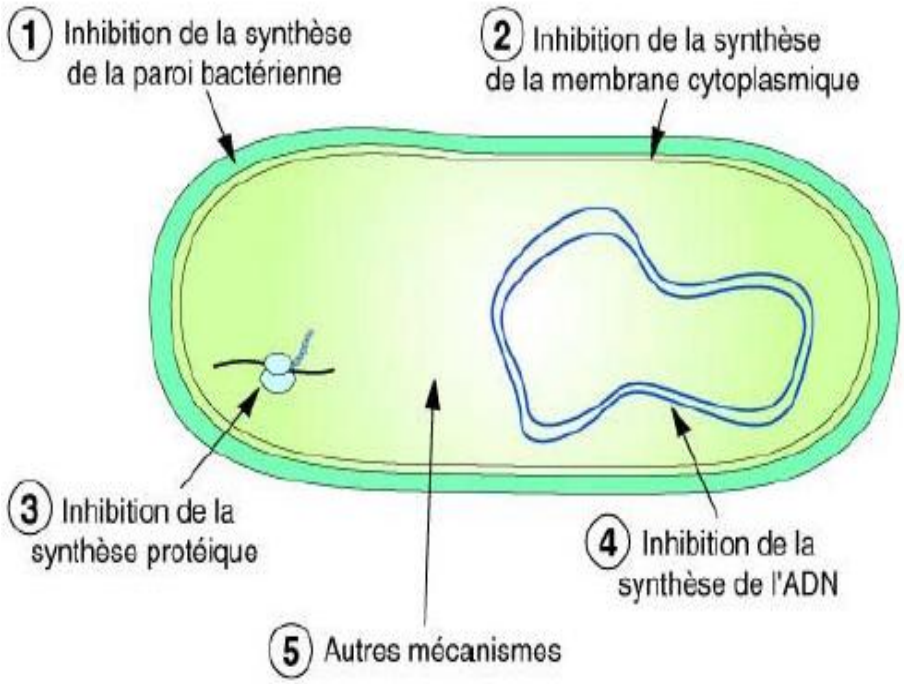


Figure 3 : Cibles de lôaction des antibiotiques (Pibiri, 2006).

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 lôhistoire de la médecine. Mais en raison de lôusage 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 lôéchelle mondiale, un problème dont les conséquences pourraient bien sôavérer 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 quôon commence à utiliser les

antimicrobiens en médecine humaine et que cette résistance « intrinsèque » reflète lôadaptation évolutive des bactéries aux toxines naturelles présentes dans lôenvironnement (Mehrotra *et al.*, 2003). La résistance intrinsèque peut exister pour plusieurs raisons on citant : la cible antimicrobienne normale nôest pas présente dans la cellule bactérienne, nôest pas vulnérable à lôantimicrobien ou ne peut être atteinte par lôantimicrobien. La résistance intrinsèque peut aussi résulter de la présence dôenzymes 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 (Hooper, 2000; Wang *et al.*, 2003; Cheung *et al.*, 2005), alors que la seconde se manifeste quand les bactéries acquièrent les gènes de résistance présents dans dôautres bactéries (Liebert *et al.*, 2000 ; Steinmoen *et al.*, 2002), ce quôon qualifie aussi de résistance « extrinsèque ». Les gènes de résistance peuvent se transférer directement entre les membres dôune même espèce ou à partir dôune 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 dôélargir leur niche unique en colonisant les surfaces et en sôattachant aux récepteurs où vivaient auparavant les bactéries souvent inoffensives ou bénéfiques détruites par lôexposition à lôantimicrobien (Acar et Rostel, 2001).

Les microorganismes possèdent des mécanismes évolués qui leur permettent dôéchapper à lôaction des antimicrobiens. Plusieurs mécanismes de résistance différents ont été décrits dans les bactéries (Opal *et al.*, 2000). Ces mécanismes sont lôinhibition enzymatique, lôimperméabilité de la membrane, les pompes dôefflux, lôaltération du ribosome-cible, lôaltération de précurseurs-cibles de la paroi cellulaire, lôaltération des enzymes-cibles, la surproduction dôenzymes-cibles et des auxotrophes qui contournent les étapes inhibées (Allen

et al., 2006). Certains de ces mécanismes sôappliquent 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 dôefflux polychimiothérapeutiques (Allen *et al.*, 2006). Ces gènes peuvent être nés dans le plasmide dôespèces Gram positives ou codés dans les chromosomes dôespèces 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 ß-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 voix: (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-ß-cétoesters 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 dôautres 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 lôacide benzoïque et les acides phénoliques dérivés de lôacide cinnamique.

Les acides phénoliques simples sont rares à lôexception de lôhydroquinone qui existe dans plusieurs familles végétales (Bruneton, 1993). Les acides phénoliques dérivés de lôacide benzoïque sont des dérivés hydroxylés de lôacide benzoïque comme lôacide vanillique (Haslam et Lilley, 1988). Les acides phénoliques dérivés de lôacide cinnamique ont une distribution très large. Lôacide caféique et lôacide 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 quôils 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 lôhydrolyse chimique ou enzymatique libère un sucre, généralement le glucose, et un acide phénolique. Lôacide phénolique libéré peut être lôacide gallique dans le cas des tannins galliques, lôacide hexahydroxydiphénique et ses dérivés comme lôacide 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 dôunités 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-ɔ-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 lôécorce (Cermak *et al*., 1998 ; Tim Cushnie et Lamb, 2005). Ils diffèrent les uns des autres par le degré dôinsaturation, le mode dôhydroxylation 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 sôaccumulent dans les vacuoles et dans les cellules épidermiques (Bruneton, 1993).

À cause de leur occurrence à beaucoup de plantes mangeables, les flavonoides constituent une composante importante dans la majorité des régimes alimentaires quotidiens (Hendrich, 2006). Les sources communes de flavonoides sont : les oignons, les pommes, les tomates, le vin rouge (quercetine, rutine), le pamplemousse, le thé noir (kaempferol), les graines de soja (genisteine, daidzeine), le persil, le céleri (apigenin) et le thé (catechins) (Hendrich, 2006). Il yôa des flavonoides 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).

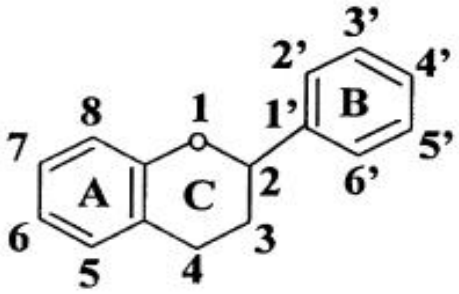


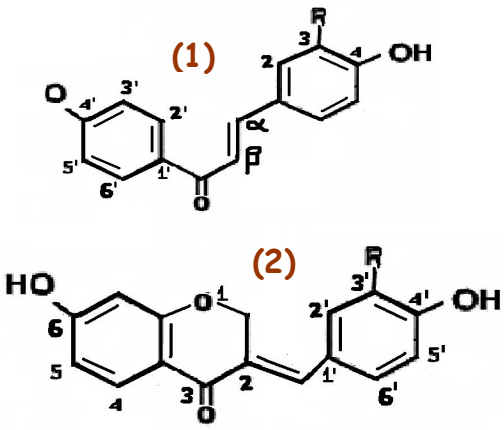
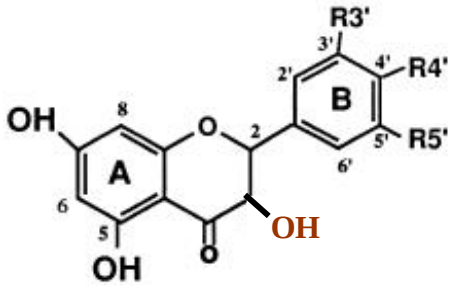
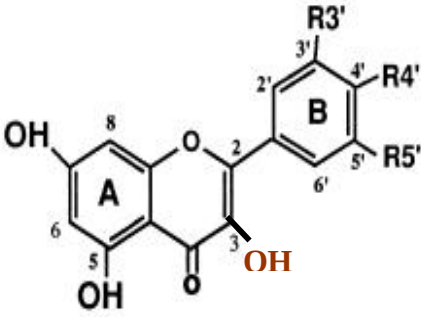
Figure 4: Structure générale des flavonoides (Tim Cushnie et Lamb, 2005)

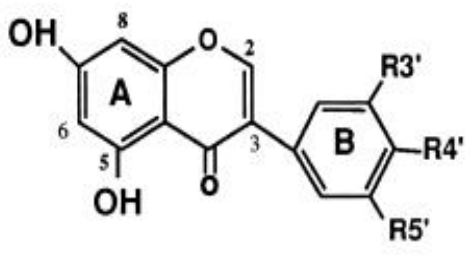
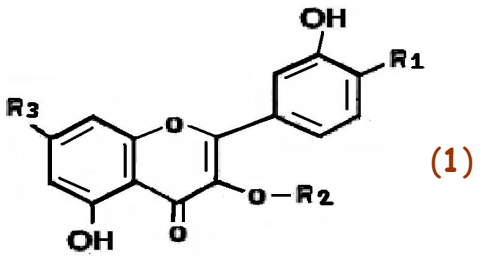
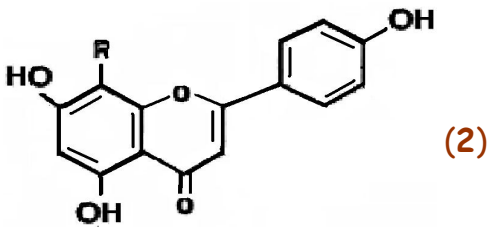
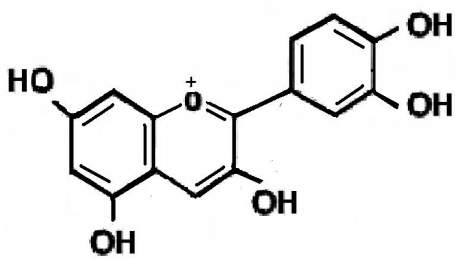
I.3.4.1. Structure chimique et classification

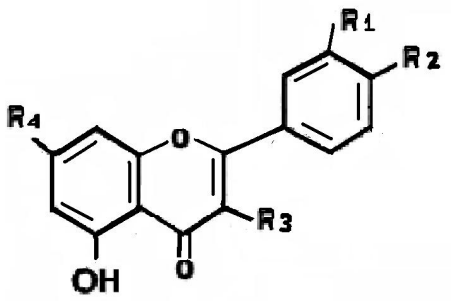
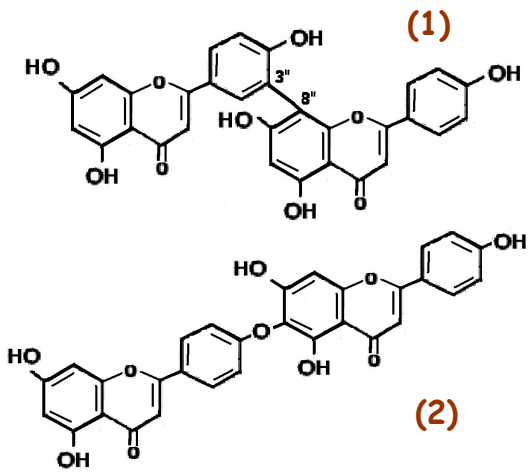
Presque 6500 différentes structures de flavonoides ont été décrites chez les plantes (Harborne *et al*., 2000). A lôexception des chalcones, ces métabolites secondaires sont toujours tricycliques, leur squelette carboné C6-C3-C6 (**Tableau 2**) est caractérisé par la présence de deux cycles benzoïques A et B et dôun 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 flavonoides 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- ɔ -pyrone le coeur de la molécule, on distingue les flavonoides (cycle B est attaché à la position 2 d'anneau C) et les isoflavonoides (cycle B est attaché à la position 3 d'anneau C) (Hendrich, 2006).

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

Classes	Structure chimique	Caractéristiques
Chalcones et Aurones		**-Chalcones** (1): présentent un chainon tricarboné cétonique Ŭ-ƃ-insaturé (Markham, 1982). **-Aurones** (2): lĉhétérocycle comprend deux atomes de carbone. (Harborne, 1994)
Flavanones et Flavanonols		**-Flavanones et Flavanonols :** caractérisés par lĉabsence de la double liaison C2-C3 (Lee *et al.*, 1994). **-Les Flavanonols** diffèrent des **flavanones** par la présence de groupement hydroxyles en C3 (Pierpoint, 1986).
Flavones et flavonols		**- Flavones et Flavonols :** caractérisés par la présence de la double liaison C2-C3 (Formica et Regelson, 1995). **- Flavonols** : possèdent en plus un groupement hydroxyle en C3 (Formica et Regelson, 1995).

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

Flavonoïdes sulfatés	 **R_1=R_2=R_3=R_4=OSO_3**	- **Flavonoïdes sulfatés** : flavonoïdes hydrosolubles, caractérisés par la présence de 1 à 4 résidus sulfates liés aux groupements hydroxyles du phénol ou du sucre (Varin *et al.*, 1987).
Biflavonoïdes		-**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).

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 lôéther 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 lôéthanol, le méthanol, le butanol, lôacétone, le diméthylsulfoxide, lôeau, 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 flavonoides

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 synthéase, de trois molécules de malonyl CoA, provenant du méthabolisme du glucose, avec un acide cinnamique lui-même formé par la voie de lôacide shikimique (Hahlbrock, 1981 ; Markham, 1982). Le produit immédiat de la réaction de condensation de la chaîne latérale de lôacide cinnamique ou de lôacide parahydroxycinnamique avec les trois unités dôacétate est une naringénine chalcone (Hahlbrock, 1981). Les deux grandes voies de biosynthèse aromatique sont donc mises en î uvre pour constituer chacune des parties du squelette C6-C3-C6. Côest à partir de lôacide cinnamique ou de lôacide parahydroxycinnamique provenant de la désamination de la phénylalanine ou de la tyrosine respectivement, que sôédifie cet enchaînement en C15. Dôautres 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 flavonoides

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 flavonoides 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 dôinhiber plusieurs enzymes tel que la télomérase, glutamate dehydrogenase, cyclooxygenase, lipoxygenase, xanthine oxidase, la matrice metalloproteinases, cytochrome P450 et les activités d'enzyme sulphotransferase, en affectant des sentiers de transduction de signal et le fait dôinteragir en avec sirtuins (Mandel *et al*., 2006 ; Zini *et al*., 2006).

De plus, les polyphénols sont capables dôinhiber 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 flavonoides 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 glycosylation protéinique, moduler les activités de la paraoxonase, myeloperoxydase et la thyroïde peroxidase, 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'Ŭ-tocophérol par réduction du radical Ŭ-tocophéryl peut contourner à leur activité antioxydante (Rice-Evans, 1995). Les flavan-3-ols peuvent régénérer l' Ŭ-tocophérol par le transfert d'un atome d'hydrogène au radical a-tocopheryle (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 vitaminique (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 dœexemple les activité anti-inflammatoires, anti-allergiques, antihypertensives (Middleton et Kandaswami, 1993; Rice-Evans, 2001), antivirales (Nijveldt *et al.*, 2001 ; Narayana *et al.*, 2001), antifongiques, antibacteriennes (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 lœinhibition 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 lœorganisme (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 flavonoides 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 microbien (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 utilisées contre les pathologies fongiques de lôhomme. Il y a un grand intérêt dans lôutilisation des flavonoides 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 dôactivité antibactérienne chez les flavonoides. Ainsi, le retrochalcone licochalcone C (4,4ô-dihydroxy-2ô-methoxy-3ô-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-dimethoxy flavone a une CMI de 50 µg / ml contre *Staphylococcus epidermis* (Iniesta-Sanmartin *et al.*, 1990). De nouveau, la substance 5,7,2ô,6ô-tetrahydroxy-6-prenyl-8-

lavandulyl-4ô-methoxy-flavanone inhibe complètement la croissance de *S. aureus* à des concentrations entre 1.56 et 6.25 µg / ml (Iinuma *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 lôhôpital (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 flavonoide 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 lœffet 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). Lôhydroxy flavonoide normal inhibe la croissance seulement dans les concentrations au-dessus de 5 ppm et certains étaient ineffectifs 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/methoxy dans la série de flavonoide 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* (2ô,4ô-dihydroxy-6ô-methoxy-3ô,5ô-dimethyl-chalcone) et le (2ô,4ô-dihydroxy-6ô-methoxy-5ô-methylchalcone) inhibent la croissance de *Cladosporium cucumerinum* (Gafner *et al.*, 1996). De nouveau, deux nouveaux flavanes caractérisés du carex, *Mariscus*

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

Pourtant, la propriété des flavonoides qui a été récemment explorée été l'activité antivirale, notamment contre le virus dôimmunodéficience humain (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-rihydroxy-flavone 7-glucuronide) à partir *Scutellaria baicalensis* (Li *et al.*, 1997). D'autre flavonoides sont inhibiteurs aux enzymes exigées pour la réplication virale. Deux biflavones, robusta flavone et hinoki flavone, sont actifs contre la transcriptase inverse du VIH-1avec les valeurs d'IC50 de 65 µM (Lin *et al.*, 1997b). Aussi, la quércetine 3-(2ôô-alloylar-abinopyranoside) isolé d'*Acer okamatoanum*, est actif contre VIH-1 intégrasse avec une valeur d'IC50 de 18.1 µg / ml (Kim *et al.*, 1998).

En fait, la quércetine appliquée à une concentration de 5 µg / ml a provoqué l'inhibition de 70 % de développement de lésion local du virus sur la plante testée *Chenopodium quinoa* (Harborne et Williams, 2000). La quércetin 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, lôéther et dans les huiles végétales et minérales. Lorsquôelles 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 dôautres 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 dôhuile 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 naturelles 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 isoprèniques (C10) (**Figure 5**). Ils sont les molécules les plus représentatives, constituant 90 % des huiles essentielles et permettent une grande variété de structures.

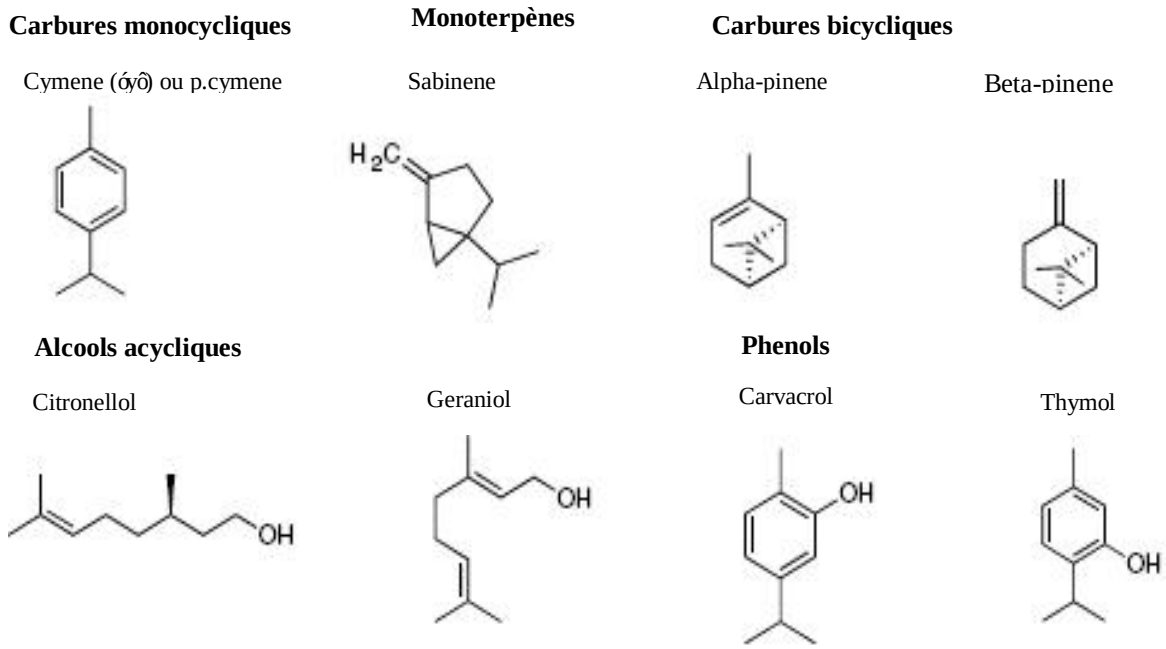


Figure 5: Structure chimique de certains monoterpènes.

B. Les sesquiterpènes: Ils sont formés par l'assemblage de trois unités isoprèniques (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 du 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).

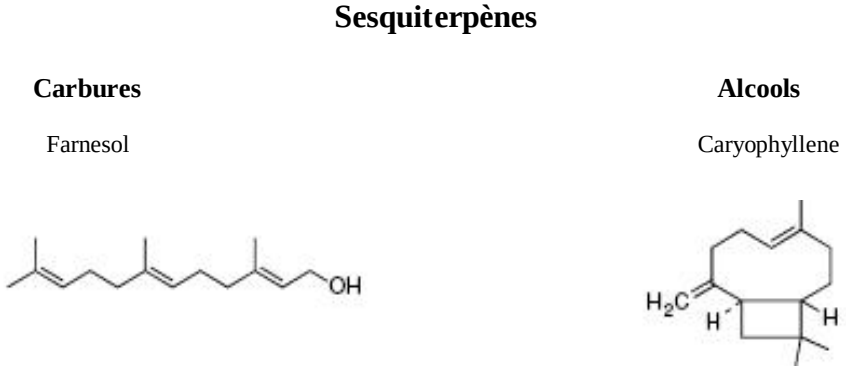


Figure 6: Structure chimique de certains sesquiterpènes.

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 propènylphénols, 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, lôhuile de cinnamom avec cinnamaldehyde comme un composant majeur et eugenol comme un composant mineur, aussi lôhuile 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).

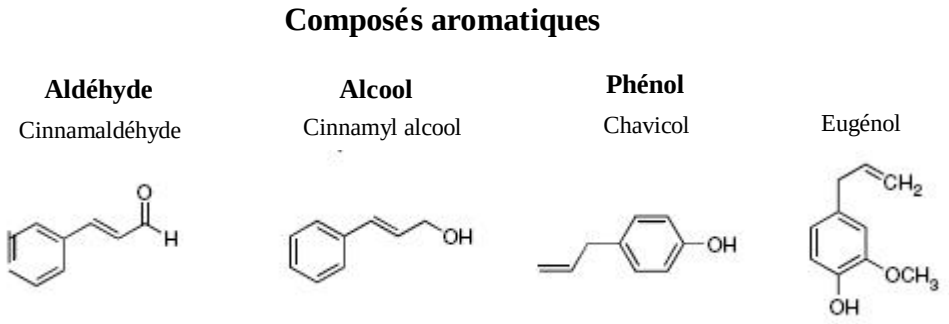


Figure 7 : Structure chimique de certains composés aromatiques.

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, antifungiques, et comme des insecticides et aussi les protègent contre les herbivores en réduisant leur appétit pour de telles plantes. Elles

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, elles sont utilisés dans lôembalment, 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-limonene, 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 lôhuile végétale ou dans les bains, mais le plus souvent dans lôaromathérapie. 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 (Hajhashemi *et al.*, 2003; Perry *et al.*, 2003 ; Silva *et al.*, 2003).

I.4.4. Activité antimicrobienne des huiles essentielles

Empiriquement reconnues depuis des siècles, la confirmation scientifique de lôactivité antimicrobienne des huiles essentielles est récente. Elle ne date que du début du siècle dernier avec les travaux du Dr GATTEFOSSE, le père de lôaromathérapie en France. Depuis ce temps, lôutilisation des huiles essentielles sôest développée jusquôà devenir depuis plus dôune vingtaine dôannées, une sérieuse alternative à la médecine des antibiotiques dans les pathologies infectieuses (Pibiri, 2006).

Lôactivité 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 musés, et elle est naissante pour traiter la qualité de lôair dans les constructions urbains (Seigniez et Pibiri, 2001).

Plus spécifiquement, plusieurs études ont montré lôapparition de fuites dôions potassium K+ de cellules microbiennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) en contact avec du Tea-tree (*Melaleuca alternifolia*). Il sôagit 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 lôosmose chimique sont bien la preuve dôune 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 on citant : *Staphylococcus aureus* en contact avec des huiles essentielles riches en monoterpénols et en phénols (Franchomme et Pénoël, 1990), des cellules dô*Escherichia coli* visiblement très endommagées par lôOrigan 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*.

A la manière des agents chimiques, on distingue deux sortes dôeffets des huiles essentielles sur les microorganismes une activité létale (bactéricidie) et une inhibition de la croissance (bactériostase). Lôactivité 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 dôautres ou nôavoir aucun effet (Hermal, 1993). Côest pour cela quôil est important de mentionner la dénomination complète ainsi que le Gram des microorganismes ainsi que lôespèce botanique et le chémotype de lôhuile essentielle.

Les bactéries à Gram positif seraient plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries à Gramï (Zaika, 1988). Cette affirmation nôa cependant pas été confirmée par dôautres 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 quôen 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

Lôactivité biologique dôune 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 hydrocarbones 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). Lôeffet des terpènoïdes 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 (Ŭ-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 dœélectrons et réagir avec des composés nitrés vitaux pour la bactérie : protéines et acides nucléïques (Franchomme et Pénoël, 1990).

Les phénols : sont responsables de dégâts irréversibles au niveau de la membrane. Le thymol et lœugénol sont responsables de lœactivité 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 dœions potassium K+. En revanche elle nœest 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 lœintégralité de lœactivité ; la totalité de la composition chimique doit être prise en compte (Cosentino *et al.*, 1999).

Lôactivité antimicrobienne des huiles essentielles et des composés chimiques isolés est qualitativement identique. Cependant il existe des différences quantitatives. Certaines études ont montré que lôactivité (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 Thyms. Lôaldéhyde 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 lôinhibition de lôhuile essentielle mais les autres composés minoritaires ont pour effet de diminuer lôeffet 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, poudreé), ou sous forme de principes actifs pures. 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, ladyôs seal et siyah akasma.

I.5.1.1. Description

Tamus communis L. (**Figure 8**) appartient à une famille de jumelage et des plantes grimpantes 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 tubéreuses 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 lôorigine dôune baie subsphérique. Les fruits sont de petites baies rouges brillantes à maturité, juteuses et de 12 mm de diamètre, à peine aussi gros quôune cerise anglaise.



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

I.5.1.2. Distribution géographique

Le tamier commun vie dans différents endroits ou se croit sous forme de rangés dôarbustes. Il se trouve particulièrement dans les forêts montagneuses dôhauteur 1600m. Seulement quatre espèces de la famille Dioscoreaceae sont natales en Europe : *Dioscorea*

balcanica Kosanin, Borderea pyrenaica Miegeville, 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 lôAsie (Iran) et dans le Sud Ouest dôAfrique (Tutin *et al.*, 1980), concernant le Maroc et lôAlgérie 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 Moult, 1983). Comme un irritant externe, Black Bryony a toutefois été utilisée avec profit, et il a été autrefois très employé.

Les enquêtes phytochemiques précédentes ont révélé la présence de spirostane et de furostane glycosides (Aquino *et al.*, 1991), stérols (Capasso *et al.*, 1983), l'histamine (Schmidt et Moult, 1983) et hydroxy/alkoxy phenanthrenes et dihydrophenanthrenes (Reisch *et al.*, 1969, 1972, 1973; Aquino *et al.*, 1985a, b), avec ces principes actifs surtout lôhistamine et des saponosides dérives de la diosgénine, cette souche servit encore, jadis, comme purgatif et comme diurétique (Kovacs *et al.*, 2007). On continue à lui reconnaître le statut dôantinévralgique (en usage externe, notamment pour soulager les patients souffrant de lumbago ou de rhumatismes) et on attribue à son suc des propriétés rubéfiantes renforçant lôactivité 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 lôhypertrophie 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 rubefacients 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 dôannuelles ou de vivaces herbacées, dont la Carduncelle bleue ou le kendjar 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 ï pinnatifides, les supérieurs sessiles-amplexicaules ou dentées-épineuses (Mioulane, 2004). Les fleurs sont bleues, en capitules

terminaux solitaires (3 cm de large sur 3 ï 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 lôaigrette (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 lôAsie (Mioulane, 2004), dôOrient, mais répandues depuis dans le reste de lôAsie, en Afrique du Nord, en Australie même et dans les deux Amériques, ainsi quôen 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), ß carotène, Acide linoléique, Mueller Hinton Agar (Fluka). Tripyridyl-Triazine (TPTZ), gomme arabique, Bleu de Coomassie Brillant (CBB) G250, acrylamide, N, N methylène bis-acrylamide, N,N,N',N'-Tetramethyl ethylene diamine (TEMED), bleu brillant R250, Tween 40, Sodium dodecyl sulphate (SDS), persulfate d'ammonium, glycérol, ß-mercaptoéthanol, glycine, Na_2HPO_4, NaH_2PO_4, $K_3Fe(CN)_6$, $FeCl_3$, $AlCl_3$,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), Doxycyline (Dot), Cloramphénicol (Cmp), Gentamicine (Gen), Erythromycine (E), Amoxicilline + Acide clavulanique (AMC), Penicilline (Pen), Cefazoline (CZ), Amoxicilline (AMX), Lincomycine (Lin), Sulfamides Forts (Suf), Cefotaxime (CTX), (Bioï 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 ï LKB.

II.2. Techniques

II.2.1. Techniques d'extraction

Après l'identification des deux plantes, 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. Apres le séchage les racines sont broyées à lôaide dôun mortier (Hawen) et estoquées une semaine dans des flacons bien fermé à 4 °C avant lôutilisation.

II.2.1.1. Extraction des flavonoides

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) quôest basée sur le degré de solubilité des flavonoides dans les solvants organiques. Pour obtenir lôextrait brut les broyats des racines ont été soumises à une extraction par un mélange hydroalcoolique méthanol / eau. Ce dernier a subi un fractionnement par une série dôextractions avec des solvants à polarité croissante (Hexane Ÿ Chloroforme Ÿ Acétate dôéthyle) (**Figure 10**).

L'extraction des flavonoides 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 lôacétate dôéthyle pour obtenir une phase organique qui représente lôextrait dôacétate dôéthyle 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 lôutilisation.

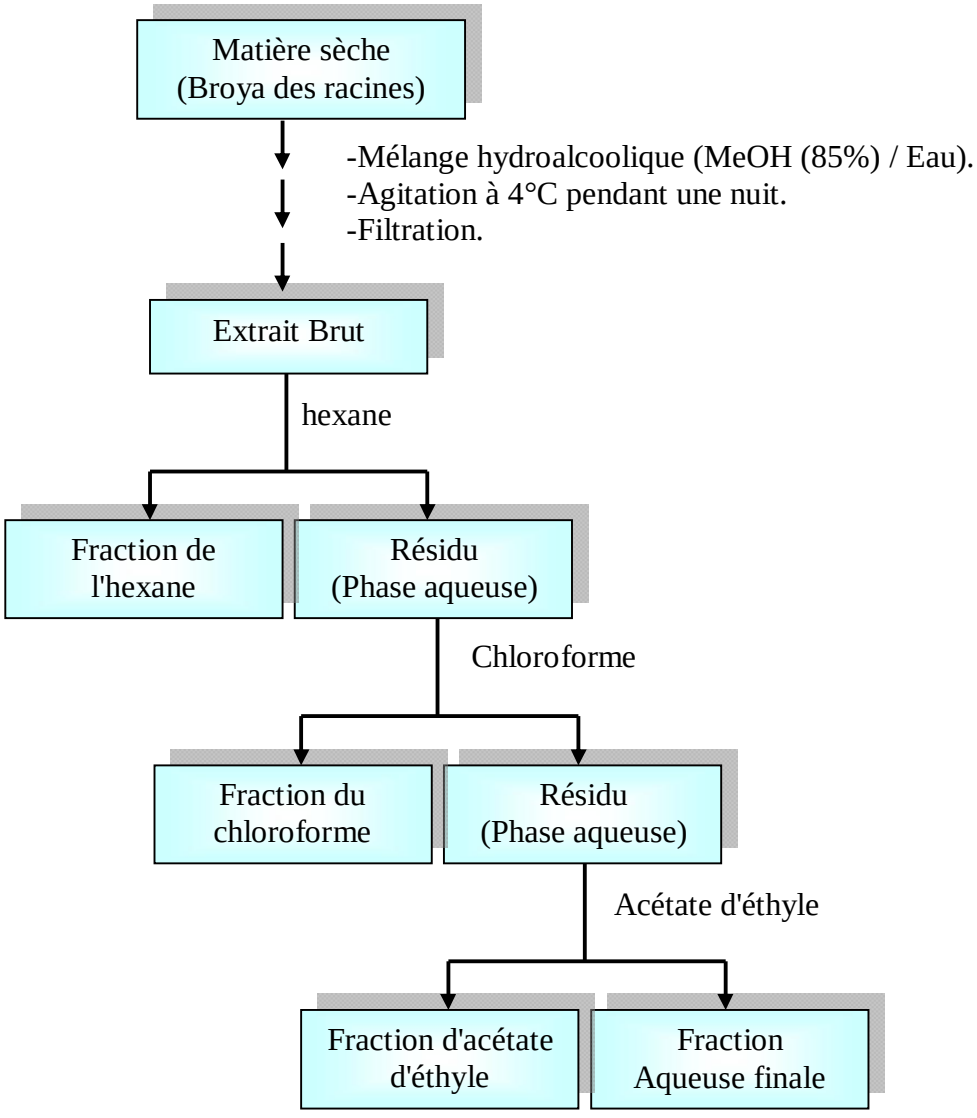


Figure 10: Les étapes d'extraction des flavonoides par les solvants organiques

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 surnagent 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 (Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 25mM, pH 7.4). Enfin l'extrait protéique est conservé à -20°C jusquà lutilisation.

II.2.1.3. Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles de nos plantes sont extraites en 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 labri de la lumière et la chaleur.

II.2.2. Etude quantitative

II.2.2.1. Dosage des polyphenols

Le dosage des polyphenols 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 K3Fe (CN)6 (0.016 mol/l) et de 1 ml de FeCl3 (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 µg/ml) (**Figure 11**). Les résultats du dosage sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de lyophilisat.

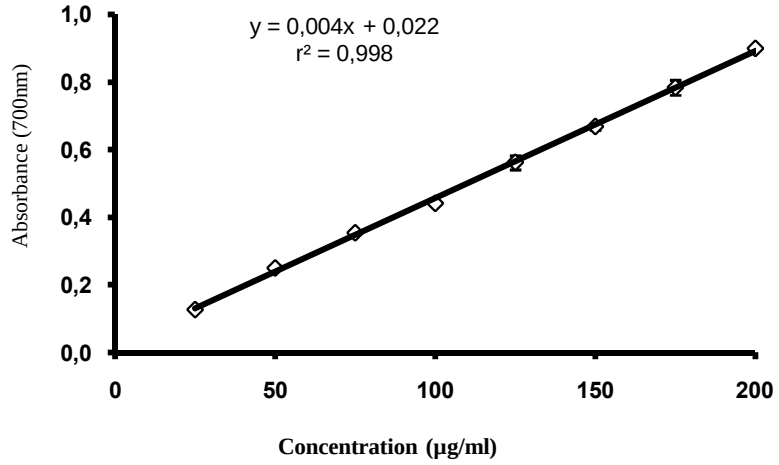


Figure 11: Gamme étalon de l'acide gallique avec le réactif du bleu de Prusse (Moyenne ± SD, n = 3).

II.2.2.2. Dosage des flavonoides

La détermination quantitative des flavonoides 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 AlCl3 (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 µg/ml) (**Figure 12**) pour calculer la concentration des flavonoides dans chaque extrait. Les résultats du dosage sont exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine ou de rutine par gramme de lyophilisat.

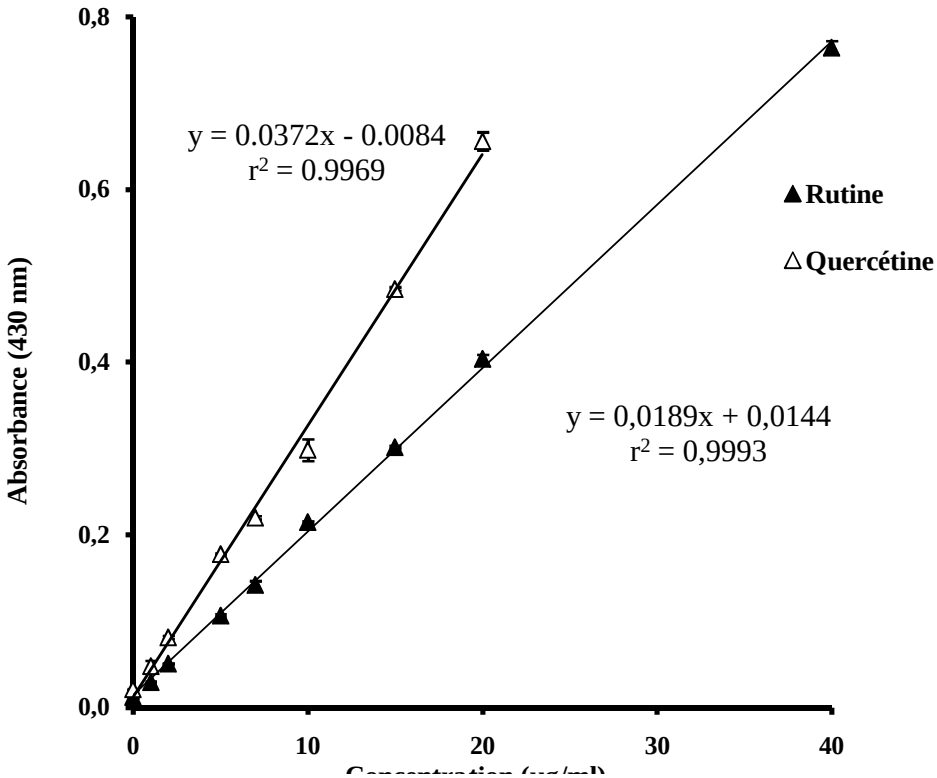


Figure 12: Gamme étalon de la quercétine et de la rutine avec le réactif de l'AlCl3 (Moyenne ± SD, n = 3).

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). Lôaddition du SDS au réactif proposée par Macart a pour effet de diminuer l'intensité de coloration.

Le réactif (2 ml) est ajouté à l échantillon (100 µl) convenablement dilué et mélangé au vortex. L'absorbance est mesurée à 595 nm contre un blanc contenant 100 µl H_2O et 2 ml de réactif. Une courbe étalon est constituée avec l'alumine 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**).

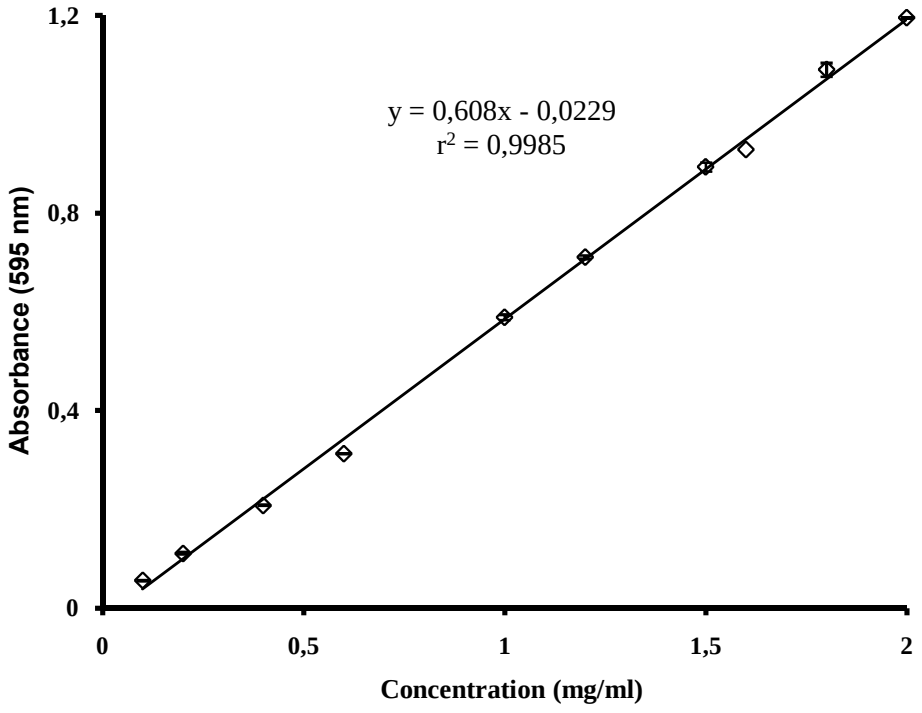


Figure 13: Gamme étalon de l'albumine bovine avec le réactif de Macart (Moyenne ± SD, n = 3).

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

Lœélectrophorèse 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 dœammonium. Le gel de regroupement (5 %) est préparé à partir de 4.876 % dœacrylamide 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 pendent 5 min avant d'être déposés. La quantité de protéine à déposer est généralement de 5-15 µg / puits.

Après le dépôt des échantillons, lœélectrophorèse 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 jusquœà ce que les échantillons pénètrent dans le gel de séparation. L'ampérage est ensuite augmenté à 40 mA. Lœélectrophorèse est arrêtée lorsque lœindicateur (bleu de bromophénol) est à un centimètre du bas du gel. Le gel est démoulé, fixé dans une solution dœacide 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 % H_2O). 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 corresponds aux bandes obtenues sur le gel de lœlectrophorèse sont calculés à partir dœune courbe étalon (**Figure 14**) de poids moléculaires standards, tracée par les logarithmes diximaux des poids moléculaires (Log(M.W.)) en fonction des rapports frontaux (Rf).

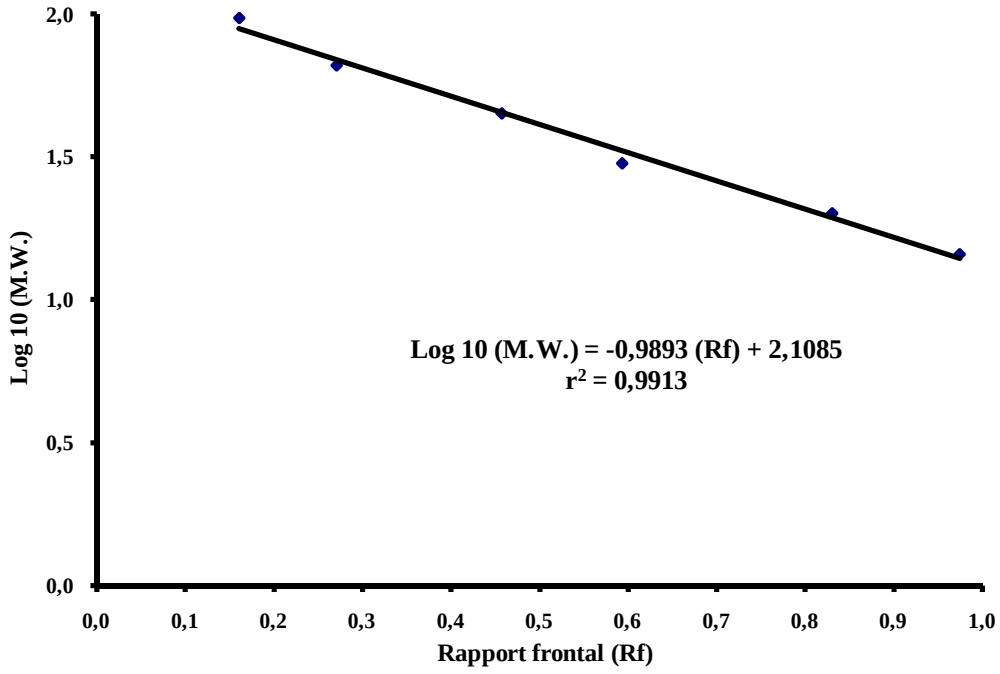


Figure 14 : Courbe étalon des poids moléculaires standard**.**
M.W. : Molecular Weight (Poids moléculaire).
Rf: Rapport Frontals

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

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

Cette méthode est basée sur la réduction d'un radical libre très stable; le 2,2'-Diphenyl-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 disparut 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_{blanc} ï $A_{échantillon}$)/A_{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 (IC_{50}) est calculée à partir d'un graphe du pourcentage d'inhibition contre la concentration des extraits.

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

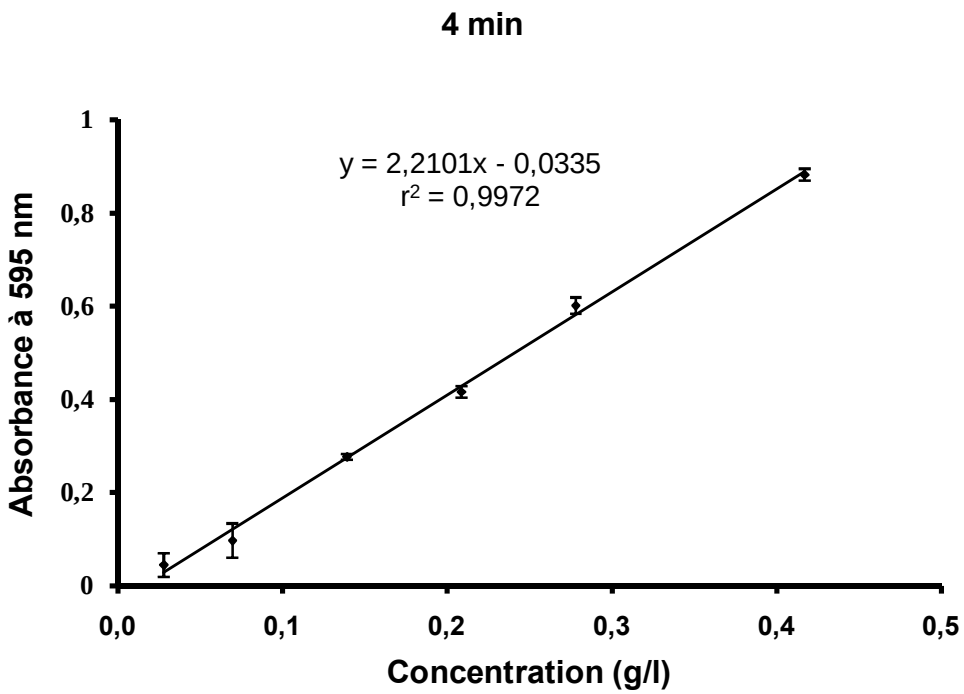
Dans cet essai, la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition des composés organiques volatils et les diene hydroperoxydes conjugués qui surviennent d'oxydation de l'acide linoléique (Dapkevicius, Venskutonis, Van Beek, & Linssen, 1998). Le mélange réactif (ß-carotène/acide linoléique) contient la ß-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 lôacide tannique), avec le hydroxytoluene butylé (BHT) comme contrôle positif, et avec un blanc qui se soit le méthanol ou lôeau. Après cette période dôincubation, 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)

Lôessai 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 $FeCl_3,6H_2O$ (20mM) et 25ml du tampon acétate (300 mM dôacétate de sodium, pH conduit à 3,6 par lôacide acétique). 900µl du réactif FRAP, préalablement incubé à 37°C, sont mélangés avec 90µl dôeau distillée et 30µl de lôéchantillon (avec dilutions appropriées). La dilution finale des solutions dôéchantillons dans le volume final est de 1/34. Lôaugmentation de lôabsorbance à 595 nm est ensuite suivie pendant 30 minutes à 37°C. Les lectures sont effectuées contre lôeau distillée et les absorbances des blancs du réactif (les 30 µL dôéchantillon sont remplacés par de lôeau bidistillée) et des échantillons (absorbances des échantillons avec dilutions appropriée sans le réactif FRAP) sont soustraites de lôabsorbance finale. Une gamme du $FeSO_4,7H_2O$ (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 $FeSO_4,7H_2O$, et représente la concentration du standard ou de lôextrait présentant la même absorbance que celle du $FeSO_4,7H_2O$.

Le paramètre EC1 (concentration équivalente 1), des extraits et standards est calculée à 4 et 30 minutes. LôEC1 est défini comme la concentration de lôantioxydant qui donne une réduction du TPTZ équivalente à 1 mM du $FeSO_4,7H_2O$; côest la concentration de lôantioxydant donnant une augmentation dans lôabsorbance à 593 nm équivalente à la valeur théorique de lôabsorbance donnée par une concentration de 1 mM du $FeSO_4$ déterminée par lôéquation de régression correspondante.

A



B

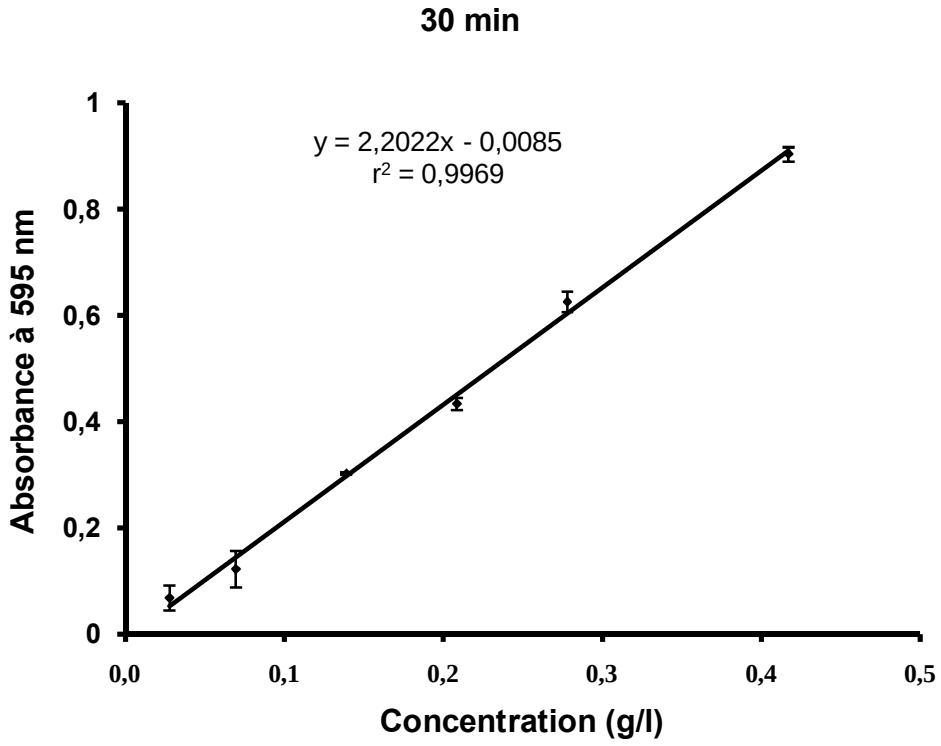


Figure 15: Gamme dôétalonnage du $FeSO_4 7H_2O$ (A) : à 4 min, (B) : à 30 min

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 boites de Pétri (9 cm de diamètre) avec un épaisseur de 4 mm, puis les boites 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 lœxcès est éliminé après 2 à 3 min (méthode d'inondation).

A la surface des boites 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 H_2O 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 mé-00thode 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 lœxcès 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 boites inoculées et chacun est injecté par 10 µl de l'huile essentielle (Gulluce *et al*., 2003).

Après 24 heurs 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 ± SD, à lœxception des résultats de dosage des polyphénols totaux et des flavonoides qui sont exprimés en moyenne de trois ± 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 lôextrait 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 dôextractions avec des solvants à polarité croissante (Hexane (délipidation) Ÿ Chloroforme Ÿ Acétate dôéthyle). Cette extraction a permis dôobtenir quatre extraits : lôextrait brut (**E.Br**), lôextrait du chloroforme (**E.Ch**), lôextrait dôacétate dôéthyle (**E.Ac**) et lôextrait aqueux (**E.Aq**). Le calcul des rendements par rapport aux poids total de broyats (100g), montre que le rendement de lôE.Br du *T. communis L* est de (8.052 ± 0.53%), suivi par lôE.Aq qui représente le rendement le plus élevé (5.559 ± 0.650%) en comparaison avec lôE.Ch (1.126 ± 0.67%) et lôE.Ac (0.430 ± 0.33%) (**Tableau 03**). Suivant les mêmes observations, lôE.Br du *C. caeruleus L* (**Tableau 03**) représente (9.185 ± 1.005%) du poids total de broyat, lôE.Aq (6.837 ± 0.785%), lôE.Ch (0.570 ± 0.049%) et enfin, lôE.Ac avec un rendement de (0.181 ± 0.043%).

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé selon la méthode du bleu de Prusse modifiée par Graham (1992). Lôacide gallique a été utilisé comme standard (**Figure 11**) et la teneur en polyphénols totaux est exprimée en milligramme dôéquivalents dôacide gallique par gramme dôextrait (**mg EAG/g dôextrait**). Les résultats du dosage des polyphénols (**Tableau 03**) montrent que lôE.Br du *T. communis L* contient 24.756 ± 6.663 mg dôéquivalent dôacide gallique/g dôextrait et lôE.Ch représente la fraction phénolique la mieux significative (78.222 ± 2.251 mg/g) puis lôE.Ac (61.432 ± 9.466 mg/g) et avec une faible teneure dans lôE.Aq qui ne contient que (4.669 ± 0.62 mg/g).

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 dôextrait) pour les polyphénolset en (mg EQ/g dôextrait ou mg ER/g dôextrait) pour les flavonoides.

Extrait	Rendements (%)		Flavonoids [2]				Polyphenoles [1]	
			[a] (mg ER/g dôextrait)		[b] (mg EQ/g dôextrait)		[c] (mg EAG/g dôextrait)	
	C. caeruleus	*T. communis*	*C. caeruleus*	*T. communis*	*C. caeruleus*	*T. communis*	*C. caeruleus*	*T. communis*
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
E.Ch	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.Ac	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
E.Aq	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, *Tc : Tamus communis L. Cc : Carthamus caeruleus L.*

[a] mg dôéquivalent dôacide gallique par gramme dôextrait

[b] mg dôéquivalent de quercétine par gramme dôextrait

[c] mg dôéquivalent de rutine par gramme dôextrait

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

En ce qui concerne les extraits du *C. caeruleus L*, la teneure en composés phénoliques est relativement faible par apport à celle des extraits du *T. communis L* or lôE.Br contient 12.537 ± 0.678 mg dôéquivalent dôacide gallique /g dôextrait ; presque la moitié de celle de lôE.Br du *T. communis L*. Cependant, lôE.Ac constitue la fraction la plus riche en polyphénols parmi les extraits du *C. caeruleus L* (37.739 ± 1.312mg/g) tandis que lôE.Ch ne contient que (18.061 ± 1.205mg/g). LôE.Aq prend une quantité double de celle de lôE.Aq du *T. communis L* (9.879 ± 0.399 mg/g).

Les flavonoïdes ont été dosés par la méthode du trichlorure dôaluminium (Bahorun *et al.*, 1996) en utilisant comme standard la quercétine et la rutine (**Figure 12**). La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme dôéquivalents de quercétine ou rutine par gramme dôextrait (**mg EQ/g dôextrait** ou **mg ER/g dôextrait**). La détermination des taux de flavonoïdes (**Tableau 03**) révèle, que pour le *C. caeruleus L*, lôE.Ch est le plus riche en flavonoides par apport aux autres extraits, suivi par lôE.Ac. Cependant, des faibles quantités sont trouvées dans lôE.Br et lôE.Aq. Par contre, lôE.Ac du *T. communis L* est le plus riche en flavonoides 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 (Mahmood *et al*., 2003) et (Khan *et al*., 2003) avec quelques modifications. Cette extraction est réalisée par lôinfusion 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 lôalbumine 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 (à le double) que celle trouvée dans les racines du *C. caeruleus L* (0.694 ± 0.31 g/l).

Lœextrait 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 lœextrait du *T. communis L* et deux bandes pour lœextrait du *C. caeruleus L*. Les poids moléculaires des protéines corresponds aux bandes obtenues sur le gel de lœélectrophorèse sont calculés à partir dœune courbe étalon (**Figure 14**) de poids moléculaires standards, tracée par les logarithmes diximaux des poids moléculaires (Log 10 (M.W.)) en fonction des rapports frontaux (Rf). Les poids moléculaires sont approximativement 41.100, 15.400, inférieur à 14.400 KDa pour le *T. communis L* et 22,600, 17,200 KDa concernant le *C. caeruleus L*.

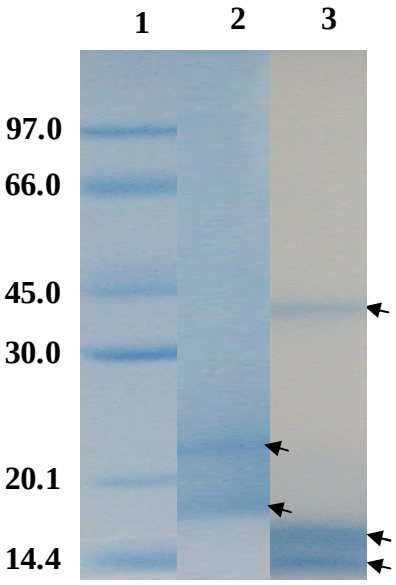


Figure 16 : Electrophorèse (SDS-PAGE) des protéines extraites à partir des racines du *Tamus communis L.* et celles du *Carthamus caeruleus L.*

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

2 : Protéines du *Carthamus caeruleus L.*

3 : Protéines du *Tamus communis L.*,

III.1.3. Extraction des huiles essentielles

Lœextraction 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 ± 0,0188 %) est presque la même que celle comprise dans les racines du *T. communis L.* (0,0228 ± 0,0043 %).

III.1.4. L'activité antioxydante des différents extraits

Pour évaluer lœeffet antioxydant des extraits des deux plantes, trois techniques ont été réalisées : La technique du 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), la technique de la ß-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 dœhydrogène. Une solution du DPPH dans le méthanol est caractérisée par une couleur violette intense qui absorbe la lumière à 517 nm. Lœabsorbance diminue et la couleur disparue 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 dœinhibition (réduction) du DPPH (**I %**), calculé selon la formule suivante :

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

Or, **A** $_{\textbf{blanc}}$ 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** $_{\textbf{échant}}$ cêst l'absorbance de l'extrait avec le réactif (50 µl dûne dilution de lôextrait + 5 ml de la solution du DPPH).

Les résultats obtenus (**Figure 17 : A, B et C**) montrent que tous les extraits et les standards réduisent dûne manière dose-dépendante le radical DPPH, cêst à dire le pourcentage de réduction (ou dôinhibition) du DPPH augmente avec la concentration des extraits, jusquôà un seuil où le pourcentage dôinhibition se stabilise avec lôélévation de la concentration des extraits. Cependant, lôE.Pr des deux plantes et de lôalbumine bovine se sont précipités au cours de la réaction avec le réactif du DPPH.

La concentration dûun extrait ou dûun standard provoquant 50 % dôinhibition ou de réduction du DPPH (IC_{50}) est calculée à partir de la partie linéaire des courbes de pourcentage dôinhibition 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**).

LôE.Ch du *T. communis L* semble avoir lôeffet inhibiteur le plus puissant sur le radicale DPPH, parmi les différents extraits des deux plantes, avec une IC_{50} de 18.889 ± 0.441 µg/ml, suivi par lôE.Ac du *T. communis L* (34.342 ± 1.261 µg/ml) puis lôE.Ch du *C. caeruleus L* (52.396 ± 1.448 µg/ml). Les valeurs des IC_{50} des différents extraits (**Tableau 04, A**) montrent que les pouvoirs inhibiteurs de lôE.Aq du *T. communis L* et lôE.Ac du *C. caeruleus L* sont les plus faibles. Cependant, les trois autres extraits ; lôE.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 ± 5.650, 246.382 ± 4.359 et 220.007 ± 2.731 µg/ml) pour lôE.Br/Tc, lôE.Br/Cc et lôE.Aq/Cc respectivement.

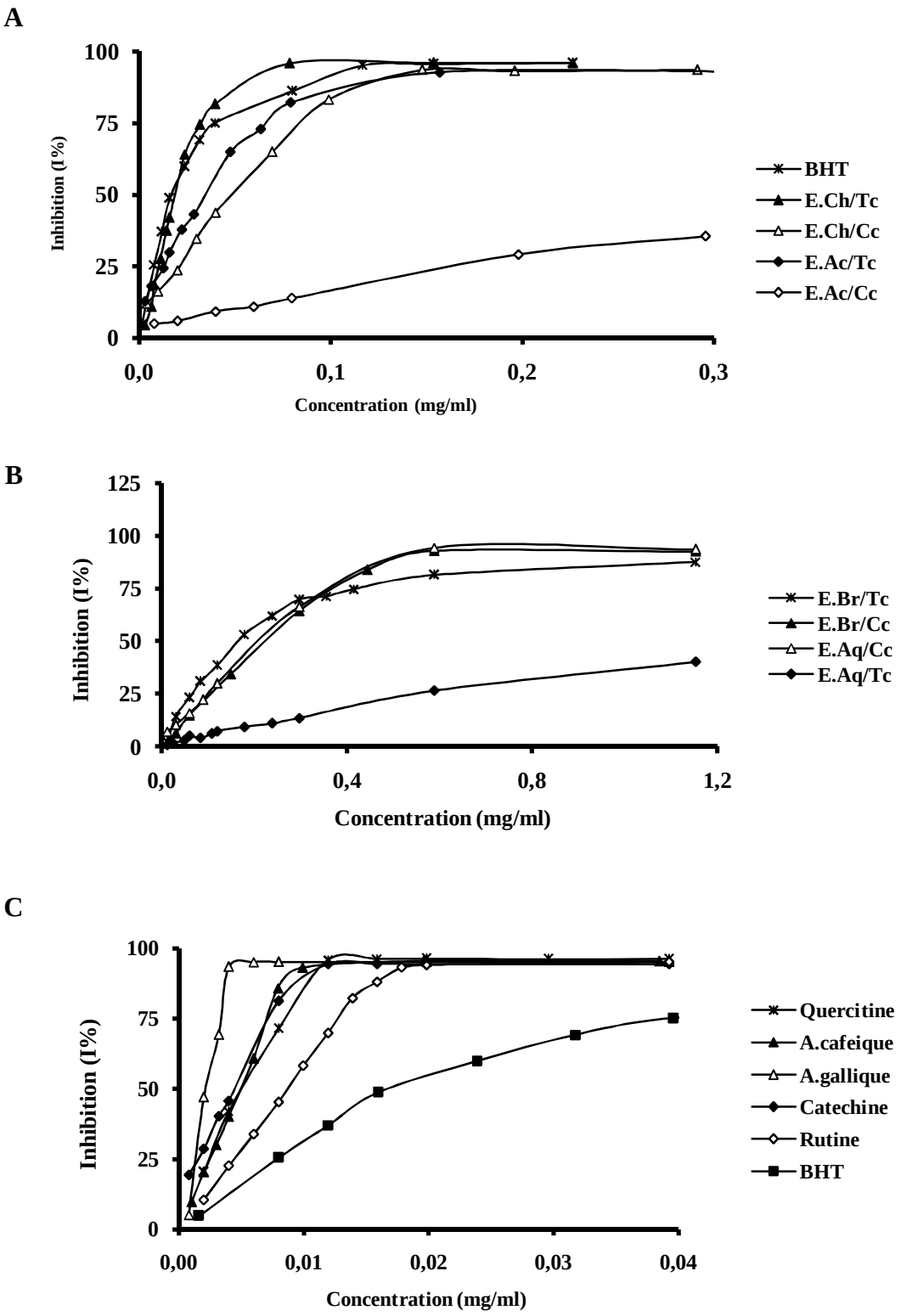


Figure 17 : le pouvoir antioxydant évalué par la technique du DPPH ; **A** : des extraits du *T. communis L* et du *C. caeruleus L* insolubles dans lôeau, **B :** des extraits solubles dans lôeau, **C :** des polyphénols standards, BHT : contrôle positif, (I % = la moyenne de 3 valeurs ± SD).

En comparaison avec le BHT comme contrôle positif, lœffet inhibiteur des différents extraits des deux plantes est moins important que lœffet du BHT sauf lœE.Ch du *T. communis L*, qui représente un effet identique à celui du BHT (IC_{50}=18,620 ± 0.852 µg/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 lœimportance de lœffet inhibiteur du BHT et de lœE.Ch du *T. communis L* par apport aux autres extraits. Le graphe C traduit la puissance de lœffet 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 lœordre suivant: A. Gallique (2.389 ± 0. 291 µg/ml) < Catéchine (4.392 ± 0.113 µg/ml) < A. Caféique (5.105 ± 0.023 µg/ml) < Quercétine (5.395 ± 0.170 µg/ml) < Rutine (8.621 ± 0.309 µg/ml).

Tableau 04: Les valeurs dœIC_{50} en microgramme par millilitre, (**A**) : des différents extraits et (**B**) : des standards testés. BHT : un contrôle positif (IC_{50} = 18.620 ± 0.852 µg/ml, R^2 =0,960), (IC_{50} = la moyenne de 3 valeurs ± SD).

A

Extraits	IC_{50} (µg/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} (µg/ml)	2.389 ± 0. 291 R2 =0.968	5.395 ± 0.170 R2 =0,972	8.621 ± 0.309 R2 =0,997	5.105 ± 0.023 R2 =0,996	4.392 ± 0.113 R2 =0,994	Précipite

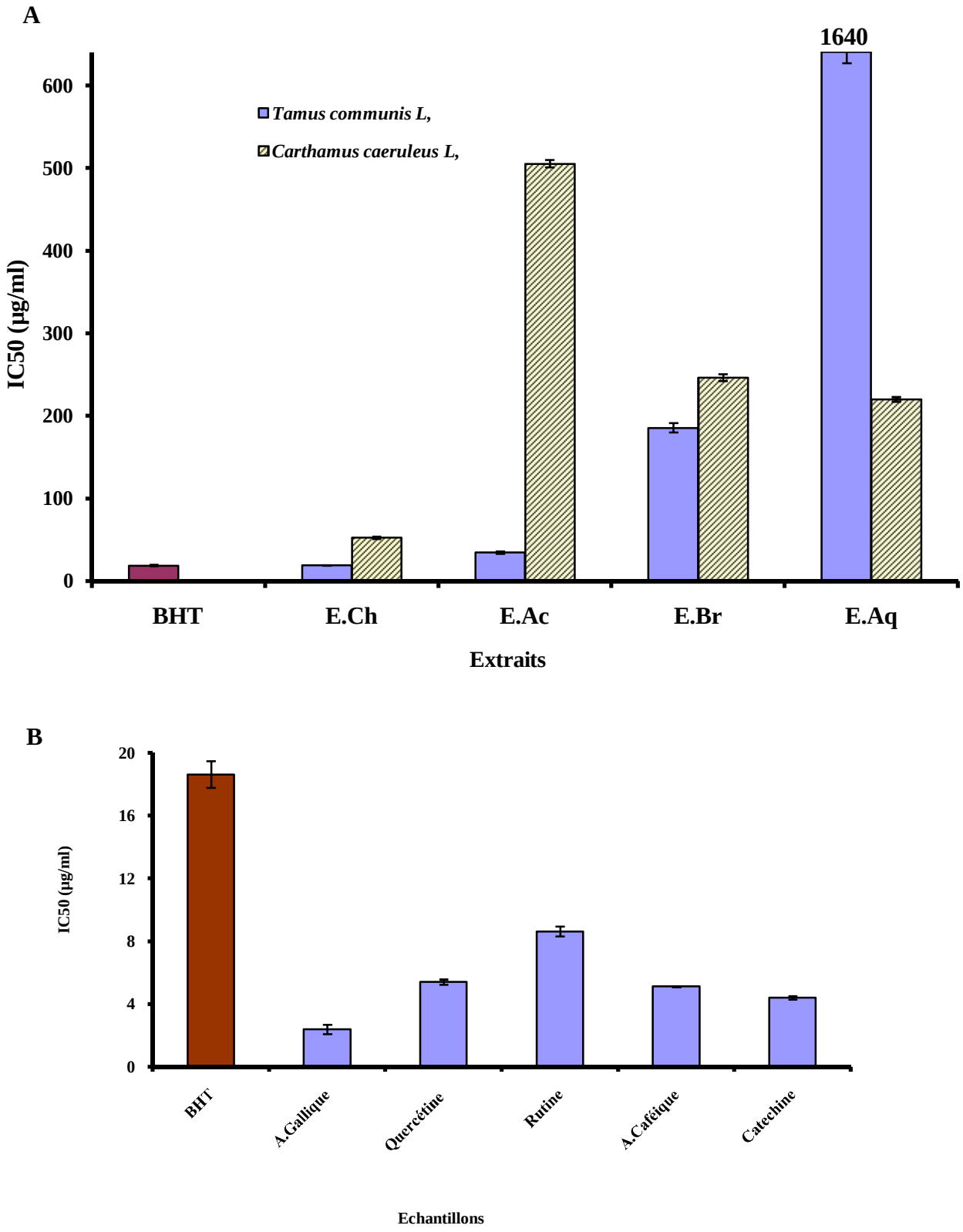


Figure 18 : Comparaison entre les concentrations provoquant 50% dûinhibition (IC_{50}) du radicale DPPH, (**A**) **:** des extraits des racines du *T. communis L.* et *C. caeruleus L*, (**B**) : des polyphénols standards, BHT : contrôle positif, (IC_{50} = la moyenne de 3 valeurs ± SD).

III.1.4.2. Lœeffet antioxydant évalué par la technique de la ß-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 lœessai du ß-carotène, lœacide linoléique produit des hydroperoxydes comme des radicaux libres durant lœincubation. La présence des antioxydants dans les extraits minimise lœoxydation de la ß-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 ß-carotène et lœoxygénation de celle-ci, alors que, le pourcentage dœinhibition est inversement proportionnel à cette dégradation. Lœextrait avec le faible taux de dégradation et le grand pourcentage dœinhibition, possède la forte activité antioxydante.

Les résultats obtenus (**Figure 19 ; A, B et C**) révèlent que touts 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 lœinhibition de cette oxydation. Cependant, le H_2O et le MeOH (contrôles négatifs) présentent une chute très rapide du pourcentage dœinhibition.

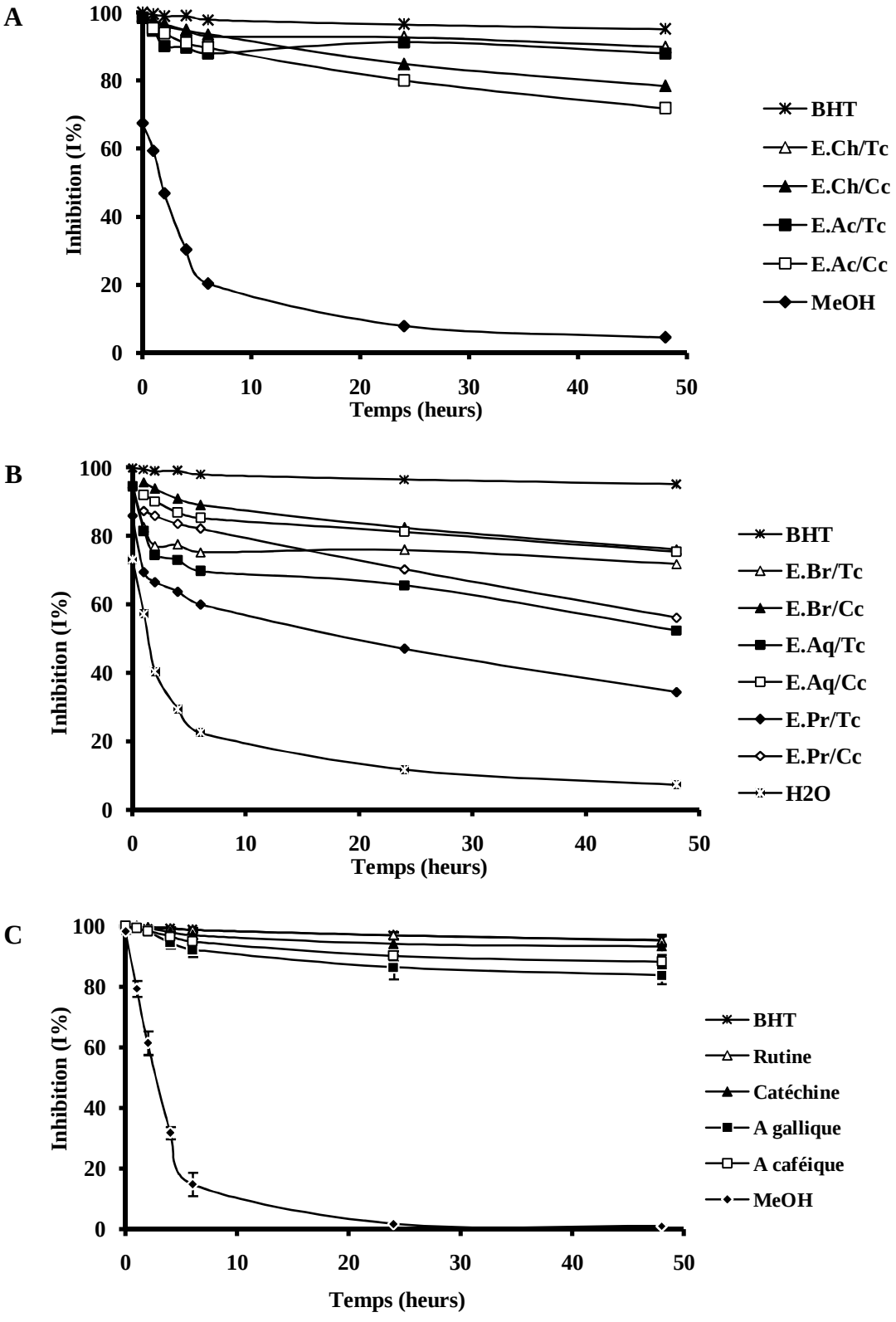


Figure 19 : Cinétique dôinhibition dôoxydation de la ß-Carotène par : (**A**) Les extraits insolubles dans lôeau, (**B**) Les extraits solubles dans lôeau, (**C**) des antioxydants standards.

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

Les extraits insolubles dans lôeau (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 dôinhibition dôoxydation de la ß-Carotène par ces extraits montre lôordre suivant de la puissance antioxydant : lôE.Ch/Tc avec un pourcentage dôinhibition de (89.838 ± 2,043 %) à 48 h, suivi par lôE.Ac/Tc (87.991 ± 1.447 %) puis lôE.Ch/Cc (78.372 ± 1.472 %) et en fin lôE.Ac/Cc avec un pourcentage de 71.854 ± 1.134 % (**Tableau 05, A**). En ce qui concerne les extraits solubles dans lôeau du *C. caeruleus L,* ils montrent ensemble un pouvoir antioxydant puissant par apport aux extraits du *T. communis L*. lôE.Br/Cc possède le pourcentage dôinhibition le plus élevé (75,946 ± 1.236 %) suivi par lôE.Aq/Cc (75,329 0.744 %) puis lôE.Br et lôE.Aq du *T. communis L* avec des pourcentages dôinhibition de 71,786 ± 2,021 % et 52,386 ± 1,507 % respectivement. Ces résultats montre que lôE.Ch des deux plantes et lôE.Ac du *T. communis L* ont un pouvoir antioxydant plus puissant parmi les autres extraits, alors que lôE.Ac du *C. caeruleus L* présente un effet plus ou moins identique à celui de lôE.Br et lôE.Aq de la même plante.

Les pourcentages dôinhibition des standards (**Tableau 05, B**), ont été dans lôordre 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 nôavaient aucun effet sur le radicale DPPH. Le pourcentage dôinhibition effectué par lôE.Pr du *T. communis L* à 48 h, a été 34,411 %. Cependant, lôE.Pr du *C. caeruleus L,* a montré un effet antioxydant plus important que lôE.Pr du *T. communis L* avec un pourcentage dôinhibition à 48 h, de 56,086 % (**Tableau 05, A**).

Tableau 05: Les pourcentages d'inhibition (I %), estimés à 48 heurs. (**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 Fe^{3+}/Fe^{2+} et se produit à un pH faible.

Pour mieux évaluer lôeffet 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-Fe^{3+} en TPTZ-Fe^{2+} 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, lôabsorbance continue à augmenter après 4 minutes de réaction et même double à 30 minutes (cas de la quercétine, la rutine, lôE.Ch/Tc et lôE.Ch/Cc) par contre, la réaction de lôacide ascorbique est stable sans changement apparent dans lôabsorbance 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 lôabsorbance nôaugmente pas après les premières quatre minutes de la réaction.

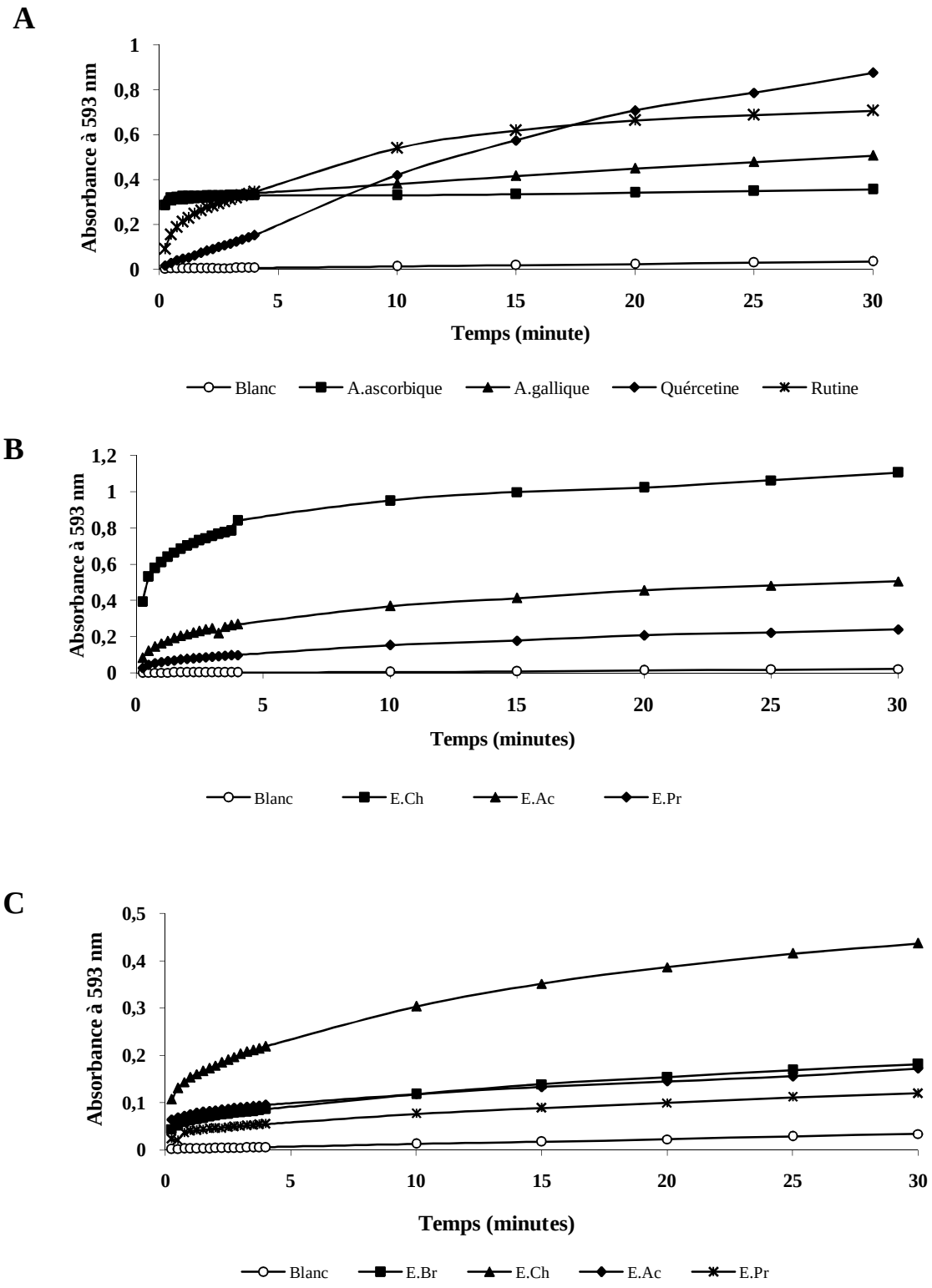


Figure 20: Cinétique de la réduction du TPTZ-Fe^{3+} en TPTZ-Fe^{2+} par (**A**) les antioxydants standards (250µM), (**B**) les extraits des racines de *T. communis L.* (0.8 mg/ml) et (**C**) les extraits des racines de *C. caeruleus L.* (0.5 mg/ml) (n=2).

Le paramètre EC_1 (concentration équivalente 1), des extraits et standards est calculée à 4 et 30 minutes. LôEC$_1$ est défini comme la concentration de lôantioxydant qui donne une réduction du TPTZ équivalente à 1 mM du $FeSO_4.7H_2O$; la concentration de lôantioxydant donnant une augmentation dans lôabsorbance à 593 nm qui est équivalente à la valeur théorique de lôabsorbance donnée par une concentration de 1 mM du $FeSO_4$ et déterminée par lôéquation de régression correspondante.

Les valeurs de la concentration équivalente 1 (EC 1) des antioxydants standards dans le **Tableau 06** (**A**), révèlent que la quércetine possède le pouvoir réducteur le plus élevé par apport aux autres standards utilisés, avec une EC 1 de (257 µM à 4 min et 174.4 à 30 min), suivi par lôacide 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, lôacide 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 lôeffet réducteur le plus puissant en comparaison avec les autres extraits. LôEC 1 de lôE.Ch du *T. communis L.* (0.524 g/l à 4 min et 0.390 g/l à 30 min) est la moitié de lôEC 1 de lôE.Ch du *C. caeruleus L.* Les valeurs des EC 1 des différents extraits sont dans lôordre suivant (**Tableau 06, B** et **C**): lôE.Ch/Tc, lôE.Ch/Cc, lôE.Ac/Tc (2.216 g/l à 4 min et 1.182 g/l à 30 min), lôE.Aq/Cc (6,818 g/l à 4 min et 4,698 g/l à 30 min), lôE.Br/Cc, lôE.Ac/Cc, lôE.Br/Tc et finalement lôE.Aq/Tc. Dôaprès ces résultats, on peut remarquer que les extraits insolubles dans lôeau du *T. communis L* ont le pouvoir réducteur le plus puissant que les extraits du *C. caeruleus L*, alors que cêst le contraire pour les extraits hydrosolubles, or lôE.Br et lôE.Aq du *C. caeruleus L* ont montré un pouvoir réducteur du Fe^{3+} plus puissant que lôE.Br et lôE.Aq du *T. communis L* et plus important ou égale à lôeffet de lôE.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 (µM)	257	399,9	284.56	404.5
EC1 à 30 min (µM)	174.4	200,2	204.62	386.9

B

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

C

Temps	E.Ch	E.Ac	E.Aq
EC1 à 4 min (g/l)	1.537 ± 0.097	7.366 ± 1.054	5.722 ± 0.136
EC1 à 30 min (g/l)	0.812 ± 0.028	3.110 ± 0.334	3.521 ± 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 lôhôpital universitaire de Sétif). Lôactivité 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 lôabsence dôune zone dôinhibition 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 lôeffet antibactérien des polyphénols et des huiles essentielles de nos plantes, on a appliqué deux types dôantibiogramme de diffusion ; lôun par lôutilisation des disques et lôautre 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 boites 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 H_2O comme contrôle négatif et des disques dôantibiotiques comme contrôle positif. Par cette concentration, les extraits et les polyphénols standards nôont aucun effet sur ces souches bactériennes, or, les zones dôinhibition ne dépassent pas le diamètre des puits. Par contre, lôaugmentation de la concentration à 100 mg/ml (6 mg/puit), montre que les extraits solubles

dans lôeau (lôE.Br, lôE.Aq et lôE.Pr) nôont aucun effet sur toutes les souches bactériennes (**Tableau 07**), alors que les extraits insolubles dans lôeau (lôECh, lôEAc) et les polyphénols standards, présentent un effet plus ou moins important contre quelques souches bactériennes.

Les résultats obtenus dans le Tableau 07 montrent que lôE.Ch des deux plantes a le plus grand pouvoir antibactérien en comparaison avec les autres extraits or, lôECh du *T. communis* a la capacité dôinhiber quatre souches bactériennes (*S. aureus, Bacillus sp, E. agglomerans, S. marcescens*) (**Figure 21**) avec des zones dôinhibition comprises entre 10 et 14 mm. LôE.Ch du *C. caeruleus* provoque des zones dôinhibition entre 9 et 18 mm de diamètre contre (*S. aureus, E. Coli, Bacillus sp, K. pneumoniae*) (**Figure 21**). LôE.Ac du *T. communis* a montré des zones dôinhibition contre trois souches bactériennes, entre 9 et 11 mm. Tandis que, les zones dôinhibition provoquées par lôE.Ac du *C. caeruleus L*, ont été contre deux souches bactériennes (09 et 13 mm).

Parmi les polyphénols standards testés, lôacide gallique est le plus actif sur les différentes souches surtout sur le *Bacillus sp* et sur le *S. aureus* avec des zones dôinhibition 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 quércetine sur les même deux souches (11 et 10 mm respectivement). Cependant, le BSA nôa aucun effet sur les différentes souches bactériennes testées (**Tableau 07**).

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.

Echantillons / 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*	*A.gall*	*BSA*	*DMSO*	*H2O*
Bacillus sp	10 ± 0.58	09 ± 0.58	-	-	-	-	-	-	-	-	13	11	19	-	-	-
S. aureus	14 ± 0.58	15 ± 1.00	11 ± 1.00	13 ± 0.58	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-
C. freundii	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-
E. agglomerans	14 ± 1.53	-	10 ± 1.00	09 ± 0.58	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-	-
K. pneumoniae	-	09 ± 1.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-	-
P. aeruginosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	10	12	-	-	-
E. coli	-	18 ± 1.53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-	-
S. typhi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-
S. marcescens	12 ± 0.58	-	09 ± 0.58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-

Tc : *Tamus 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.

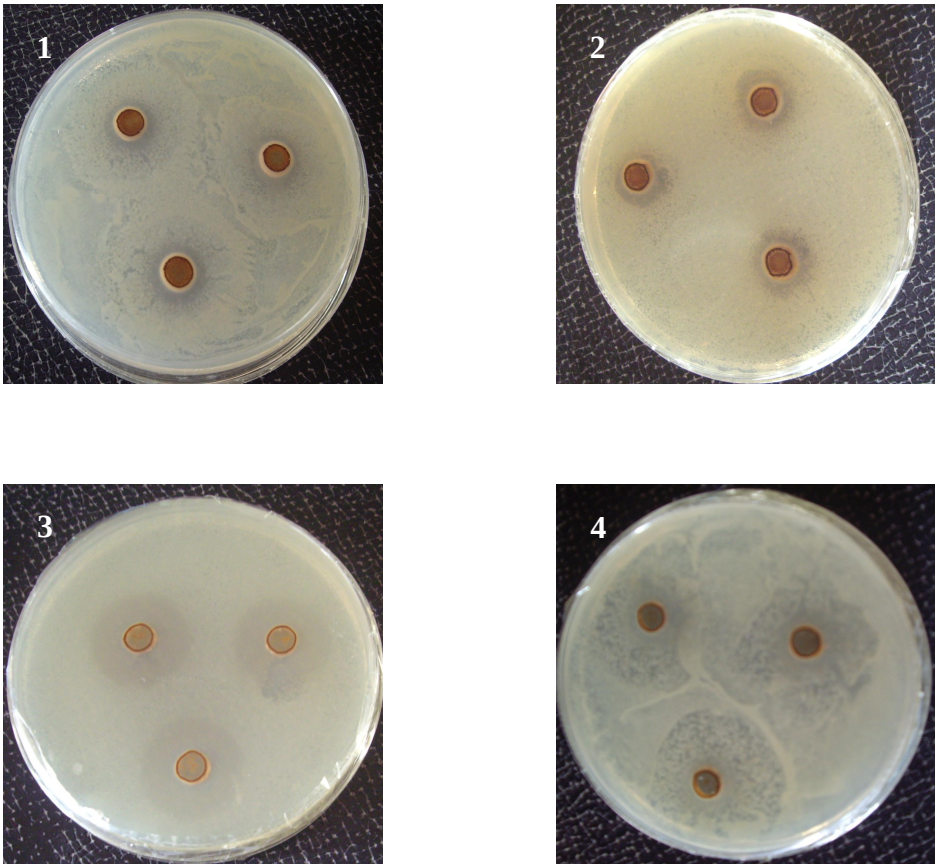


Figure 21: Les zones dôinhibition effectuées par : (**1**) lôE.Ch du *T. communis L* contre le *S. aureus*, (**2**) lôE.Ch du *T. communis L* contre lô*E. agglomerans*, (**3**) lôE.Ch du *C. caeruleus L* contre le *S. aureus* et (**4**) lôE.Ch du *C. caeruleus L* contre lô*E. Coli*. (la méthode des puits de diffusion), (n = 3).

III.1.5.2. Lôactivité 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 dôinhibition 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 dôinhibition étaient dans lôintervalle (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 essentiels des deux plantes, les standards et les contrôles positifs

Souches bactériennes	Huiles essentielles (DD en mm)	
	Tamus communis L	*Carthamus caeruleus L*
Bacillus sp	25 ± 0.00	09
S. aureus	24 ± 1.00	10
C. freundii	21 ± 0.71	09
E. agglomerans	19 ± 1.00	-
K. pneumoniae	19 ± 1.00	08
E. coli	24 ± 0.71	08
P. aeruginosa	-	-
S. typhi	20± 0.00	08
S. marcescens	-	-

(-) : 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), Doxycyline (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

dœefficacité antibactérienne (**Tableau 08**): (**1**) le Nib inhibe toutes les souches testées sauf le *P. aeruginosa* (**Figure 22**). Les zones dœinhibition ont été entre 20 et 22 mm à lœexception du *S. aureus* avec une zone dœinhibition ne dépasse pas 08 mm. (**2**) le Néo inhibe toutes les souches testées à lœexception du *P. aeruginosa* avec des zones dœinhibition comprises entre 11 et 16 mm. (**3**) le PB a montré un effet antibactérien contre toutes les souches testées mais les zones dœinhibition ont été dans lœintervalle (11 ï 14 mm). (**4**) les deux antibiotiques Dot et Cmp ont inhibé les mêmes souches à lœexception de *E. agglomerans, P. aeruginosa* et *S. typhi*. Les diamètres dœinhibition 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 quats souches (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. marcescens*).

Les activités antibactériennes des extraits insolubles dans lœeau (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 nœont 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 touts les extraits, les standards et les antibiotiques examinés (**Figure 22**).

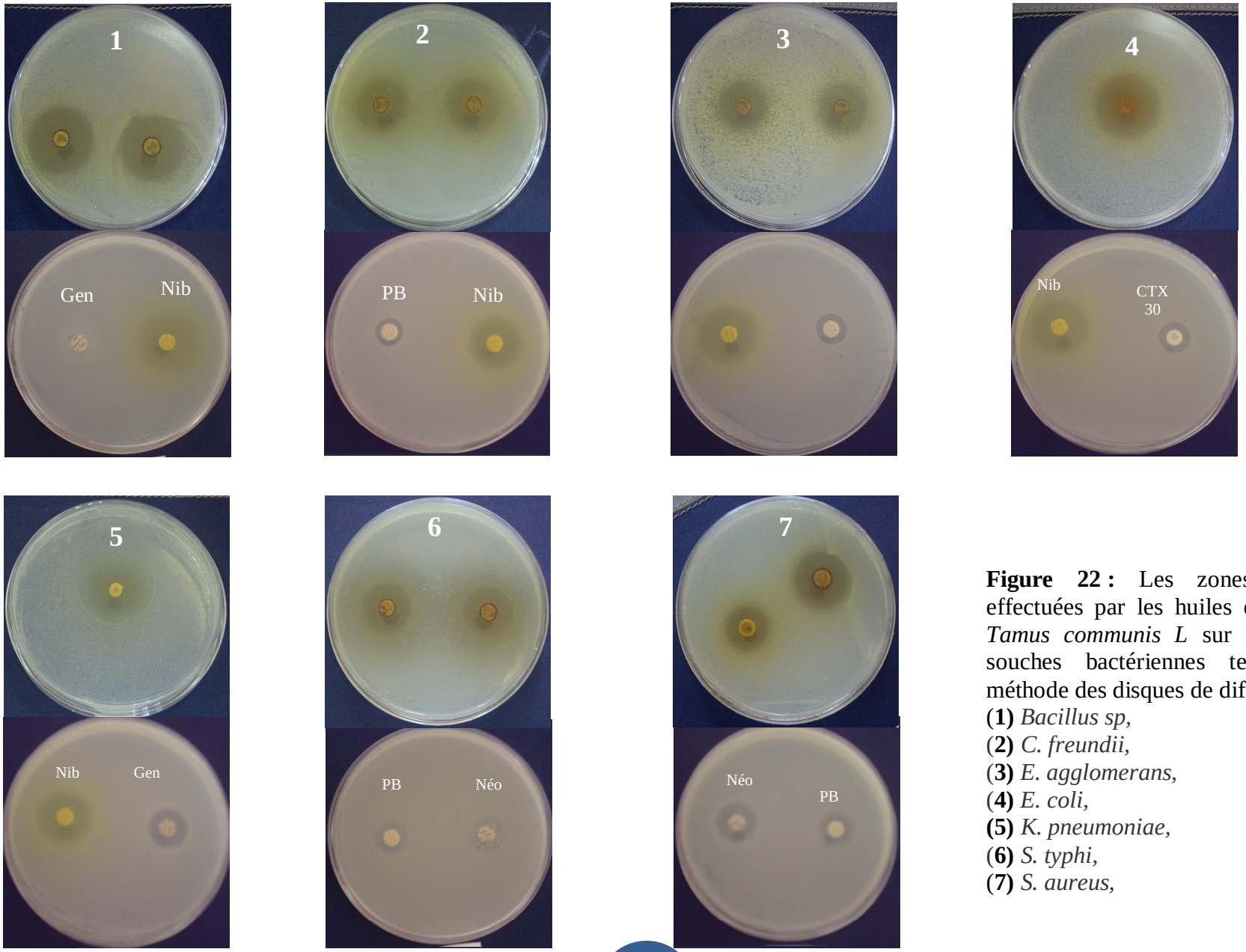


Figure 22 : Les zones d'inhibition effectuées par les huiles essentielles du *Tamus communis L* sur les différentes souches bactériennes testées par la méthode des disques de diffusion:
(1) *Bacillus sp,*
(**2**) *C. freundii,*
(**3**) *E. agglomerans,*
(**4**) *E. coli,*
(5) *K. pneumoniae,*
(**6**) *S. typhi,*
(**7**) *S. aureus,*

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

	Bacillus sp	***S. aureus***	***C. freundii***	***E. agglomerans***	***K. pneumoniae***	***E. coli***	***P. aeruginosa***	***S. typhi***	***S. marcescens***
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 flavonoides dans leurs activités, nous avons choisi une méthode dœextraction basée sur le degré de solubilité des flavonoides dans les solvants organiques (Markham, 1982). Cette extraction a permis dœobtenir trois extraits pour chaque plante en plus de lœextrait brut. Ces extraits présentent des rendements dans lœordre suivant, pour les deux plantes: lœE.Br avec un rendement plus élevé, suivi par lœE.Aq, et avec des faibles rendements pour lœE.Ch et lœE.Ac (**Tableau 07, section résultats**). Ce résultat est concorde avec ceux trouvés par Boumerfeg *et al.* (2009) utilisant la même méthode dœextraction sur les racines du *T. communis*.

Lœutilisation des solvants, avec des polarités différentes dans cette extraction, permet de séparer les flavonoides selon leur degré de solubilité et donc selon leur degré de glycosylation (flavonoïdes aglycones, mono, di, tri et tetra-glycosylés). Dœaprès Newman *et al.* (1997) et Markham (1982), les composés que pourraient contenir les différents extraits préparés serait comme suit; lœextrait brut peut contenir des flavonoïdes, des aminoacides, des terpènes, des cires et des tannins, lœextrait chloroformique riche en flavonoides aglycones, peut contenir aussi des terpénoïdes, lœextrait dœacétate dœéthyle renferme des flavonoides glycosidiques, notamment les mono et les diglycosidiques, des flavonoïdes sulfatés et des coumarines. Finalement, lœextrait aqueux peut contenir des flavonoides 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 polyphenols cêst la méthode modifiée du bleu de Prusse (Graham, 1992). Cette méthode a été retenue vu sa fiabilité, faisabilité et reproductibilité. La détermination des polyphenols totaux montre que la quantité de ces composés dans lôE.Ch du *T. communis*, est relativement importante en comparaison avec les autres extraits, suivi par lôE.Ac, puis lôE.Br et enfin lôE.Aq avec une faible teneur (**Tableau 07 : section résultat**s). Cependant, pour le *C. caeruleus*, lôE.Ac représente la fraction la plus riche en polyphénols avec une teneur double de celle trouvée dans lôE.Ch. Le dosage des flavonoides par la méthode du trichlorure dôaluminium (Bahorun *et al.*, 1996) montre que la fraction chloroformique est la plus riche en flavonoides (18.177 ± 0.156) dans les racines du *C. caeruleus*. Cependant, lôextrait dôacétate dôéthyle 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 dôextraction (lôextrait brut méthanolique fractionné par lôhexane, le dichlorométhane et lôacétate dôéthyle, respectivement) proche de celle quôon 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 dôextrait (mg Equivalent Acide Gallique / g dôextrait), dans la fraction du dichlorométhane entre 24.5 et 173.8 mg EAG/g dôextrait, dans la fraction dôacétate dôéthyle entre 102.4 et 409.5 mg EAG/g dôextrait et dans la fraction aqueuse entre 71 et 211.5 mg EAG/g dôextrait. 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. LôE.Ch de *T. communis* est riche en phénols en

comparaison à lœextrait 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 lœutilisation des parties différentes de plante (feuilles, fleurs, racines ou graines) et des différentes méthodes dœextraction et de dosage, rendent la comparaison difficile entre les deux études du fait que Parejeo et ses collaborateurs ont étudié la partie aérienne des neufs plantes.

La teneur en polyphénols et en flavonoides, peut diffère dœune espèce à une autre et dœun 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 Naczk *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), lœUltraviolet (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 lœaluminium dans le maœs (Kidd *et al*., 2001). Les racines de la plante des maœs qui sont exposées à lœaluminium présentent des quantités plus élevées en composés phénoliques et 15 fois plus élevées en flavonoides lorsque ces racines sont prétraitées par la silicone.

Lœextraction 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 lœE.Pr de *T. communis*. Lœélectrophorèse en présence du (SDS-PAGE) a montré des différences dans les profils protéiques des deux extraits. Il est à noter que lœextrait protéique de *T. communis* présente trois protéines majeures avec les poids moléculaires suivants 38.000, 16.300, 14.400 KDa alors que lœextrait 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 lôE.Br et lôE.Aq présentent un pouvoir scavenger du radical DPPH plus élevé malgré leurs contenus très faibles en polyphénols et en flavonoides en comparaison avec lôE.Ac. On peut observer aussi que les extraits insolubles dans lôeau, 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 lôalbumine 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 flavonoids, les tanins, réduisent et décolorent le radical DPPH par leur capacité en donnant lôhydrogène (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. Lôactivité antioxydante estimée par la technique de la ß-Carotène

Dans la technique de la ß-Carotène, lôacide linoléique produit des hydroperoxydes comme des radicaux libres. La présence des antioxydants dans les extraits minimise lôoxydation de la ß-carotène par les hydroperoxydes. De ce fait, le pouvoir antioxydant des extraits est traduit par leur capacité à stabiliser la ß-Carotène contre lôoxydation 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 ; Sahin *et al*., 2004; Sokmen *et al*., 2004 ; Tepe *et al*., 2005). Cependant, la rutine a montré le même effet que le BHT. Lôordre des antioxydants utilisés comme standard, en terme dôefficacité antioxydante, est le suivant : la rutine, le catéchine, lôacide caféique puis lôacide gallique. Tous les standards ont exprimé un pouvoir antioxydant plus puissant que les différents extraits des deux plantes.

Les extraits insolubles dans lôeau (E.Ch et E.Ac) de *T. communis* sont plus actifs que les extraits hydrosolubles, indiquant lôexistence dôune 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 lôE.Br, lôE.Aq ont présenté des pouvoirs antioxydants plus importants que lôE.Ac ; qui est le plus riche en composés phénoliques. Dô autre part, lôE.Ch de cette plante réserve le premier rang dans la série des extraits de cette plante, en terme dôactivité 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 lôeau, malgré que la teneur en polyphénols, est plus élevée dans les extraits insolubles dans lôeau.

Les extraits protéiques des deux pantes 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-Fe^{3+} en TPTZ-Fe^{2+} 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, lôabsorbance 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 dôhydrogène, 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 Fe^{3+}/Fe^{2+}.

LôE.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, lôE.Ch de *T. communis* est suivi par lôE.Ch de *C. caeruleus* puis lôE.Ac de *T.communis.* Les extraits hydrosolubles de *C. caeruleus* sont plus actifs que lôE.Ac de la même plante et que lôE.Br et lôE.Aq de *T. communis*.

Lôordre des antioxydants utilisés comme standard, en terme dôefficacité réductrice, est en accord avec les résultats de Pulido et ses collaborateurs (2000), qui ont montré que la quercétine représenté lôantioxydant le plus puissant parmi les onze standards utilisés suivi par lôacide tannique, lôacide gallique, lôacide caféique, le BHA, la rutine, Trolox, catéchine,

lôacide ferulique, lôacide ascorbique et enfin le resviratrol. Dans notre étude lôordre des standards est le suivant : la quercétine > lôacide gallique > la rutine > lôacide 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 lôacide ascorbique et le Trolox, et que leur activité dépend de leur taux dôhydroxylation et de conjugaison. Divers autres études ont utilisé la technique FRAP pour évaluer le pouvoir antioxydant total des plantes comestibles (Nilsson *et al*., 2004; Soong et Barlow, 2004; Katalinic *et al*., 2005; Luczaj et Skrzydlewska, 2005).

Les protéines dans cette étude (E.Pr) réagissent lentement avec le complexe TPTZ-Fe^{3+}, 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 Fe^{3+}/Fe^{2+}. Dôautre part, Benzie et Strain, (1996) et Lotito et Frei (2004) ont constaté que cette technique est non adéquate pour la détermination de lôactivité antioxydant de lôacide ascorbique, le glutathion et lôalbumine qui sont concéderais comme des antioxydants plus importants.

III.2.5. Relation entre les composés phénoliques et lôactivité 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 ß-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 testes concéderais complémentaires : l'effet scavenger du DPPH, ß-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-peroxydes et de bons réducteurs du fer ferrique en fer ferreux, quand comparé aux antioxtydants 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, ß-carotène et FRAP) et leurs teneurs en polyphénols et flavonoides. L'effet antioxydant des extraits des deux plantes peut donc être du 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 (Parejo *et al.*, 2003 ; Katalinic *et al.*, 2005 ; Sokmen *et al.*, 2005). 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, quercetine, catéchine, l'acide gallique et l'acide caféique (Nakayama, *et al.*, 1993; Nakayama, 1994). Cette information est confirmée clairement dans notre étude où tous les polyphénoles standards testés (quercetine, 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 on utilisant la méthode de Oyaizu (1986), il 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 piégeur du radical $O_2^{\text{Å}}$, 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 aérobiose est, à coté de sa haute réactivité, un précurseur potentiel du radical hydroxyle hautement destructeur (Grisham et Granger, 1988). Plusieurs recherches ont été consacrées pour lôétude de lôactivité antioxydante des flavonoides (Schubert *et al*., 1999; Casa *et al*., 2000; Kim *et al*., 2001; Rice-Evans, 2001; Schroeter *et al*., 2001; Zhao *et al*., 2004; La Montoro *et al*., 2005). Dans une étude importante, Firuzi et ces collaborateurs (2005), ont estimé lôactivité antioxydante des flavonoides par la technique FRAP, les flavonoides étudiés appartiennent à différentes classes (Flavones, flavonols, flavanones, flavanols, isoflavones). Lôactivité de ces flavonoides est comparée à celle du Trolox, lôacide urique et le resviratrole. Les différents flavonoides testés ont montré une bonne activité en comparaison aux antioxydants connus (resveratrole, Trolox et lôacide urique), avec lôexistence dôune corrélation linéaire entre lôactivité 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 lôactivité antioxydante de 27 flavonoides purifiés à partir différentes plantes. Ces flavonoides appartiennent à cinq sous classes ; sept flavones C-glycosides, un flavone (baicaline), trois flavonols (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 flavonols (IC_{50}= 8.9 ï 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 lôactivité anti- DPPH est forte, mais le nombre des ï OH nôest pas important dans tous les cas. Malgré isovitexine possède trois groupements ï OH, il ne montre aucune activité (IC_{50} >1000 µM) alors que le baicaline ne contient aucun ï 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 ï OH que lôépicatéchine 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 lôactivité scavenger du DPPH.

Les flavoniodes peuvent exercer ces activités antioxydantes par plusieurs méthodes (Tripoli *et al*., 2007) : (1). Activité antiradical OH^{-} (hydroxyl), O_2, $^1O_2$, $O_2^{Å-}$ (superoxide); (2). Activité anti-lipoperoxidation ($R^{Å}$, $ROO^{Å}$, $RO^{Å}$); (3). Activité de chélation des métaux.

De nombreuses études cinétiques sur les réactions de formation et de décomposition du radical aroxyl ont démontrés que la capacité antioxydante des flavonoides est associée à leurs structures chimiques particulières. Trois groupes structurels sont importants dans lôévaluation 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 aroxyl ; (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. Côest évident que la capacité antioxydante des flavonoides est associée à ces éléments de structure chimique, par exemple la présence ou lôabsence dôun glycoside (glycosides or aglycones) et la présence des hydroxyles libres ou le nombre et la position des hydroxyles sont éventuellement estérifiés.

III.2.6. Lôactivité antibactérienne

Dans la présente étude, les activités des extraits méthanoliques, des extraits protéiques, des standarts 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, *Seratia marcescens,* et leurs puissances, sont qualitativement et quantitativement réparties par la présence ou lôabsence dôune zone dôinhibition. Ces zones dôinhibition sont comparées à celles des antibiotiques standard cités dans le (**Tableau 09**, **section résultats**).

III.2.6.1. Lôactivité antibactérienne des extraits méthanoliques et protéiques

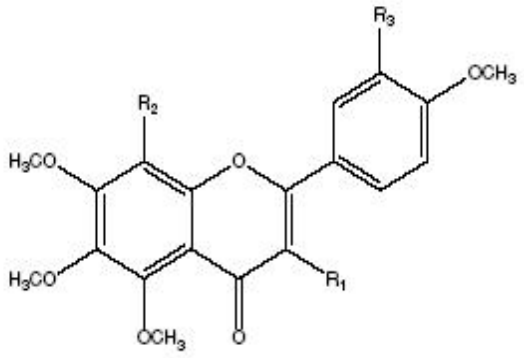
Lôapplication des différents extraits méthanoliques testés sur trois souches bactériennes de référence et six souches de prélèvements divers, a montré que les deux fractions insolubles dans lôeau sont les seuls qui ont présenté une activité contre quelques souches bactériennes des deux Gram, positif et négatif, dans la mesure où lôE.Ch des deux plantes, riche en flavonoides aglycones, possède le spectre dôactivité 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 lôE.Ch du *T. communis* avec des zones dôinhibition (14, 10, 14 et 12 mm respectivement), alors que ; *S. aureus, E. Coli, Bacillus sp* et *K. pneumoniae* ont été inhibées par lôE.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 lôextrait chloroformique dôA*chillea 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 nôa 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 lôalcool permettant une meilleure extraction de composés moins polaires. Dôautre part, lôE.Ch du *C. caeruleus* a présenté une action inhibitrice plus importante sur *E. coli* en provoquant une zone dôinhibition 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, lôactivité antibactérienne la plus importante a été révélée par lôacide 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 lôactivité antibactérienne des extraits méthanoliques polaires et non polaires fractionnés par le chloroforme sur nef souches bactériennes ; *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, *Seratia 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 lôinhibition la plus puissant a été contre le *Staphylococcus aureus,* ces résultats sont en accord avec ceux de notre étude. Ils ont constaté que lôactivité antibactérienne des extraits doive être attribuable a la présence de plusieurs types de composés appartiens à différentes classes, tel que les flavonoides (Guillen et Manzanos, 1998).

Les activités antibactériennes des extraits insolubles dans lôeau (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 dôautres antibiotiques nôont aucun effet contre toutes les

souches bactériennes (**Tableau 09, section résultats**). Les cinq antibiotiques avec le large spectre dôactivités antibactériennes (Nib, Néo, PB, Dot et Cmp) dans ce teste, ont provoqué des zones dôinhibition ne dépassent pas 23 mm de diamètre (**Tableau 09, section résultats**).

Les flavonoides ont été reportés surtout pour leurs propriétés bactériostatiques modérés, par exemple, la concentration inhibitrice minimale (MIC) évaluées pour le myricetine contre *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* sont établies dôêtre 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 flavonoide joue un rôle très important dans leur activité, or les flavonoides aglycones sont plus actifs contre les souches bactériennes que les flavonoides glycosilés. Plusieurs flavones polymethoxylés (**Figure 23**), ont été trouvés fortement inhibitrices des lipopolysaccharides bactériennes induisant lôexpression du TNF-Ŭ, tandis que les flavonoides glycosilés ont été inactifs (Manthey *et al.*, 1999). En particulier, lôhespéridine possède une activité inhibitrice significative dans lôinflammation, car il est capable de réduire les lipopolysaccharides et les infections induisant la production du TNF-Ŭ et inhibe lôinfection induisant un choc létal. Hespéretine (le hespéridine glycosilé), 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**	**Nobilletin**
OCH3	**OCH3**	**OCH3**	**Heptamethoxyflavone**

Figure 23 : Flavones polymethoxylés.

III.2.6.2. L'activité antibactérienne des huiles essentielles

A. Extraction des huiles essentielles

La teneure 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. werneri*, 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. xylopoda* : un rendement de 0.54 % à partir des fleurs, 0.38% à partir des feuilles. La partie aérienne d'*A. triumfetti* a fournit 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 dô*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 dô*A. talyshensis* reste la plus élevée par apport aux résultats qui nous sont disponibles (0.8%).

Ces différences sont dues, selon Haeckel et Omar (1993), à plusieurs facteurs: la technique dôobtention, les facteurs environnementaux (la température et lôhumidité), lôespèce végétales elle-même, lôorgane 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 lôobscurité a diminuer le rendement en huiles volatiles de 1.43 % à 1.09 %. De même, le pourcentage du menthol dans lôhuile essentielle est diminuer de 61.8 % à 57.5 %. Lôirrigation a un effet positif sur la croissance végétative. Il est démontré que lôinsuffisance ou lôexcès dôeau a un effet négatif sur le rendement en huiles essentielles. Le pourcentage de lôhuile 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. Lôactivité antibactérienne

Lôactivité antibactérienne de lôhuile 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 dôinhibition dôun 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 dôinhibition 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.

Lôactivité antibactérienne de lôhuile essentielle brute de *T. communis* est comparable aux activités de lôhuile brute de *Satureja hortensis* étudiée par Gulluce *et al.* (2003), qui a été active sur vingt-trois souches bactériennes. Les zones dôinhibition contre les bactéries testées dans cette étude, ont été : (21 ï 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.*

Lôhuile essentielle de *C. caeruleus* a montré un effet relativement faible contre six souches bactériennes, où les zones dôinhibition 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 ces collaborateurs (2004) sur lôhuile de *Salvia cryptantha* et lôhuile de *Salvia multicaulis*. Ils ont trouvé que les activités de ces huiles essentielles ont été comme suit : lôhuile de *Salvia cryptantha* avait une activité sur *Staphylococcus aureus* (09 mm) et sur *Klebsiella pneumoniae* (09 mm), mais nôont aucun effet sur *Bacillus cereus, Enterobacter aerogenes, Escherichia coli* et sur *Pseudomonas aeruginosa*. En ce qui concerne lôhuile 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 lôhuile brut dô*Achillea sintenisii* de la même famille de *C. caeruleus* (Asteraceae), nôa 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 nôont 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 apport aux différents extraits, les standards et les antibiotiques examinés (**Figure 22**).

Lôactivité biologique dôune 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 Pénoël, 1990), des cellules dô*Escherichia coli* visiblement très endommagées par lôOrigan 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 lôeugénol sont responsables de lôactivité 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 dôions potassium K+. En revanche elle nôest 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 lôintégralité de lôactivité ; 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 quôen 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 dôaction 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 pepetidoglycane, alors que celle des bactéries à Gram (+) est formée dôune 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 sôest intéressé aux effets anti-oxydants et antibactériens des racines de *T. communis L* et *C. caeruleus L*. En ce qui concerne lôactivité antioxydante, trois techniques ont été examinées; test du DPPH, test de ß-carotène / acide linoléique et la technique FRAP. Dans tous les tests réalisés, on a remarqué lôexistence dôune corrélation significative entre lôactivité des extraits méthanoliques et leurs teneurs en composés phénoliques et en flavonoides. 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 flavonoides qui peuvent exercer leur activité antioxydante via plusieurs manières. Notre étude confirme cette puissante activité antioxydante de quelques polyphénols et flavonoides tel que lôacide gallique, catéchine, acide caféique, quercétine et rutine.

Nous avons testé lôactivité 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 lôeau (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 lôE.Ch des deux plantes, riche en flavonoides aglycones, possède le spectre dôactivité 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, dô évaluer la cytotoxicité des huiles sur des modèles animales et de faire des tests complémentaires sur dô autres souches bactériennes, des champignons microscopiques et des virus.

Il serait intéressant de faire lô 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**: 579ï 581.

Acar, J., Rostel, B. (2001). Antimicrobial resistance: An overview. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **20 (3)**: 797ï 810.

Aghajani, Z., Masoudi, S., Abdolhossein, R. (2005). Volatile oils of *Anthemis talyshensis* and *Sclerorhachis platyrachis* Boiss. from Iran. *J. Essent. Oil Res.* **17** : 355ï 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**: 264ï 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)** : 183ï 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 lôantibiorésistance. *Paediatr Child Health*. **11 (3)**: 177ï 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. 1ï 22.

Aquino, R., Behar, I., Simone, F., Pizza, C., (1985 b). Natural dihydrophenantrene derivatives from *Tamus communis. J. Nat. Prod*. **48**: 811ï 813.

Aquino, R., Behar, I., Simone, F., Pizza, C., Senatoe, F., (1985 a). Phenanthrene derivatives from *Tamus communis. Biochem. Syst. Ecol*. **13**: 251ï 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**: 305ï 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. 3ï 53.

Azzi, A., Davies, K. J. A., Kelly, F. (2004). Free radical biology- terminology and critical thinking. FEBS Letters. **558**: 3ï 6.

Bagchi, D., Kuszynski, C., Balmoori, J., Bagchi, M., Stohs, S. J. (1998). Hydrogen peroxide-

induced modulation of intracellular oxidased states in cultured macrophage J774A. 1 and neuroactive PC-12 cells, and protection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Phytother Res*. **12**: 568ï 571.

Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Din, T., Vasseur, J., Gazin, J. C. Pinkas, M, Luyckx, M., Gazin, M. (1996). Oxygen specis scavenging activity of pharmaceutical preparation. Arzneimittel forscung /Drug Research: 1ï 6.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*. **46**: 446ï 475.

Baril, D. (2007). Les oncogènes brisent la molécule dôADN : 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**: 413ï 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 articulate ssp. Scoparia. *Ann Pharmaceutiques Française*. **48 (4)**: 219ï 224.

Bennis, S., Chami, F. S. (2004). Surface alteration of Saccharomyces cervisiae induced by thymol and eugenol. *Letters in Applied Microbiology*. **38**: 454ï 458.

Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ñantioxidant powerò: The FRAP assay. *Anal Biochem*. **239**: 70ï 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**: 33ï 46.

Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. **181**: 1199ï 1200.

Bloomfield, S.F. (2002). Significance of biocide usage and antimicrobial resistance in domiciliary environments. *J Appl Microbiol*. **92** Suppl: 144Sï 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**: 343ï 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 : 324ï 327.

Boullard, B. (2001). Plantes Médicinales Du Monde (Réalités & Croyances), ESTEM, ISBN 2 84371 1177. pp 515 ï 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**: 283-288.

Boveris, A., Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J*. **134** : 707ï 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). Composes phenoliques: Shikimate-acétates. In: « Pharmacognosie : phytochimie, Plantes médicinales ». *Technique et Documentation-Lavoisier* (Paris) ; Chap. 3 : 199ï 383.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème Ed Tec&Doc. Paris: 309ï 353.

Burits, M., Bucar, F. (2000). Antioxidnt activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotheraphy research*. **14**: 323ï 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)**: 162ï 167.

Capasso, F., Simone, F., Senatore, F. (1983). Sterol constituents of *Tamus communis L*. *J. Ethnopharmacol*. **8**: 327ï 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)**: 349ï 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**: 264ï 269.

Cermak, R., Follmer, U., Wolffram, S. (1998). Dietary flavonol quercetin induces chloride secretion in rat colon. *Am J Physiol*. **275**: G1166ï 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)**: 1406ï 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**: 586ï 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., Vlientinck, 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**: 71ï 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)**: 130ï 135.

Cotelle, N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem.* **1**: 569ï 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)**: 170ï 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 chimical acta*. **80**: 1144ï 1152.

Cushnie, T. P., Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*. **26**: 343ï 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**: 140ï 146.

Davies, K. J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*. **50**: 279ï 89.

Day, A. J., Williamson, G. (1999). Human metabolism of dietary quercetin glycosides. In: ñPlants polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecologyò. Eds. Gross et al. *Kluwer Academic* (New york): 415ï 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)**: 1054ï 1059.

De Groot, H., Rauen, U. (1998). Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharm.* **12**: 249ï 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**: 1743ï 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): 1ï 18.

Deans, S. G., Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. **5**: 162ï 180.

Didry, N., Dubreuil, L. (1993). Activité antibactérienne du thymol, du carvacrol et de l'aldehyde cinnamique seuls ou associés. *Pharmacize*. **48**(H4): 301ï 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)**: 308ï 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**: 1055ï 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 lô*Origanum syriacum* L. et de *Salvia libanotica* Boiss et Gaill contre les *Candida* : *albicans, holmii,* et *famata.* Mémoire de Diplôme dôÉtudes 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. 108ï 115.

Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., Saso, L. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by bferric reducing antioxidant powerQ assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1721**: 174ï 184.

Fleurette, J., Freney, J. (1995). Antiseptie et désinfection.

Forkmann, G. (1993). Biosynthesis and biodegradation of polyphenols. In: ñpolyphenolic phenomenaò. Ed. Scalbert A. *INRA* (Paris). Chap 2: 65ï 71.

Formica, J. V., Regelson, W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*. **33(12)**: 1061ï 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**: 621ï 631.

Franchomme, P., Pénoël, D. (1990). Clefs pour l'aromathérapie. La molecule aromatique: matière, énergie, information. L'aromathérapie exactement. R. J. Editeur. Limoges. **2**: 73ï 227.

Fraschini, F., Demartini, G., Esposti, D. (2002). Pharmacology of silymarin. *Clin Drug Invest*. **22**: 51ï 65.

Gafner, S., Wolfender, J. L., Mavi, S., Hostettmann, K. (1996). Antifungal and antibacterial chalcones from *Myrica serrata*. *Planta Medica*. **62**: 67ï 69.

Gamet, Payrastre L., Manenti S., Gratacap MP., Tulliez J., Chap H., Payrastre B. (1999). Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *General Pharmacology*. **32**. 279ï 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**: 433ï 436.

Garo, E., Maillard, M., Antus, S., Mavi, S., Hostettmann, K. (1996). Five flavans from *Mariscus psilostachys*. *Phytochemistry*. **43**: 1265ï 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**: 985ï 989.

Gordon, M. H. (1990). The mechanism of antioxidant action in-vitro. In B. J. F. Hudson (Ed.), *Food antioxidants* (pp. 1ï 18). London: Elsevier Applied Science.

Graham, H. D. (1992). Modified Prussion Blue assay for total phenols. *Journal of Agricultural and food chemistry*. **40**: 801ï 805.

Granger, D. N. (1988). Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia reperfusion injury. *Am.J. Physiol*. **255**: 1269ï 1275.

Granger, D.N., Rutili, G., Mc Cord, J. M. (1981). Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*. **81**: 22ï 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**: 691ï 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**: 322ï 332.

Grisham, M. B., Granger, D. N. (1988) Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. *Dig Dis Sci*. **33**: 6Sï 15S.

Gryglewski, R. J., Korbut, R., Robak, J., Swies, J. (1987). On the mechanism of anti-thrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol*. **36**: 317ï 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**: 259ï 262.

Gulluce, M., Sokman, M., Daferera, D., Agar, G., Ozkan, H., Kartal, N., polissiou, M., Sokmen, A., Sahin, F. (2003). Invitro antibacterial, Antiflungal, and Antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbalparts and callus cultures of *satureja hortensis L*. *Journal of*

Agricultural and food chemistry. **51**: 3958ï 3965.

Gumowski, P. I., Grange, F. (1987). Asthmes intrinsèques et réactivité aspécifique aux moisissures. *Médecine et Hygiène*. **45**: 153ï 157.

Hagerman, A. E., Butler, L. G. (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *J Agr Food Chem*. **26**: 809ï 812.

Hagerman, A. E., Butler, L. G. (1989). Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *J Chem Ecol*. **15(6)**: 1795ï 1810.

Hahlbrock, K. (1981). Flavonoids. In: ñThe biochemistry of plantsò. *Academic Press, Inc* (London). **7** (Chap 14): 425ï 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**: 67ï 71.

Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem*. **59**: 1609ï 1623.

Halliwell, B. (2007). Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health?. *Cardiovascular Research*. **73**: 341ï 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. 47ï 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)**: 853ï 860.

Haraguchi, H., Tanimoto, K., Tamura, Y., Mizutani, K., Kinoshito, T. (1998). Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Gly-cyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*. **48**: 125ï 129.

Harborne, J.B. (1994). Phenolics. In: Natural procucts: their chemistry and biological significance. Eds. Mann, J., Davidson, R. S., Hobbs, J.B., Harborne, J.B. Longman (London). Chap. 6: 361ï 388.

Harborne, J.B., Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. **55**: 481ï 504.

Harbowy, M. E., Balentine, D. A. (1997). Tea chemistry. *Crit Rev Plant Sci*. **16**: 415ï 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. 195ï 217.

Hartwell, J.L., (1969). Plants used against cancer. A survey. *J. Nat. Prod*. **32**: 79ï 107.

Haslam, E. (1993). Polyphenol complexation. In: « Polyphenolic phenomena ». Ed. Scalbert A.

INRA (Paris). Chap. 2: 23ï 31.

Haslam, E., Lilley, T. H. (1988). Natural astringency in foodstuffs: a molecular interpretation. *Crit Rev Food Sci Nutr*. **27(1)**: 1ï 40.

Havsteen, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol*. **32**: 1141ï 1148.

Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther*. **96**: 67ï 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**: 572ï 84.

Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E. M., (2004). Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy. Churchill Livingstone. Edinbrugh: pp. 245ï 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**: 3590ï 3595.

Hendrich, B. A. (2006). Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica*. **27(1)**: 27ï 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): 273ï 292.

Hooper, D.C. (2000). Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones, Clinical Infectious Disease. 31 (Suppl 2). S24ï 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)**, 358ï 373.

Hosein S. R., Lytle M. (2001). Les Antioxydants. C.A.T.I.E. Feuillet dôinformation.

Hulin, V., Mathot, A. G., Mafart, P., Dufossé L. (1998). Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés dôaromes. *Sciences des aliments*. 18: 563ï 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**: 1ï 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: 892ï 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** : 648ï 649.

Januel, C. (2003). Stress Oxydant Au Niveau Des Plaquettes Sanguines Humaines Dans Le Contexte Du Diabete : Etude Du Glutathion Et De La Glutathion Péroxydase 4. Thèse Doctorale : Biochimie. Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science-Santé. Université Lyon I/ INSA-Lyon. N° : 03-ISAL-0024. 41ï 50.

Javanovic, S. V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., Simic, M. J. (1994). Flavonoids as antioxidants. J Am Chem Soc. **116**: 4846ï 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 ï 216.

Jenner, P., Olanow, C. W. (1996). Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. Neurology. **47**: 161ï 170.

Ji, L. L. (2001). Exercise at old age: does it increase or alleviate oxidative stress. Ann N Y Acad Sci. **928**: 236ï 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 ï a European and North American Surveillance study (2000ï 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**: 351ï 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: xxxï 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 ï 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 ï 683.

Khalil, A. (2002). Molecular mechanisms of the protective effect of vitamin E against atherosclerosis. *Can J Physiol Pharmacol*. **80**(**7**): 662 ï 669.

Khan, M. A.U., Ashfaq, M. K., Znberi, H. S., Mahmood, M. S., and Gilani, A. H. (2003). The invivo antifungal activity of aqueous extract from Nigella sativa seeds. *Phytotherapy*

Research. **17**: 183ï 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 ï 1352.

Kim, H., Kim, Y. S., Kim, S. Y., Suk, K. (2001). The plant ¯avonoid wogonin suppresses death of activated C6 rat glial cells by inhibiting nitric oxide production. Neuroscience Letters. **309**: 67ï 71.

Kim, H.J., Wood, E.R., Shin, C.G., Park, H. (1998). A new ¯avonol gallate ester from Acer and its inhibitory activity against HIV-1 integrace. Journal of Natural Products **61**: 145ï 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**: 971ï 877.

Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygen, oxidative stress and anti oxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. Nutrition clinique et métabolisme. **20**: 165ï 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**: 687ï 691.

Kumaran, A., Karunakaran, R. J. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India. LWT. **40**: 344ï 352.

Kunle, O., Okogun, J. (2003). Antimicrobialactivity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. Phytomedicine. **10**: 59ï 61.

La Casa, C., Villegas, I., Alarcon de la Lastra, C., Motilva, V., Martān Calero, M.J. (2000). Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. Journal of Ethnopharmacology. **71**: 45ï 53.

Lahlou, M. (2004). Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. Phytotherapy Research. 18: 435ï 448.

Lamarti, A., Badoc, A., Deffieux, G., Carde, J.P. (1994). Biogénèse des monoterpènes : la chaine isoprenique. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. **133** : 79 ï 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**): (453ï 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**): 101ï 106.

Leeuwenburgh, C., Heinecke, J. W. (2001). Oxidative stress and antioxidants in exercise. Curr Med Chem. **8**: 829ï 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**) : 1631ï 1641.

Levesque, E. (2006). Oligo-Elements Et Stress Oxydant. Alimentation & Santé. Actualités IMAAGE : p. 1ï 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**, 119ï 124.

Liebert, C.A., R.M. Hall., Summers, A.O. (2000). Transposon Tn21, flagship of the floating genome, Microbiology and Molecular Biology Reviews, **63**. 507ï 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**, 884ï 888.

Lonchampt, 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**: 882ï 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**: 251ï 258.

Luczaj, W., and Skrzydlewska E. (2005). Antioxidative properties of black tea. *Preventive Medicine*. **40**: 910ï 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** : 921ï 924.

Maire, R. (1959). Flore de lôafrique 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 ¯avonoids. Phytochemistry **43**, 1271ï 1276.

Mandel, S., Amit, T., Reznichenko, L., Weinreb, O., Youdim, M.B. (2006). Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelatorsï antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders. *Mol Nutr Food Res*. **50**: 229ï 34.

Manthey, J. A., Grohmann, K., Montanari, A., Ash, K., & Manthey, C. L. (1999). Polymethoxylated flavones derived from citrus suppress tumor necrosis factor-a expression by human monocytes. Journal of Natural Products, **62**, 441ï 444.

Markham, K. R. (1982). Techniques of flavonoid identification. Academic Press (London) Chap 1 et **2**: 1ï 113.

Mc Cord, J. M. (1974). Free radicals and inflammation protection of synovial fluid by superoxide dismutase. Science. **185**: 529ï 531.

Mc Manus, J. P., Davis, K. G., Lilley, T., Haslam, E. (1981). The association of proteins with polyphenols. *J Chem Soc Chem Co*: 309ï 311.

Medeiros, A. A. (1997). Evolution and dissemination of blactamases accelerated by generations of b-lactam antibiotics. Clin. Infect. Dis. **24** (**1**): S19ï 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 sôagit-il?. Recherche sur les politiques de santé (Canada). **6**: 6ï 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-ralated degenerative diseases. *Free Radic Biol Med*. **25**(**6**): 676ï 681.

Middleton E., Kandaswami C., Theoharides TC. (1992). Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Biochem Pharmacol*. **43**: 1167ï 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**): 651ï 674.

Miki, M., Tamia, H., Mino, M., Yamamoto, Y., Niki, E. (1987). Free radical chain oxidation of rat read blood cells by molecular oxygen and its inhibition by a-tocopherol. Archives of Biochemistry and Biophysics. **258**: 373ï 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**): 1567ï 1572.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for stimating antioxidant activity. Songklanakarin J. Sci. Technol. **26** (**2**): 211ï 219.

Montoro, P., Braca, A., Pizza, C., De Tommas, N. (2005). Structureï antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. Food Chemistry. **92**: 349ï 355.

Morris, M.E., Zhang, S. (2006). Flavonoidï drug interactions: effects of flavonoids on ABC transporters. Life Sci; **78**:2116ï 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**: 152ï 159.

Nakagawa, T., Yokozawa, T. (2002). Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food and Chemical Toxicology*. **40**: 1745ï 1750.

Nakayama, T. (1994). Suppression of hydroperoxide-induced cytotoxicity by polyphenols. Cancer Research. **54**: 1991sï 1993s.

Nakayama, T., Niimi, T., Osawa, T., Kawakishi, S. (1992). The protective role of polyphenols in cytotoxicity of hydrogen peroxide. *Mutat Res*. **281**: 77ï 80.

Nakayama, T., Yamaden, M., Osawa, T., Kawakishi, S. (1993). Suppression of active oxygen-induced cytotoxicity by flavonoids. Biochemical Pharmacology. **45**: 265ï 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**: 2ï 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**: 418ï 425.

Nilsson, J., Stegmark, R., Akesson, B. (2004). Total antioxidant capacity in different pea (Pisum sativum) varieties after blanching and freezing. Food Chemistry. **86**: 501ï 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**: 225ï 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**): 1202ï 1205.

Omoto, T., Asai, I., Ishimaru, K., Shimomura, K. (1998). Geranyl isovalerate accumulation in acventitious 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: 2213ï 2243.

Oszmianski, J., Wojdylo, A., Lamer-Zarawska, E., Swiader, K. (2007). Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. *Food Chemistry*. **100**: 579ï 583.

Othman, A., Ismail, A., Abdul Ghani, N., Adenan, I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. Food Chemistry. **100**: 1523ï 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**: 3122ï 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: 307ï 315.

Paolisso, G., Dôamore, A., Giugliano, D., Ceriello, A., Varrichio, M., Dôonofrio, F. (1993). Pharmacologic doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insuilin-dependant diabetic patients. Am. J. Clin. Nutr. **57**: 650ï 656.

Parejeo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Saavedra, G., Murcia, M. A., Codina, C. (2003). Investigation of Bolivian plant extracts foe their radical scavenging activity and antioxidant activity. Life Sci. **73**: 1667ï 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. 1ï 12.

Pavlovic, M., Kovaçevic, N., Tzakou, O., Couladis, M. (2006). Essential oil composition of *Anthemis triumfetti* (L.) D.C. *Flavour Fragr. J.* **21**(**2**): 297ï 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**: 651ï 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., Schmdt, R. J., Santucci, B. (1992). Paraphenylenediamine, a contact allergen, induces oxidative stress and ICAM-1 expression in human keratinocytes. Br. J. Dermatol. **126**: 450ï 455.

Pichersky, E., Noel, J. P., Dudareva, N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: natureôs diversity and ingenuity. Science. **311**: 808ï 811.

Picman, A.K., Schneider, E.F., Pieman, J. (1995). Effect of ¯avonoids on mycelial growth of Verticillium albo-atrum. Biochemical Sys- tematics and Ecology **23**, 683ï 693.

Pierpoint, W. S. (1986). Flavonoids in the human diet. In ñPlant flavonoids in biology and medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationshipsò. Eds. Cody, V., Middleton, E., Harborne, J. B., Alan, R. Liss. Inc (New york): 125ï 140.

Pincemail, J., Lecomte, J., Collart, E., Castiaux, J. P., Defraigne, J. O. (2003). Stress oxydant, antioxydants et exercice physique. *MEDECINE INTERNE.* **6** (**5)** : 1ï 3.

Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., Defraigne, J. O. (1999). Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. Vaisseaux, Coeur, Poumons. **4** (**4**) : 6ï 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**, 1268ï 1273.

Proctor, P. H., Reynolds, E. S. (1984). Free radicals and disease in man. Chem Phys. **16**: 175ï 195.

Pulido, R., Bravo, L., Saura ï Carlixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined modified ferric reducing / Antioxidant Power Assay. Journal of Agricultural and food chemistry. **48**: 3396ï 3402.

Quezel, P., Santa, S. (1963). Nouvelle Flore dôAlgerie et des regions Désertiques Méridionales.Tome I et II. CNRS. 1160ï 1170.

Reichheld, J. P., Meyer, E., Khafif, M., Bonnard, G., Meyer, Y. (2005). AtNTRB is the major mitochondrial thioredoxin reductase in Arabidopsisthaliana. *FEBS Lett.* **579(2)**: 337ï 342.

Reisch, J., Bathory, M., Nova´k, I., Szendrei, K., Minker, E., (1972). Stickstoff-freie Phenanthren-Derivate als Pflanzeninhaltsstoffe. Herba Hung. **11**, 61ï 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**, 67ï 68.

Reisch, J., Bathory, M., Szendrei, K., Nova´k, I., Minker, E., (1973). Weitere Phenanthrene aus dem Rhizom von Tamus communis. Phytochemistry **12**, 228ï 229.

Rice-Evans, C. (1995). Plant polyphenols: Free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? In: ñFree radicals and oxidative stress: environment, drug and food additivesò. Eds. Rice-Evans, C., Halliwell, B., Lunt, G. G. *Portland Press* (London): 103ï 116.

Rice-Evans, C. (2001). Flavonoid Antioxidants. Current Medicinal Chemistry. **8**: 797ï 807.

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

Robert, A., Halberstein, P. H. D. (2005). Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. Ann Epidemiol. **5**: 686ï 699.

Ruch, R. J., Chung, S. U., and Klaunig, J. E. (1984). Spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals. Methods in Enzymology. **105**: 198ï 209.

Rylander, R. (1998). Microbial celle wall constituents in Indoor Air and their relation to diseases. Indoor Air Supplement. **4** : 59ï 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**: 621ï 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 Turkay. Food control. **15**: 549ï 557.

Sajduda, A., Dziadek, J., Dela, A., Zalewska-Schonthaler, 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 ï 17.

Salthammer, T. (1999). Organic indoor air pollutants: occurence - measurement ï 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**, 1094ï 1117.

Saroglou, V., Dorizas, N., Kypriotakis, Z., Skaltsa H.D. (2006). Analysis of the essential oil composition of eight *Anthemis* species from Greece. *Journal of Chromatography*. **1104** (**1**): 313ï 322.

Schmidt, R. J., Khan, L., Chung, L. Y. (1990). Are free radicals and not quinine 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**: 56ï 64.

Schmidt, R. J., Moult, S. P. (1983). The dermatitic properties of black bryony (Tamus communis L.). Contact Dermatitis. **9**: 390ï 396.

Schrader, M., Fahimi, H. D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. Biochimica et Biophysica Acta. **1763**: 1755ï 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**: 1024ï 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**: 547ï 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**: 11ï 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**: 431ï 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**: 800ï 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**: 277ï 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** : 35ï 43.

Sokmen, A., Gulluce, M., Akpulat, A. H., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., Sokmen, M., Sahin, F. (2004). The invitro antimicrobical and antioxidant activities of the essential oils and methanols extracts of endemic *thymus spathulifolins*. Food control. **15**: 627ï 634.

Sokmen, A., Vardar-Unlu, G., Polissiou, M., Daferera, D., Sokmen, M., Donmez, E. (2003). Antimicrobical Activity of Essential Oil and Methanol Extracts of *Achillea sintenisii* Hub. Mor. (Asteraceae). PHYTOTHERAPY RESEARCH. **17**: 1005ï 1010.

Soong, Y. Y. and Barlow, J. Ph. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. Food Chemistry. **88**: 411ï 417.

Steinberg, D. (1993). Modified forms of low-density lipoprotein and atherosclerosis. J. Intern. Med. **233**: 227ï 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**. 7681ï 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**: 1140ï 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**: 545ï 54.

Tepe, B., Donmez, E., Unlu, M., Candan, F., Daferera, D., Vardar-Unlu, G., Polissiou, M., Sokmen, A. (2004). Antimicrobical 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**: 519ï 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* (Bentham) Borm., *Centaurea mucronifera* DC. and *Hieracium cappadocicum* Freyn from Turkish flora. Food Chemistry. **98**: 9ï 13.

Tepe, B., Sokmen, M., Sokmen, A., Daferera, D., Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidative activity of the essential oil and various extracts of Cyclotrichium origanifolium (Labill.) Manden. and Scheng. Journal of Food Engineering. **69**: 335ï 342.

Tim Cushnie, T. P., Lamb, J. A. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **26**: 343ï 356.

Tomas-Barberan, F. A., Maillard, M., Hostellman, K. (1988). Antifungal flavonoids from the leaf structures of *Helichrysum nitens* and from the stembark of *Erythrina berteroana*. In: ñProgress in Clinical and Biological Researchò. Eds. Cody, V., Middleton, E., Harborne, JB., Beretz, A. Alan R Liss (New york). Chap. **280**: 61ï 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**: 466ï 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**: 84ï 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**: 151ï 154.

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullos, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicology and Environmental Safety. **64**: 178ï 189.

Vanaclocha, B., Canigueral, S. (2003). Fitoterapia In: Vademecum de prescripcion, fourth ed. Masson, Barcelona. 354ï 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**: 63ï 67.

Varin, L., Barron, D., Ibrahim, R. K. (1987). Enzymatic assay for flavonoid sulfotransferase. *Anal Biochem*. **161**: 176ï 180.

Vistaropoulou, V. E., Vajias, C. (1986). Methylated flavones from Teucrium polium. *Planta Med*. **5**: 343ï 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**): 240ï 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**: 2242ï 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 lõUniversité 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**: 41ï 45.

Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. Current Opinion in Plant Biology. **5**: 218ï 223.

Wolin, M. S. (1996). Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. Microcirculation. **3** (**1**): 1ï 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**: 39ï 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**): 1655ï 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**: 213ï 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 DôAlzheimer. Maladie DôAlzheimer 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**): 97ï 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**: 105ï 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**: 57ï 61.