



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE ECOBIOLOGIE DES MILIEUX MARINS ET
LITTORAUX

Thèse présentée en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat en Biologie
Spécialité : Santé environnementale

Étude phytochimique et activités biologiques des extraits de
feuilles et de fruits de *Chamaerops humilis* L.

BELHAOUES Saber

Devant le Jury :

President	OUAKID mohamed laid	(Prof. Univ. Badji-Mokhtar, Annaba)
Directeur	SERIDI ratiba	(Prof. Univ. Badji-Mokhtar, Annaba)
Co-directeur	BENSOUILAH mourad	(Prof. Univ. Badji-Mokhtar, Annaba)
Examineur	DJELLOUL radia	(MCA Univ. El-Tarf)
Examineur	BOUTABIA lamia	(MCA Univ. El-Tarf)

Année universitaire : 2017 – 2018

Remerciements

Je veux tout d'abord remercier particulièrement Monsieur **Bensouilah Mourad**, co-directeur de cette thèse, de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de la confiance qu'il m'a accordée et aussi pour son encadrement, sa sympathie, sa rigueur scientifique, ses conseils et ses encouragements, je lui adresse également mes remerciements distingués de m'avoir consacré son temps, pour ses critiques constructives, son enthousiasme et ses qualités personnelles et professionnelles. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance, et mes sincères remerciements à ma directrice de thèse, Madame **Seridi Ratiba**, d'avoir accepté de m'encadrer et de m'avoir donné la chance de bénéficier de ses connaissances scientifiques et ses conseils.

Je tiens également à remercier tout particulièrement les membres de mon jury, Madame **Boutabia lamia**, Madame **Djelloul radia**, et monsieur **Ouakid mohamed laid** pour avoir accepté de lire et de juger mon travail.

Je remercie très chaleureusement le docteur **Amri Sandra**, et monsieur **Bensouici valid** pour leur collaboration et leur participation technique à ce travail. Je ne vous remercierai jamais assez pour la patience, la gentillesse, le dévouement et le sérieux dont vous avez fait preuve au cours des tests biologiques et analyses chromatographiques réalisés ensemble.

Mes remerciements vont également à tous les permanents du laboratoire Ecobiologie des Milieux Marins et Littoraux qui ont apporté une aide de près ou de loin à ces années passées au laboratoire.

Je ne saurai oublier dans mes remerciements ma famille pour leur patience et leur soutien constant dans les moments difficiles.

Résumé

Dans la présente étude, les activités antioxydantes et antibactériennes de différentes fractions obtenues à partir d'extraits de feuilles et de baies de *Chamaerops humilis* L, ont été évaluées. Le contenu phytochimique a été examiné par des méthodes colorimétriques et chromatographiques (HPLC). L'activité antibactérienne a été déterminée par diffusion en milieu gélosé et par micro-dilution en milieu liquide contre six souches de bactéries Gram positif et Gram négatif. L'activité antioxydante a été mesurée en utilisant : le piégeage des radicaux DPPH, le blanchiment du β -carotène-linoléate, la réduction du fer (FRAP) et le piégeage des radicaux ABTS. Les activités antioxydantes maximales ont été démontrées par les fractions d'acétate d'éthyle. Ces activités étaient corrélées à la présence de composés phénoliques dans ces fractions actives (214,79 et 37,86 μ g EAG/mg dans les feuilles et les baies respectivement). Ces mêmes fractions ont également montré les plus fortes activités antibactériennes contre *Enterococcus faecalis* et *Salmonella typhimurium* avec des CMI de 0,25 mg/ml et 0,5 mg/ml respectivement. Les composés phénoliques prédominants identifiés par RP-HPLC étaient l'acide tannique, la naringine, l'acide vanillique et l'acide *p*-coumarique.

Mots clés : *Chamaerops humilis*, Polyphénols, Activités antioxydantes, Activités antibactériennes, RP-HPLC.

Abstract

In the present investigation, antioxidant and antibacterial activities of different fractions obtained from leaf and fruit extract of *Chamaerops humilis* L were evaluated. The phytochemical contents were examined by colorimetric and chromatography (HPLC) methods. The antibacterial activity was determined by the agar diffusion and micro-dilution method against six strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Antioxidant activity was measured using the DPPH radical scavenging, β -carotene–linoleate bleaching, the ferric reducing antioxidant power (FRAP), and the ABTS radical scavenging assays. Maximum antioxidative activities were exhibited by ethyl acetate fraction. These activities were correlated with the presence of phenolic compounds in active fractions (214.79 and 37.86 μg EAG/mg in leaf and fruit respectively). EA fraction from leaf and fruit showed also the highest antibacterial activity against *Enterococcus faecalis* and *Salmonella typhimurium* with a MIC value (0,25mg/ml) and (0,5mg/ml) respectively. The predominant phenolic compounds identified by RP-HPLC were tannic acid, naringin, vanillic acid and p-cumaric acid.

Keywords: *Chamaerops humilis*, Polyphenols, Antioxidant activity, antibacterial activity, RP-HPLC.

المخلص

في هذا البحث ، تم تقييم الأنشطة المضادة للأكسدة والبكتيريا لكسور مختلفة تم الحصول عليها من مستخلصات الاوراق و الثمرات لنبات *Chamaerops humilis* L. تم فحص المحتويات الكيميائية النباتية بواسطة طرق قياس الألوان وبواسطة كروماتوغرافيا السائل العالي الأداء (HPLC). تم تحديد النشاط المضاد للبكتيريا بطريقة انتشار الأجار وطريقة التخفيف الدقيقة ضد ستة سلالات من البكتيريا موجبة الجرام (+gram) والبكتيريا سالبة الجرام (-gram). النشاطية المضادة للأكسدة لهذه المستخلصات تم تقديرها باستعمال: اختبار DPPH, ابيضاض , β -carotene-linoleate, القدرة الارجاعية للحديد (FRAP) واختبار ABTS. الحد الأقصى من الأنشطة المضادة للأكسدة تمركز بأجزاء ائيل الاسيتات. وارتبطت هذه الأنشطة مع وجود المركبات الفينولية في الكسور النشطة. (214.79 و 37.86 ميكروغرام EAG / ملغ) في الأوراق والثمرات على التوالي. وأظهر أيضا اجزاء ائيل الاسيتات من الأوراق والثمار أعلى نشاط مضاد للبكتيريا ضد المكورات المعوية البرازية (*Enterococcus faecalis*) والسالمونيلا التيفية (*Salmonella typhimurium*) مع قيمة أدنى تركيز مثبط CMI (0,25 ملغ / مل و (0,5 ملغ / مل) على التوالي وكانت المركبات الفينولية السائدة التي حددتها RP-HPLC هي : حمض التانيك ، نارينجن ، حمض الفانيليك وحمض الكوماريك.

الكلمات المفتاحية: *Chamaerops humilis* المركبات الفينولية, نشاط مضاد للأكسدة, نشاط مضاد للبكتيريا RP-HPLC.

Sommaire

Résumé en français	
Résumé en anglais	
Résumé en arabe	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	

Page

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

Première partie : Étude bibliographique

Chapitre I : La famille des *Palmacées* et l'espèce *Chamaerops humilis* L

1. Présentation de la famille des <i>Palmacées</i>	04
1.1 Localisation géographique.....	04
1.2 Les habitats des palmiers.....	05
1.3 Aspect botanique général d'un palmier.....	07
1.3.1 Le stipe.....	08
1.3.2 Les feuilles.....	09
1.3.3 Les inflorescences et les fleurs.....	09
1.3.4 Les fruits et les graines.....	09
1.4 Utilisation des palmiers.....	10
1.5 Classification et relations phylogénétiques.....	10
2. L'espèce <i>Chamaerops humilis</i> L.....	11
2.1 Description botanique.....	12
2.2 Classification.....	14
2.3 Rôle écologique.....	14
2.4 Exigences écologiques du taxon.....	14
2.5 Utilisation du <i>C.humilis</i>	15
2.5.1 Utilisation artisanale et industrielle.....	15
2.5.2 Utilisation médicinale.....	15
2.6 Données phytochimiques de la plante.....	15
2.7 Données pharmacologiques.....	16

Chapitre II : Radicaux libres, stress oxydant et antioxydants

1. Les radicaux libres.....	17
1.1 Le radical superoxyde, O ₂ ^{•-}	17
1.2 Le peroxyde d'hydrogène, H ₂ O ₂	17
1.3 L'acide hypochloreux, HOCl.....	18
1.4 Le radical hydroxyle, HO•.....	18
2. Le Stress oxydant.....	19
2.1 Les cibles des ERO.....	19
2.1.1 Oxydation des composés lipidiques.....	19
2.1.2 Oxydation des composés protéiques.....	20
2.1.3 Oxydation de l'ADN.....	20
3. Les antioxydants.....	21
3.1 Les systèmes antioxydants enzymatiques.....	22
3.1.1 La Superoxyde dismutase (SOD).....	22
3.1.2 La catalase.....	22
3.1.3 La glutathion peroxydase (GP _X).....	23
3.2 Les systèmes antioxydants non- enzymatiques.....	23
3.2.1 Les antioxydants endogènes.....	24
3.2.1.1 Le Glutathion.....	24
3.2.1.2 L'acide urique.....	24
3.2.1.3 Le coenzyme Q.....	24
3.2.2 Les antioxydants exogènes.....	25
3.2.2.1 La vitamine C (ou acide ascorbique).....	25
3.2.2.2 La vitamine E (ou α-tocophérol).....	25
3.2.2.3 Les antioxydants phénoliques.....	26

Chapitre III : Les composés phénoliques

1. Généralités sur les polyphénols.....	28
1.1 Les non flavonoïdes.....	28
1.1.1 Les acides phénoliques.....	28
1.1.2 Les Stilbènes.....	29
1.2 Les flavonoïdes.....	29
1.2.1 Classification des flavonoïdes.....	29
1.2.1.1 Les flavones.....	31

1.2.1.2 Les flavonols.....	31
1.2.1.3 Les flavanones.....	31
1.2.1.4 Les anthocyanes.....	31
1.2.1.5 Les Isoflavonoïdes.....	31
1.2.1.6 Les tanins condensés.....	31
2. Mécanismes antioxydants des systèmes phénoliques.....	32
2.1 Transfert d'atome d'hydrogène (HAT, hydrogen atom transfer)	32
2.2 Transfert mono-électronique d'électron (SET, single electron transfer)	32
2.3 La chélation des métaux de transition (Transition Metals Chelation,TMC).....	32
3. Effet de la structure des composés phénoliques sur l'action anti radicalaire.....	33
4. Propriétés biologiques des polyphénols.....	34
4.1 Activité antioxydante.....	34
4.2 Activités antibactérienne, antifongique et antivirale.....	34
4.3 Activité vasodilatatrice.....	34
4.4 Activité anti-inflammatoire.....	35
4.5 Activité anticancéreuse.....	35

Deuxième partie : Partie expérimentale

Chapitre IV : Matériels et Méthodes

1. Echantillonnage.....	36
2. Analyses phytochimiques préliminaires.....	37
2.1 Caractérisations des Tanins.....	37
2.1.1 Tanins catéchiques.....	37
2.1.2 Tanins galliques.....	37
2.2 Caractérisations des mucilages.....	38
2.3 Caractérisations de substances saponosides.....	38
2.4 Caractérisations des alcaloïdes.....	39
2.5 Caractérisations des composés réducteurs.....	40
2.6 Caractérisations des flavonoïdes.....	40
3. Extraction des composés phénoliques.....	41
3.1 Préparation des extraits bruts méthanoliques.....	41
3.1.1 Étape de dégraissage de la matière végétale.....	41
3.1.2 Étape d'extraction des polyphénols.....	41
3.2 Fractionnement des extraits bruts par Extraction Liquide-Liquide.....	42

4. Dosage des composés phénoliques.....	45
4.1 Dosage des polyphénols totaux.....	45
4.2 Dosage des flavonoïdes totaux.....	46
4.3 Dosage des tanins condensés (proanthocyanidines).....	47
4.4 Dosage des anthocyanes monomères totaux : méthode des pH différentiels.....	48
5. Identification des composés phénoliques.....	49
6. Evaluation de l'activité antioxydante.....	50
6.1 Piégeage du radical libre DPPH.....	51
6.2 Test du blanchissement du β -carotène.....	52
6.3 Pouvoir réducteur (FRAP, Ferric Reducing Antioxydant Power)	53
6.4 Test de réduction du radical-cation ABTS ^{•+}	55
7. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	56
7.1 Technique de diffusion en milieu gélosé.....	57
7.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	59

Chapitre V : Résultats et discussions

1. Analyses phytochimiques.....	61
2. Rendement de l'extraction.....	61
3. Dosage des composées phénoliques.....	63
3.1 Dosage des polyphénols totaux (PPT).....	63
3.2 Dosage des Flavonoïdes totaux (FVT).....	65
3.3 Dosage des tanins condensés (TC).....	67
3.4 Dosage des anthocyanes monomères totaux(AMT).....	69
4. Identification des composés phénoliques.....	70
4.1 Chromatogrammes des étalons.....	70
4.2 Analyses des extraits de <i>C. humilis</i>	71
4.2.1 Analyses des fractions des feuilles.....	72
4.2.2 Analyses des fractions des baies.....	76
5. Etude des activités anti-oxydantes.....	81
5.1 Résultats du test DPPH.....	82
5.2 Résultats du test du blanchissement du β -carotène.....	84
5.3 Résultats du test FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power)	87
5.4 Résultats du test ABTS ^{•+}	90
6. Etude des relations entre teneurs en composés phénoliques et activités antioxydantes.....	93

7. Résultats de l'activité antibactérienne.....	98
7.1 Technique de diffusion en milieu gélosé.....	98
7.2 Technique de dilution en milieu liquide (CMI).....	106
Conclusion et perspectives	110
Références bibliographiques	112
Annexe	122

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Distribution des espèces actuelles de palmiers.....	05
02	Illustration de la diversité morphologique des palmiers et de leurs habitats.....	06
03	Principaux éléments constitutifs d'un palmier.....	08
04	Illustration des deux principales morphologies de feuille.....	09
05	Classification des palmiers basée sur les études phylogénétiques.....	11
06	Différentes régions où <i>Chamaerops humilis</i> a été répertorié.....	12
07	Vue d'ensemble du <i>chamaerops humilis</i>	13
08	Formation de radicaux libres à partir de l'oxygène.....	19
09	Actions des radicaux libres sur l'ADN.....	21
10	Action détoxicante vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes (ROOH) dérivés des lipides.....	23
11	structure du glutathion.....	24
12	Acide ascorbique.....	25
13	Structures chimiques des tocophérols.....	26
14	Antioxydant, polyphénols et prévention des certaines maladies.....	27
15	Structures de certains acides phénoliques.....	28
16	Structure de base des flavonoïdes.....	29
17	Mécanismes antioxydants des polyphénols.....	33
18	Site de récolte de <i>Chamaerops humilis</i>	36
19	Tests phytochimiques : tanins, mucilages, saponosides.....	39
20	Tests phytochimiques : alcaloïdes, composés réducteurs, flavonoïdes.....	40
21	Schéma simplifié des étapes d'obtention des extraits bruts.....	42
22	Fractionnement des extraits bruts.....	44
23	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	45
24	Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.....	46
25	Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des proanthocyanidines.....	48
26	Appareil chromatographique (Agilent 1200 HPLC System)	50
27	Mécanisme réactionnel du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH)	51
28	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP.....	54
29	Formation et piégeage du radical ABTS• ⁺ par un antioxydant donneur de H•	55

30	Représentation schématique de la méthodologie employée pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits.....	59
31	Pourcentage massique (%) des fractions obtenues après fractionnement de l'extrait brut méthanolique.....	62
32	Teneurs en polyphénols totaux des différentes fractions des feuilles et baies de <i>Chamaerops humilis</i>	64
33	Teneurs en flavonoïdes totaux des différentes fractions des feuilles et baies de <i>Chamaerops humilis</i>	66
34	Teneurs en tanins condensés des différentes fractions des feuilles et baies de <i>Chamaerops humilis</i>	68
35	Teneurs en anthocyanes monomères totaux des différentes fractions des feuilles et baies de <i>chamaerops humilis</i>	69
36	Profil du chromatogramme du mélange des étalons à 280 et 320 nm.....	71
37	Profil chromatographique de la FDCM des feuilles de <i>C .humilis</i>	72
38	Profil chromatographique de la FAE des feuilles de <i>C .humilis</i>	73
39	Profil chromatographique de la FB des feuilles de <i>C .humilis</i>	74
40	Profil chromatographique de la Faq des feuilles de <i>C .humilis</i>	75
41	Profil chromatographique de la FDCM des baies de <i>C .humilis</i>	77
42	Profil chromatographique de la FAE des baies de <i>C .humilis</i>	78
43	Profil chromatographique de la FB des baies de <i>C .humilis</i>	79
44	Profil chromatographique de la Faq des baies de <i>C .humilis</i>	80
45	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide ascorbique et des fractions des feuilles.....	83
46	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide ascorbique et des fractions des baies.....	83
47	Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en absence et en présence des fractions des feuilles de <i>Chamaerops humilis</i> , et du BHT.....	85
48	Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en absence et en présence des fractions des baies de <i>Chamaerops humilis</i> , et du BHT.....	86
49	Pouvoir réducteur des fractions des feuilles de <i>C.humilis</i> , et de l'acide ascorbique.....	88
50	Pouvoir réducteur des fractions des baies de <i>C.humilis</i> , et de l'acide ascorbique.....	89
51	Pourcentages d'inhibition du radical ABTS ^{•+} en fonction des différentes concentrations utilisées pour le Trolox et des fractions des feuilles.....	91

52	Pourcentages d'inhibition du radical ABTS ^{•+} en fonction des différentes concentrations utilisées pour le Trolox et des fractions des baies.....	91
53	Analyse en composante principale (ACP)	94
54	Matrice des corrélations de Pearson des fractions de feuilles.....	95
55	Matrice des corrélations de Pearson des fractions de baies.....	95
56	Boîtes à moustaches comparant les moyennes des zones d'inhibitions des fractions obtenues pour les souches bactériennes testées.....	101
57	Activité antibactérienne de la fraction acétate d'éthyle des feuilles de <i>Chamaerops humilis</i>	102
58	Activité antibactérienne de la fraction acétate d'éthyle des baies de <i>Chamaerops humilis</i>	103
59	Boîtes à moustaches comparant l'effet antibactérien des extraits sur les bactéries à Gram+ et à Gram- (Diffusion en milieu gélosé.....)	104
60	Classification hiérarchique des fractions des <i>Chamaerops humilis</i> réalisé à partir des pourcentages d'inhibitions moyens sur les différentes souches bactériennes	105

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Répartition des palmiers dans le monde.....	04
02	Différentes classes des flavonoïdes.....	30
03	Effet de la structure sur les activités antioxydantes des polyphénols.....	33
04	Récapitulatif des conditions de récoltes de <i>C.humilis</i>	36
05	Profil du gradient utilisé pour l'analyse HPLC.....	50
06	Description et pouvoir pathogène des souches de bactéries.....	57
07	Composition phytochimique des feuilles et baies de <i>chamaerops humilis</i>	61
08	Composés phénoliques identifiés dans les fractions des feuilles de <i>C .humilis</i>	76
09	Composés phénoliques identifiés dans les fractions des baies de <i>C .humilis</i>	81
10	Activité antioxydante des fractions de feuilles et baies de <i>Chamaerops humilis</i> , et, de l'acide ascorbique avec le radical DPPH.....	84
11	Activité antioxydante des fractions de feuilles et baies de <i>Chamaerops humilis</i> , et, du BHT dans le système β -carotène / acide linoléique.	87
12	Test FRAP des fractions de <i>C. humilis</i> exprimés en EC ₅₀	89
13	Activité antioxydante des fractions de feuilles et baies de <i>Chamaerops humilis</i> , et, du Trolox avec le radical ABTS.....	92
14	Zone d'inhibition (mm) des contrôles positif et négatif obtenus sur les diverses souches bactériennes.....	99
15	Zone d'inhibition (mm) des fractions de <i>Chamaerops humilis</i> obtenues à une concentration de 10 mg sur diverses souches bactériennes.....	99
16	Zone d'inhibition (mm) des fractions de <i>Chamaerops humilis</i> obtenues à une concentration de 20 mg sur diverses souches bactériennes.....	100
17	Zone d'inhibition (mm) des fractions de <i>Chamaerops humilis</i> obtenues à une concentration de 30 mg sur diverses souches bactériennes.....	100
18	Concentrations minimales inhibitrices(CMI) des fractions de <i>C.humilis</i>	106
A-1	Nom et provenance des réactifs et des solvants.....	122
A-2-1	Dosage des PTT. Moyennes de 3 répétitions \pm écart-type.....	123
A-2-2	Dosage des FVT. Moyennes de 3 répétitions \pm écart-type.....	123
A-2-3	Dosage des TC. Moyennes de 3 répétitions \pm écart-type.....	123
A-2-4	Dosage des AMT. Moyennes de 3 répétitions \pm écart-type.	124

Liste des abréviations

ABTS	Sel d'ammonium de l'acide 2, 2'- azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
AMT	Anthocyanes Monomères Totales
ATCC	American Type Culture Collection.
BHT	Butylhydroxytoluène
<i>C.humilis</i>	<i>Chamaerops humilis</i>
CMI	Concentration minimale inhibitrice.
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPH	2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyle
EAG	Équivalent Acide Gallique
EC/mg	Équivalent Catéchine/ mg de fraction
ECy3G	Équivalent Cyanidine 3- <i>O</i> -glucoside
EQ/mg	Équivalent quercétine/ mg de fraction
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FAE	Fraction acétate d'éthyle
Faq	Fraction aqueuse
FB	Fraction butanol
FDCM	Fraction dichlorométhane
FeCl₃	Chlorure de fer
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
FVT	Flavonoïdes totaux
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
mg	milligramme
PPT	Polyphénols Totaux
RP-HPLC	Chromatographie liquide haute performance en phase inverse
Trolox	Acide 6-hydroxy-2, 5, 7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique

INTRODUCTION

Introduction

L'Algérie avec son climat varié et généralement très ensoleillé, possède un patrimoine naturel exceptionnel caractérisé par une flore considérable avec plus de 3000 espèces végétales recensées dont 250 endémiques (Hanifi, 1991 ; Khadraoui *et al.*, 2015).

Les plantes ont constitué le premier et principal outil thérapeutique à la disposition de l'homme depuis l'antiquité et dans de nombreuses civilisations. Aujourd'hui, elles jouent toujours un rôle vital dans la prévention et le traitement des maladies parmi la majorité de la population des pays en développement (Vivek Kumar *et al.*, 2017). De plus, on estime que deux tiers des médicaments pharmaceutiques actuels ont une origine végétale (Newmann *et al.*, 2007). Morphine, taxol, quinine, digitaline, et aspirine ne sont que quelques exemples des multiples médicaments issus de plantes couramment utilisés.

Les plantes, véritables usines chimiques, produisent au cours de leur croissance et de leur vie, une grande variété de molécules organiques, également appelées « métabolites secondaires » et beaucoup d'entre elles ont des applications intéressantes en pharmacologie, industrie chimique et agriculture (Cannes do Nascimento et Fett-Neto, 2010). L'impressionnante et grande diversité chimique exprimée dans le règne végétal est due à la grande capacité développée par les génomes végétaux ; ces derniers sont capables de codifier de nombreuses enzymes métaboliques. En effet les plantes possèdent plus de gènes que d'autres organismes vivants, comme les mammifères et les bactéries. Le résultat de cette grande biodiversité est représenté par plus de 200 000 métabolites isolés à ce jour à partir d'espèces végétales (Watson, 2014).

Parmi ces métabolites isolés on distingue : les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques. Ces derniers présentent un large éventail de propriétés physiologiques, telles que des effets antiallergiques, anticancéreux, anti-inflammatoires, antioxydants, antimicrobiens, antithrombotiques, cardioprotecteurs et vasodilatateurs (Balasundram *et al.*, 2006 ; Terra *et al.*, 2007). Plusieurs rapports indiquent que le potentiel antioxydant des plantes médicinales peut être lié à la concentration de leurs composés phénoliques qui comprennent les acides phénoliques, les flavonoïdes, les anthocyanines et les tanins (Djeridane *et al.*, 2006 ; Wong *et al.*, 2006). Ces composés s'avèrent d'une grande utilité pour prévenir l'apparition et/ou la progression de nombreuses maladies causés par le stress oxydatif.

En outre, l'augmentation de la pharmacorésistance des bactéries et l'émergence rapide de nouvelles infections ont fortement diminué l'efficacité des médicaments pour traiter les pathologies causées par certains microorganismes (Martins *et al.*, 2013). En 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), a publié une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques. Cette liste est un nouvel outil pour veiller à ce que la recherche-développement réponde aux besoins urgents de la santé publique. Elle met plus particulièrement en avant la menace des bactéries à Gram négatif résistantes à de nombreux antibiotiques. Elles ont des capacités intégrées de trouver de nouveaux moyens de résister aux traitements et peuvent transmettre le matériel génétique permettant à d'autres bactéries de devenir elles aussi résistantes. Cette situation soulève le besoin urgent de développer de nouveaux agents antibactériens, et c'est au sein du monde végétal, grand réservoir de biomolécules, que l'on espère trouver aujourd'hui la solution à ces nombreuses résistances (Wald, 2009).

Inscrit dans ce contexte général, ce travail de thèse a pour objectifs de caractériser chimiquement les feuilles et les baies d'une palmacée (Arécacée) : *Chamaerops humilis* et d'évaluer ses potentialités biologiques (activité antioxydante et antibactérienne).

La première partie de cette thèse est consacré à l'étude bibliographique de la famille des palmiers et de l'espèce *Chamaerops humilis*. Celle-ci est constituée d'une description botanique de la plante et d'une présentation des diverses molécules qu'elle contient, ensuite nous rappellerons quelques généralités sur les radicaux libres et le stress oxydatif. Enfin, nous nous intéresserons aux systèmes naturels de défense contre le stress oxydant et nous porterons une importance plus particulière aux systèmes phénoliques.

La deuxième partie de ce travail est consacrée d'une part à l'extraction et aux dosages des différents composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes totaux tannins condensés et anthocyanes) présents au niveau des feuilles et baies de notre plante, ainsi qu'à l'identification et la quantification de ces composés, et d'autre part à la valorisation des différents extraits de la plante. Dans un premier temps, le pouvoir antioxydant des extraits est mesuré via plusieurs tests complémentaires (DPPH, ABTS, Frap, BBC) ; Après cela, tous les extraits testés ont fait l'objet d'une étude de leur activité antibactérienne.

Enfin les conclusions essentielles sur l'ensemble de ce travail ainsi que les perspectives de sa continuité ont été dégagées.

Chapitre I : La famille *Palmacée* et l'espèce *Chamaerops humilis*

1. Présentation de la famille des *Palmacées*

Les palmiers constituent la famille *Palmacée* ; Le nom *Arécacée* est aussi utilisé, et est souvent mentionné dans la littérature spécialisée. La famille regroupe des sous-familles, lesquelles regroupent des genres qui, enfin, regroupent des espèces, elles-mêmes divisées en sous-espèces et variétés (Rezaire,2012).

Les palmiers constituent une famille emblématique d'Angiospermes monocotylédones. Cette famille compte 212 genres et approximativement 2 800 espèces recensées dans le monde (Tableau 1).

Tableau1 : Répartition des palmiers dans le monde (De Granville, 1988)

Situation géographique	Genre	Espèce
Amérique	79	1150
Afrique +Europe	16	117
Madagascar + Seychelles+ Mascareignes	26	132
Asie tropicale + Australie	91	1383
Total	212	2782

1.1 Localisation géographique

Les palmiers sont originaires des 5 continents mais ils sont présents majoritairement dans les zones tropicales et subtropicales du globe (Figure 1). La répartition actuelle des espèces est probablement le résultat de phénomènes de dispersion sur de longues distances ; la diversification des différentes lignées de palmiers pourrait avoir commencé au milieu du Crétacé il y a environ 100 millions d'années sur le supercontinent Laurasia (représentant actuellement l'Amérique du Nord et l'Europe (Couvreur *et al.*, 2011).



Figure 1 : Distribution des espèces actuelles de palmiers

1.2 Les habitats des palmiers

Les palmiers occupent des habitats très diversifiés tels que les forêts humides de basse altitude, les déserts, les mangroves, ou encore, les forêts de haute montagne. Ils sont grégaires (formant parfois de denses peuplements) ou solitaires (Dransfield *et al.* 2008). Dans les zones sub-tropicales, les habitats sont également variés. Par exemple, le genre *Serenoa* est présent dans les forêts de pins en Floride, *Rhopalostylis* dans les forêts légèrement tempérées de Nouvelle-Zélande, *Trachycarpus* dans les montagnes de l'Himalaya et *Chamaerops* dans les végétations de type maquis en Afrique du Nord et en Méditerranée (Figure 2).

La principale limitation écologique à la distribution des palmiers est la température. En effet, ces organismes ne peuvent pas entrer en dormance et ne peuvent donc pas survivre à de longues périodes de gel qui induisent des dommages irréversibles à leurs cellules (Tomlinson, 2006).

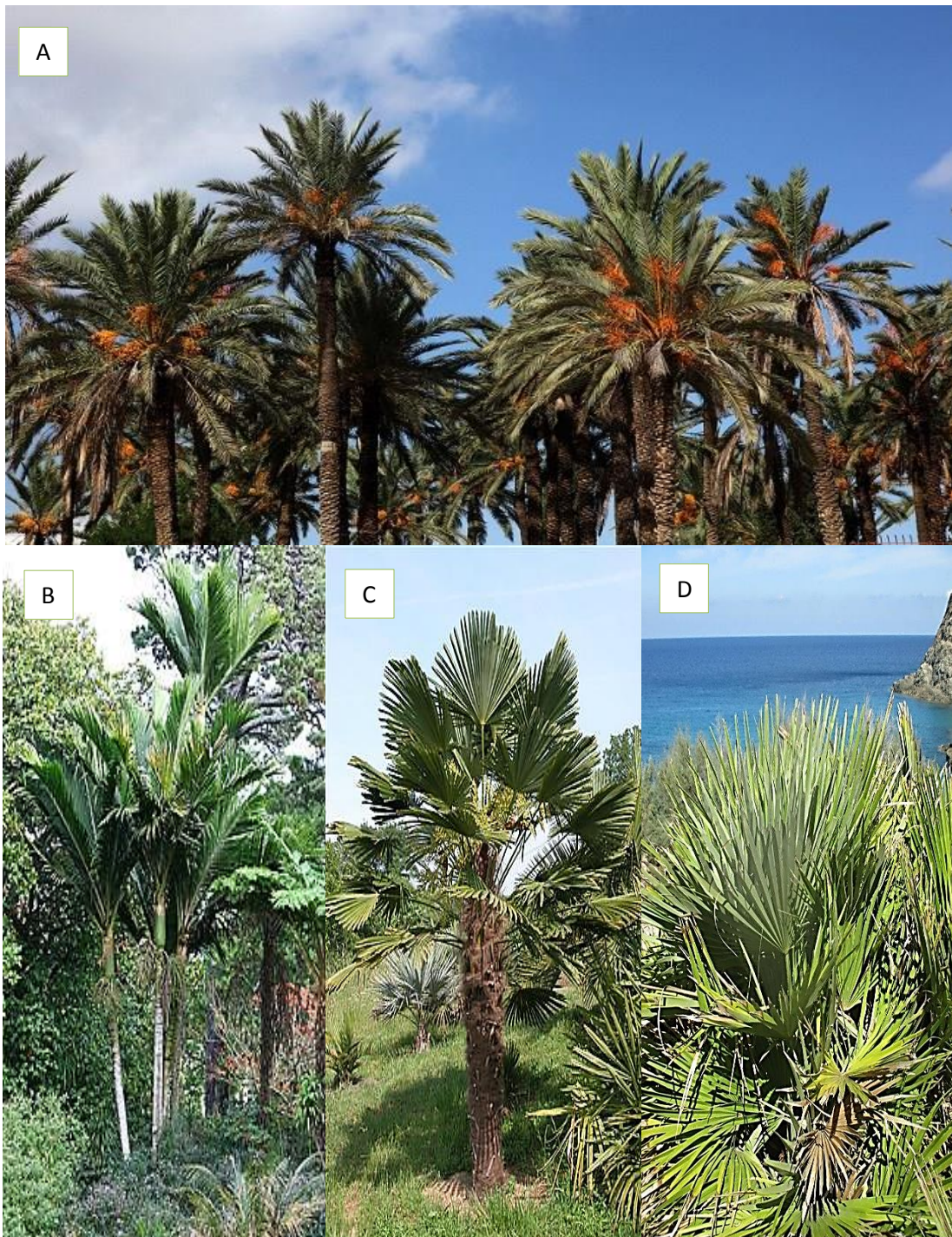


Figure 2 : Illustration de la diversité morphologique des palmiers et de leurs habitats, (A) *Phoenix*, (B) *Rhopalostylis* , (C) *Trachycarpus*, (D) *Chamaerops* (photographies Palmweb)

1.3 Aspect botanique général d'un palmier

L'appareil végétatif de la majorité des palmiers présente une architecture caractéristique et aisément reconnaissable. Il se constitue d'un tronc, appelé stipe, pouvant être de grande taille et portant des feuilles palmées ou pennées.

Les palmiers appartiennent au groupe des monocotylédones dont les membres se caractérisent par l'absence de cambium, tissu indifférencié assurant la production des organes nouveaux. Par conséquent, il n'y a ni accroissement des palmiers en épaisseur, ni augmentation du diamètre du tronc.

Une des principales caractéristiques des palmiers est donc leur capacité à former des organismes à port arboré, et ayant une longévité importante, uniquement à partir de processus de croissance primaire (Tomlinson, 2006). En effet tous les tissus d'un palmier sont issus de méristèmes primaires racinaires et apicaux en constant fonctionnement, complétés par des méristèmes intercalaires. Une fois établis, les tissus primaires ne pourront donc pas être remplacés et resteront actifs pendant la durée de vie du palmier, qui peut se mesurer en siècles. Les palmiers ne peuvent être qualifiés d'arbres, mais s'apparentent plutôt à des "herbes géantes".

Les stipes peuvent atteindre de grandes hauteurs et maintenir un port érigé en développant d'abondantes fibres lignifiées, associées ou non aux vaisseaux conducteurs (Tomlinson *et al.*, 2011). Ces fibres se retrouvent également dans les feuilles à qui elles confèrent leur résistance. Le système vasculaire et les fibres occupent l'intégralité du stipe en grands faisceaux verticaux.

Ainsi, Les principaux éléments constitutifs d'un palmier (Figure 3) sont :

- ✓ Le stipe dont l'extrémité est constitué d'un bourgeon apical
- ✓ Les feuilles disposées en forme de couronne
- ✓ Les inflorescences et les fleurs
- ✓ Les fruits et les graines

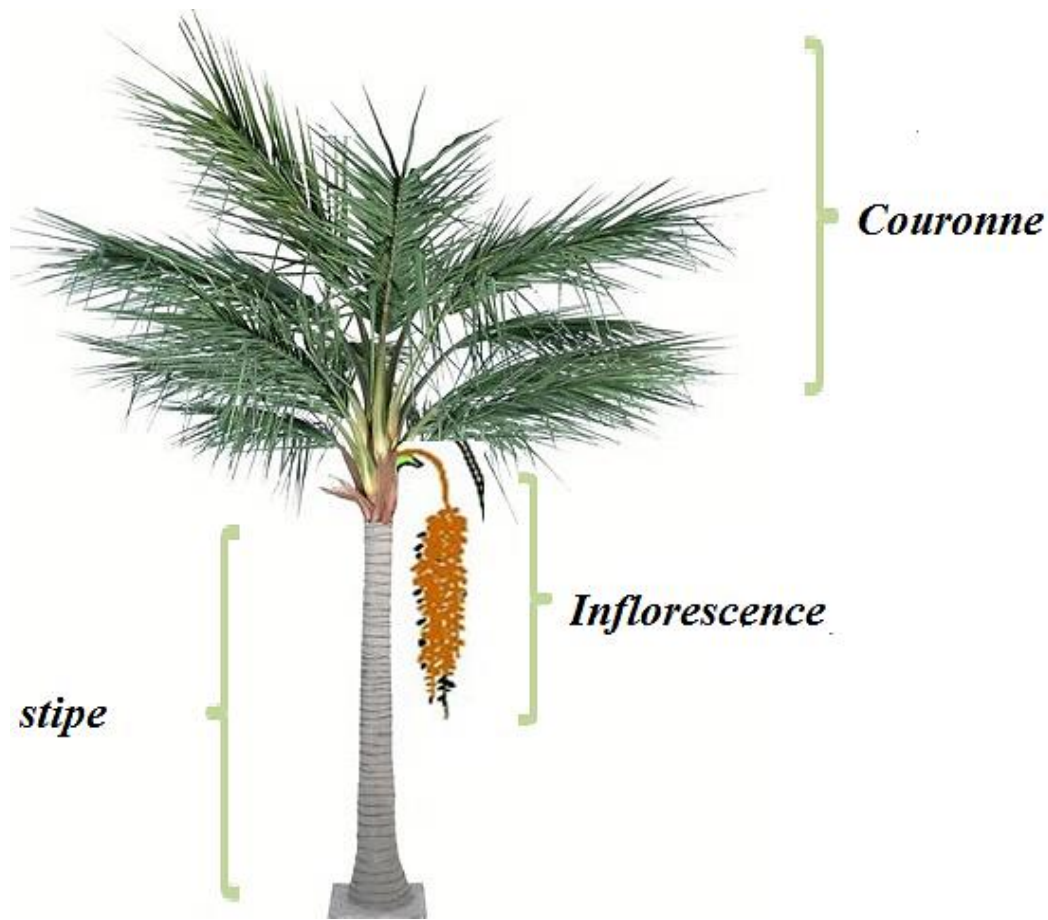


Figure 3 : principaux éléments constitutifs d'un palmier (khan, 1997)

1.3.1 Le stipe

Le stipe se développe au-dessus du sol ou reste sous terre. Sorti du sol, il est massif, en forme de colonne, cylindrique ou renflé, érigé ou rampant, lisse ou sculpté par des cicatrices foliaires.

Les parties souterraines du stipe peuvent atteindre 70 cm de long et 15 cm de diamètre. Le stipe des palmiers est généralement non ramifié (monocaulés) ; en effet un axe dont les capacités mécaniques et de transport sont fixées et limitées par la croissance primaire ne peut pas porter de trop nombreux et volumineux embranchements. Certains palmiers sont, en revanche, multicaules et peuvent avoir des bourgeons axillaires (à la base des feuilles) qui se développent pour former de nouveaux axes (Tomlinson *et al.*, 2011). Le stipe est terminé par un bourgeon apical qui est l'organe vital des palmiers. C'est ce bourgeon qui est responsable du développement du palmier.

1.3.2 Les feuilles

Comme pour la majorité des Monocotylédones, la feuille se divise en trois parties : une partie basale pouvant entourer entièrement le stipe (cette structure est alors appelée la gaine), un pétiole et la partie terminale portant les folioles.

L'étude morphologique permet de définir deux grands types d'organisation principaux de feuilles : palmée ou pennée (Figure 4). En période de floraison, le stipe produit une ou plusieurs unités reproductrices ou inflorescences.



Figure 4 : Illustration des deux principales morphologies de feuille, de gauche à droite : Palmée (*chamaerops humilis*) et pennée (*Calamus gibbsianus*) (photographies Palmweb)

1.3.3 Les inflorescences et les fleurs

Celles-ci sont le plus souvent ramifiées et produisent de très nombreuses petites fleurs. Les inflorescences se développent à la base des feuilles par transformation du bourgeon axillaire en axe reproducteur. Les fleurs de palmiers sont généralement petites, de quelques millimètres à quelques centimètres et chez la majorité des espèces, les fleurs possèdent trois sépales, trois pétales et un ou trois ovules.

1.3.4 Les fruits et les graines

Les fruits sont très variés en forme, couleur et consistance. Ils sont sphériques, ellipsoïdes, ovoïdes, réniformes (en forme de rein), petits à très gros, de moins de 1 cm

jusqu'à plus de 50 cm dans leur plus grande dimension comme *Lodoicea maldivica* par exemple. Certains sont secs, d'autres charnus.

Les fruits se divisent en trois parties distinctes : l'épicarpe, le mésocarpe, et l'endocarpe ; ce dernier englobe la graine qui renferme à son tour l'albumen (Rezaire, 2012).

1.4 Utilisation des palmiers

Les palmiers se classent troisièmes après les *Poaceae* et les *Fabaceae*, dans la liste des familles les plus importantes aussi bien sur le plan économique que culinaire (Haynes et McLaughlin, 2000). Ainsi, beaucoup de fruits issus des palmiers constituent la base de l'alimentation des populations notamment en Amérique du sud, en Asie et en Afrique. La sève tirée du stipe, après fermentation, permet d'obtenir un vin de palme alcoolisé ; Cette pratique est encore très courante en Afrique (Kahn, 1997).

Les palmiers les plus utilisées dans l'alimentation sont : le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*), le cocotier (*Cocos nucifera*), et le palmier à huile (*Elaeis guineensis*). En outre, les palmiers fournissent des matériaux pour la construction des maisons, la fabrication des outils et des meubles et la confection des vêtements ; ils sont aussi utilisés comme combustible et constituent une source de nourriture et de substances médicinales.

1.5 Classification et relations phylogénétiques

La classification des palmiers, basée sur les études phylogénétiques, inclue des données morphologiques, anatomiques et moléculaires ; ces dernières ont permis d'aboutir à la classification la plus récente (figure 5). La classification comprend environ 212 genres qui sont répartis dans 5 sous-familles (les *Calamoideae*, les *Nypoideae*, les *Coryphoideae*, les *Ceroxyloideae* et les *Arecoideae*) (Dransfield *et al.*, 2008).

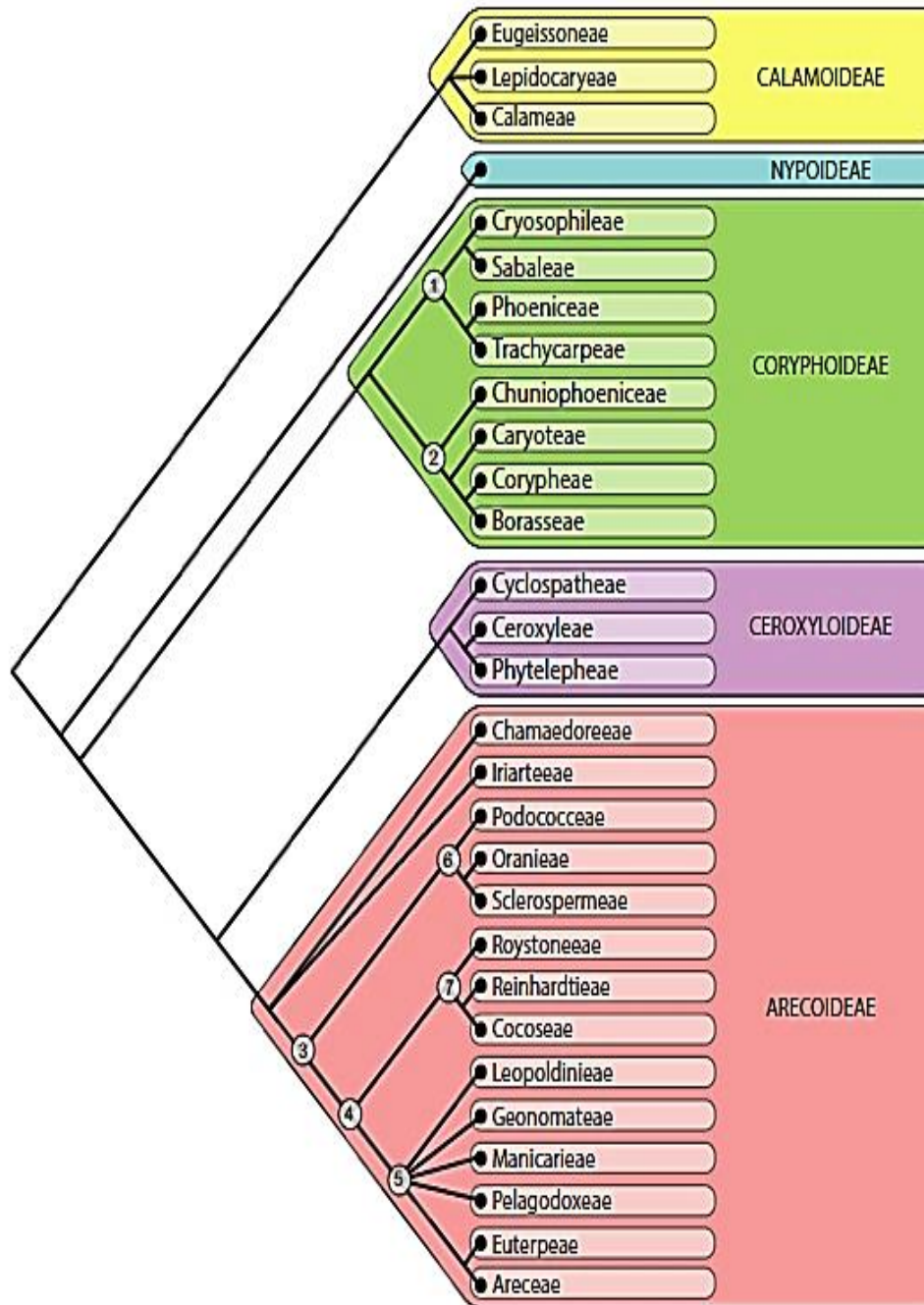


Figure 5 : Classification des palmiers basée sur les études phylogénétiques (Dransfield *et al.*, 2008)

2. L'espèce *Chamaerops humilis* L

D'après García-Castaño *et al.*, (2014), *Chamaerops humilis* L. (palmier méditerranéen ou palmier nain) est originaire de la région méditerranéenne occidentale, du sud-ouest de l'Europe et du nord-ouest de l'Afrique (figure 6).

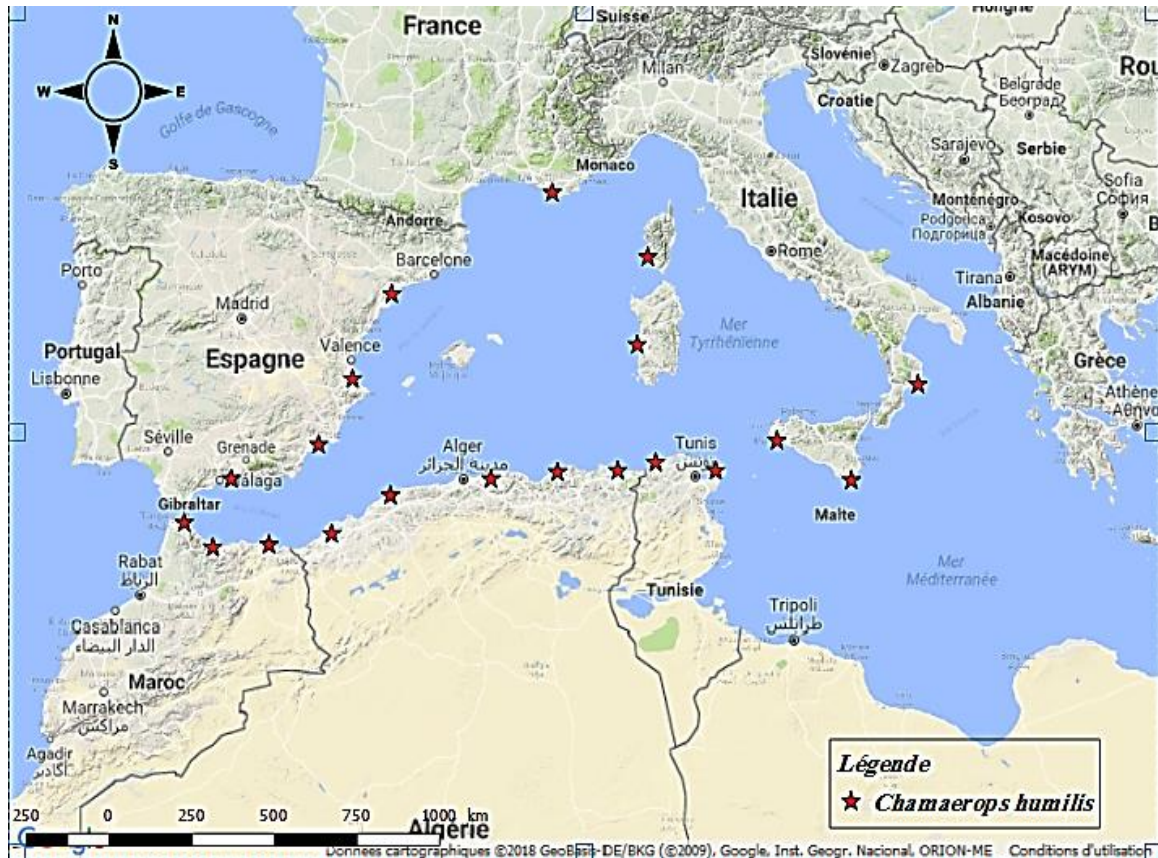


Figure 6 : Différentes régions où *Chamaerops humilis* a été répertorié (García-Castaño *et al.*, 2014).

2.1 Description botanique

C. humilis est un palmier dioïque (fleurs mâles et fleurs femelles sur des plantes différentes) ; Ce palmier est de petite taille ; il fait généralement 2 mètres de haut (figure 7) et se caractérise, notamment, par son stipe (tronc) drageonnant, considéré comme un bioindicateur thermoméditerranéen (Herrera, 1989). Généralement, il n'est pas présent au-delà de 1000 m au-dessus du niveau de la mer, étant plus commun dans les zones côtières.

En raison de sa germination vigoureuse, *C. humilis* est, selon Herrera (1989), très tolérant aux perturbations (feu, herbivorie, etc.). Il fleurit en mars-mai, montrant un système mixte de pollinisation par les insectes et le vent (Anstett, 1999 ; Herrera, 1989). Les feuilles, disposées en rosette terminale, sont palmées en forme d'éventail de 90 cm de diamètre. Le pétiole, long et grêle (jusqu'à un mètre de long), est très épineux. Le limbe est disséqué en 10 à 20 pseudo-folioles allongées et aiguës, raides et coriaces. Les feuilles sont vertes sur la face supérieure et presque blanche en dessous. L'inflorescence est un

spadice, entouré d'une spathe courte (30 cm de long), comprenant de nombreuses petites fleurs jaunâtres, mâles ou femelles.



Figure 7 : (A) Vue d'ensemble du *chamaerops humilis*, (B) fruits (baies) de *chamaerops humilis* (photographies personnelles : 14/10/2014)

Les fruits sont des drupes oblongues de 2 à 5 cm de longueur et de couleur brun rougeâtre à maturité (septembre-novembre) ; Leur pulpe est très fibreuse et légèrement

sucrée. Les fruits sont attachés aux inflorescences (ou branches) jusqu'à 30 cm de long (37-91 fruits par branche). Enfin, les semis émergent au printemps et au début de l'été, subissant une mortalité importante due aux sécheresses estivales et aux herbivores (Jácome-Flores *et al.*, 2016).

2.2 Classification

Ce genre monospécifique doit son nom au grec *chamai*, bas ; *rops*, buisson. Cette espèce de palmier (famille des Arécacées) appartient à la sous-famille des *Coryphoideae* et à la tribu des *Corypheae*. C'est la seule espèce du genre *Chamaerops* (Dransfield *et al.*, 2008).

Groupe :	Spadiciflores
Ordre :	Palmales
Famille :	<i>Areceaceae</i>
Sous-famille :	<i>Coryphoideae</i>
Tribu :	<i>Corypheae</i>
Genre :	<i>Chamaerops</i>
Espèce :	<i>humilis</i> L

2.3 Rôle écologique

Cette espèce est très utile pour lutter contre l'érosion et la désertification car elle se régénère naturellement après les incendies en émettant de nouveaux drageons.

2.4 Exigences écologiques du taxon

Bien que le palmier nain ait été décrit par Herrera (1989) comme une plante sans préférences évidentes quant au type de sol ou de substrat, de récentes études ont constaté une préférence au sol généralement sablonneux et que les basses terres et les marais susceptibles d'être inondés manquaient de palmiers nains (Miguel Jácome-Flores *et al.*, 2016).

Selon Giovino *et al.*, (2014), *C. humilis* est l'une des espèces de palmiers les plus tolérantes au froid (jusqu'à -12°C). Cette espèce tolère très bien le calcaire. La plante préfère des pentes dépassant même les 15%, des sols rocheux, pauvres ou semi-arides

méditerranéens dont le pH ne dépasse pas 7. De plus, *C. humilis* préfère des pluviométries assez élevées (450 – 900 mm) ainsi qu'un ensoleillement et une chaleur élevée.

2.5 Utilisation du *C. humilis*

2.5.1 Utilisation artisanale et industrielle

Les feuilles de cette plante, récoltées en été et séchées au soleil, sont utilisées pour fabriquer des paniers, des sièges de chaises et des balais (Pinto & Pernes, 2010). Les fibres des feuilles sont utilisées dans l'industrie du papier (Pinto & Pernes, 2010). Au niveau alimentaire, il est fait référence à l'utilisation des fruits bien qu'ils aient un goût rugueux. Les feuilles tendres et les bourgeons terminaux sont utilisés en salade (Pinto & Pernes, 2010).

2.5.2 Utilisation médicinale

D'après Benmehdi *et al.*, (2012), *C. humilis* est utilisée dans le traitement de la diarrhée, spasmes et troubles gastro-intestinaux, probablement, en raison de sa richesse en tanins. En médecine traditionnelle marocaine, Gaamoussi *et al.*, (2010) signalent son utilisation dans le traitement du diabète, à travers un mélange aqueux fait à partir de ses feuilles qui ont des effets hypoglycémiantes.

2.6 Données phytochimiques de la plante

Les informations concernant les constituants chimiques de *C. humilis* sont rares, et les travaux existants sont préliminaires. Les travaux de Benhamadi (2012) ; coelho (2017) ont montré que les extraits des feuilles et des fruits étudiés contiennent plusieurs composés chimiques, notamment, tannins galliques, dérivées alcaloïdiques, flavonoïques, composés réducteurs, saponines, stéroïdes et terpénoïdes.

Dans une étude récente portant sur l'analyse chimique de l'huile extraite de la graine d'une variété tunisienne de *C. humilis*, Nehdi *et al.* (2014) ont démontré la présence de composés bénéfiques pour la santé tels que les acides gras et les tocotriénols (forme rare de vitamine E).

2.7 Données pharmacologiques

Des extraits réalisés avec différentes parties de *C. humilis* ont montré des propriétés pharmacologiques significatives. Par exemple, les expériences faites sur les rats ont prouvé que l'extrait aqueux (décoction) des feuilles, possède une activité antidiabétique (Gaamoussi *et al.*, 2010). Les extraits obtenus à partir de différents solvants organiques (hexane, chloroforme) et aqueux des feuilles et fruits de *Chamaerops humilis* ont présenté une activité antibactérienne sur les *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* et *Listeria monocytogenes* (Hasnaoui *et al.*, 2013). Des activités antioxydante et antispasmodique ont aussi été mises en évidence (Benmehdi *et al.*, 2012 ; Coelho *et al.*, 2017).

Chapitre II : Radicaux libres, stress oxydant et antioxydants

Dans ce chapitre, nous allons présenter les molécules responsables de l'oxydation et celles qui permettent de la combattre.

1. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques instables, neutres ou chargées, qui possèdent un électron célibataire sur leur couche périphérique et dont la toxicité est importante (Halliwell, 1999). Pour retrouver un état plus stable, ils réagissent avec d'autres molécules (les substrats biologiques) dans le but de récupérer un électron.

On peut distinguer les radicaux primaires formés directement à partir de l'oxygène ou de l'azote et sont appelés Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) ou Espèces Réactives de l'azote (ERN) et les radicaux secondaires, issus de la réaction des radicaux primaires avec des entités biochimiques cellulaires (lipides, protéines, glucides...) (Gardès-Albert *et al.*, 2003 ; Favier *et al.*, 2003).

La formation des différents radicaux libres à partir de l'oxygène (O₂) est résumée dans la figure 8

1.1 Le radical superoxyde, O₂^{•-}

L'anion superoxyde est une ERO primaire, formée par l'acquisition d'un électron par l'oxygène moléculaire ; Radical ayant la réactivité la plus faible parmi les radicaux libres du stress oxydant, il est généré à partir de différentes sources dans les conditions physiologiques et physiopathologiques (Gardès-Albert *et al.*, 2005). Il est cependant hautement réactif avec certains métaux de transition comme le cuivre, le fer et le manganèse (Abreu *et al.*, 2010).

Le radical superoxyde ne traverse pas rapidement la membrane plasmique et se dismute spontanément au pH physiologique en produisant du peroxyde d'hydrogène :



L'anion superoxyde O₂^{•-} et sa forme acide ont une faible réactivité ; En revanche, en présence de cation métallique, l'anion superoxyde O₂^{•-} donne naissance au radical hydroxyle OH[•], ou acide hypochloreux très réactif.

1.2 Le peroxyde d'hydrogène, H₂O₂

Ce n'est pas un radical libre, à proprement parler, mais une molécule car tous ses électrons périphériques sont appariés. Le peroxyde d'hydrogène est généralement

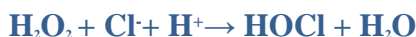
considéré comme une ERO relativement faible mais hautement réactive, en particulier dans sa capacité à réagir avec les cations métalliques tels que Fe^{2+} (réaction de Fenton) ou Cu^{+2} , ce qui génère des radicaux hydroxyles HO^\bullet (Wardman *et al.*, 1996).



Il se forme par dismutation de l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet -}$ sous l'action d'une enzyme : la superoxyde dismutase (SOD) (Belkheiri, 2010).

1.3 L'acide hypochloreux, HOCl

Comme le peroxyde d'hydrogène, l'acide hypochloreux ne rentre pas dans la définition stricte du radical. Cependant, au cours de l'inflammation, la métabolisation du peroxyde d'hydrogène en acide hypochloreux, par une enzyme, est élevée et l'acide hypochloreux est un agent chlorant et oxydant fort.



L'acide hypochloreux est considéré comme 100 à 1000 fois plus toxique que le radical superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène et a des cibles bien marquées : inactivation enzymatique, oxydation des groupements thiols de la membrane plasmique, diminution des propriétés d'adhésion de certains composés de la matrice extracellulaire (Lenoir, 2011).

1.4 Le radical hydroxyle, HO^\bullet

Le radical hydroxyle HO^\bullet est considéré comme l'ERO la plus réactive (toxique) (Lubec, 1996) ; il est particulièrement délétère vis-à-vis des matériaux biologiques. Il est formé à partir du peroxyde d'hydrogène au cours de la réaction de Fenton ou à partir de l'anion superoxyde dans la réaction d'Haber-Weiss ou sous l'effet de radiations ionisantes (rayons X ou gamma).



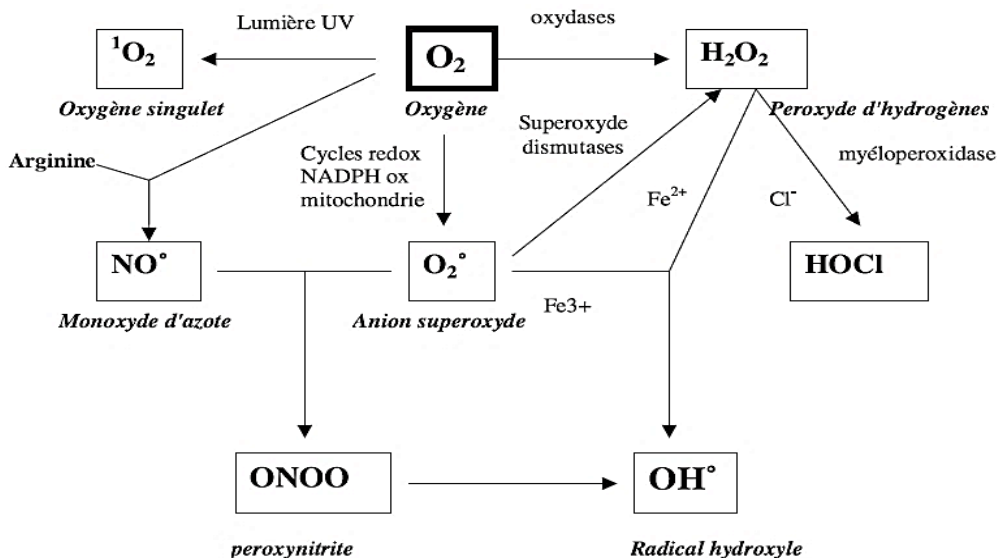


Figure 8 : Formation de radicaux libres à partir de l’oxygène (Favier, 2003)

2. Le Stress oxydant

La génération des espèces réactives de l’oxygène (ERO) se produit naturellement au cours de la respiration cellulaire. Les ERO désignent une appellation collective et comprennent les radicaux libres. Les ERO endommagent la vie cellulaire en causant l’oxydation des lipides, des protéines et de l’acide désoxyribonucléique (ADN).

Dans des conditions normales, ces radicaux libres sont physiologiquement en équilibre avec des composés antioxydants. Dans certaines conditions, au cours d’une inflammation ou en réponse à certains facteurs environnementaux comme les irradiations (UV ou rayons X), les carences nutritionnelles (en vitamines et oligo-éléments), le tabac, la pollution ou les intoxications aux métaux lourds (mercure, plomb, cadmium), la production de ces radicaux libres augmente générant un déséquilibre en faveur des entités oxydantes appelé « stress oxydatif » (Favier, 2003). En d’autres termes, "stress oxydant" ne signifie pas présence mais excès de ces agents oxydants ; Il apparaîtra si la production d’ERO est trop importante pour être régulée ou bien si le système antioxydant est défaillant (Dickinson & Forman, 2002).

2.1 Les cibles des ERO

La présence d’espèces activées de l’oxygène a des conséquences potentiellement graves pour la cellule

2.1.1 Oxydation des composés lipidiques

Les acides gras polyinsaturés ainsi que les phospholipides membranaires sont les cibles privilégiées des attaques oxydatives. Les membranes sont plus particulièrement

visées par le radical hydroxyle capable d'arracher un atome d'hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons (Lenoir, 2011).

La peroxydation lipidique provoque une désorganisation de la structure, une diminution de sa fluidité et une altération de son fonctionnement. Elle peut aussi participer au dépôt de lipides oxydés dans les vaisseaux et les tissus âgés, et contribuer à la genèse de dérivés carcinogènes (Techer, 2013).

2.1.2 Oxydation des composés protéiques

La modification structurale mineure d'une protéine peut induire une forte variabilité dans le fonctionnement de celle-ci. Les radicaux libres peuvent provoquer différents types de dégradation sur une protéine pouvant conduire à la perte de son activité : fragmentation au niveau des liaisons peptidiques, oxydation des chaînes latérales, formation de liaisons intra ou interprotéines. Les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine, tryptophane) sont les plus sensibles.

L'attaque des radicaux libres sur les fonctions thiols (SH) des cystéines conduit à la formation de ponts disulfures (S-S), ce qui modifie la protéine qui peut être éliminée par le protéasome (Techer, 2013). Comme pour les lipides, c'est le radical hydroxyle qui est le plus réactif pour induire les altérations. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, anti-enzyme, récepteur...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome. Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales. Elles vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules. Ces amas, associés aux lipides, forment les dépôts de lipofuschines caractéristiques des tissus des sujets âgés (Favier, 2003).

2.1.3 Oxydation de l'ADN

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible, à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. Selon Favier (2003), HO• peut générer des dommages oxydatifs. Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases

modifiées. Mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose (Valko *et al.*, 2006), créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin. Ces altérations du matériel génétique, si elles ne sont pas réparées, peuvent engendrer la mutagenèse, la carcinogenèse ainsi que le vieillissement (Favier, 2003).

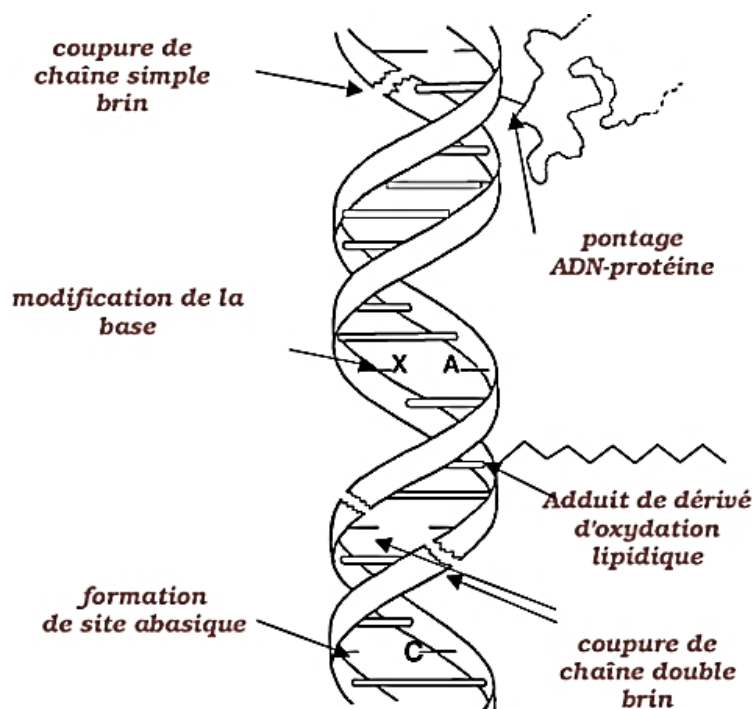


Figure 9 : Actions des radicaux libres sur l'ADN (Favier, 2003)

3. Les antioxydants

Pour protéger ses tissus contre toute agression radicalaire, l'organisme humain possède des systèmes antioxydants : définis comme des substances capables, à des concentrations relativement faibles, de retarder ou d'inhiber l'oxydation de substrats (Halliwell, 1999).

Parmi les différents antioxydants, les plus connus sont les polyphénols, les vitamines A, C et E, et les enzymes superoxyde-dismutase (SOD), catalase (CAT) et glutathion peroxydase (GPX). D'autres antioxydants comme les caroténoïdes, le coenzyme Q10, les antioxydants minéraux (cuivre, zinc, manganèse et le sélénium) et les cofacteurs (les vitamines B1, B2, B6, B12) peuvent aussi défendre de façon synergique l'organisme contre le stress oxydant (Belkheiri, 2010). Les antioxydants peuvent être enzymatiques ou non enzymatiques. Ces derniers pourront alors être soit endogènes, soit exogènes.

3.1 Les systèmes antioxydants enzymatiques

Ces enzymes permettent de maintenir la concentration en espèces radicalaires à un taux basal (homéostasie physiologique) ; Elles possèdent, en effet, une grande affinité pour les ERO, avec lesquelles elles réagissent très rapidement pour les neutraliser.

3.1.1 La Superoxyde dismutase (SOD)

La superoxyde dismutase est une métalloprotéine présente sous deux formes chez les eucaryotes. La plus importante a pour cofacteurs le cuivre et le zinc (CuZn-SOD) et se situe dans le cytoplasme de toutes les cellules ; L'autre enzyme a pour cofacteur le manganèse (Mn-SOD) et pour localisation les mitochondries (Hadi, 2004).

La SOD est une des plus importantes enzymes cellulaires possédant une fonction antioxydante. C'est l'enzyme antioxydante "anti-O₂^{•-}" la plus importante dans toutes les cellules vasculaires car elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en eau oxygénée. L'absence de cette enzyme peut être létale (Salvayre *et al.*, 2003 ; Soullère *et al.*, 2002).

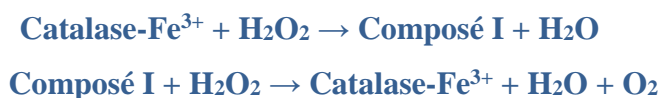


3.1.2 La catalase

La catalase est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes. Elle catalyse la réaction de détoxification du H₂O₂ (généralement produit par la SOD). Elle est surtout présente au niveau des globules rouges et du foie. (Valko *et al.* 2006).



Elle est formée de quatre chaînes polypeptidiques comportant, chacune, un groupement ferriprotoporphyrine avec un atome de fer à l'état Fe³⁺. Pour catalyser la réaction, l'atome de fer de l'hème de la catalase réalise une coupure hétérolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène, créant de ce fait une molécule d'eau et un radical porphyrine nommé composé I hautement oxydant ; ce dernier peut ensuite oxyder une autre molécule de peroxyde d'hydrogène pour donner du dioxygène.



3.1.3 La glutathion peroxydase (GPx)

La GP_x est formée de quatre sous-unités contenant chacune un atome de sélénium sous forme de sélénocystéine. La glutathion peroxydase est présente dans les liquides extracellulaires et dans les cellules au niveau du cytosol et des mitochondries.

Les GP_x sont des enzymes qui jouent le même rôle catalytique que la catalase, à savoir la réduction des hydroperoxydes (H₂O₂) et des peroxydes lipidiques (ROOH) en utilisant le glutathion réduit (GSH) (Théron *et al.* 2005; Brigelius-Flohe *et al.* 2009).

La régénération du GSH réduit à partir du GSSG se fait par l'action de la GR, une enzyme à flavine qui fonctionne par oxydation du NADPH fourni par la voie des pentoses phosphates (Théron *et al.*, 2005).

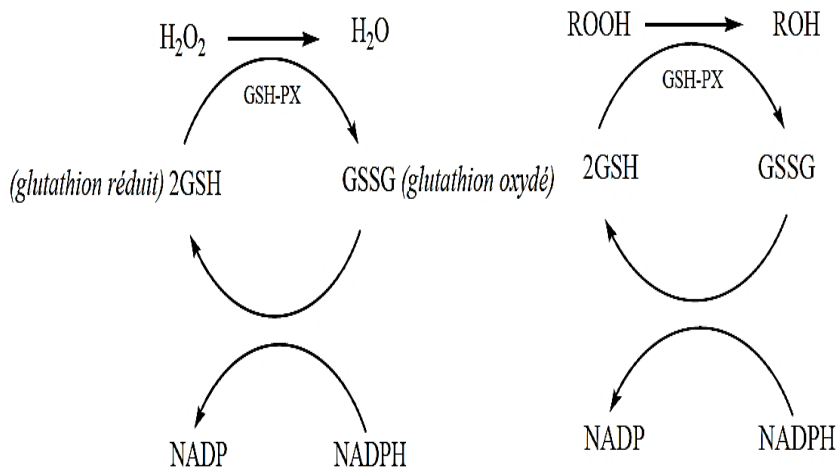


Figure 10 : action détoxifiante vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes (ROOH) dérivés des lipides (Hadi, 2004).

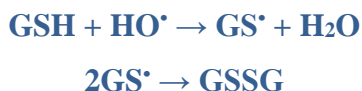
3.2 Les systèmes antioxydants non-enzymatiques

Ce groupe d'antioxydants est constitué de plusieurs composés capables de réagir directement ou indirectement avec les ERO ; on distingue des composés endogènes (molécules issues de la biosynthèse) et des composés exogènes, (vitamines C et E, polyphénols...) principalement apportés à l'organisme par l'alimentation (Techer, 2013). Les polyphénols seront détaillés dans le chapitre suivant.

3.2.1 Les antioxydants endogènes

3.2.1.1 Le Glutathion

Le glutathion (GSH) est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine). Le glutathion est le thiol le plus abondant dans les organismes et les systèmes vivants (fig.11). Il est antioxydant par son caractère nucléophile et radicalaire (Baudin *et al.*,2006).



Le GSH joue son rôle d'antioxydant en tant que substrat d'enzymes antioxydantes telles que les glutathion peroxydases (GPx), mais également par ses propriétés intrinsèques. En effet, le glutathion prévient l'oxydation des groupements thiols grâce à son pouvoir réducteur. Il peut également chélater les ions cuivreux Cu^+ et limiter ainsi leur participation à la réaction de Fenton. Il est directement impliqué dans la réparation des atteintes oxydatives à l'ADN (Lenoir, 2011).

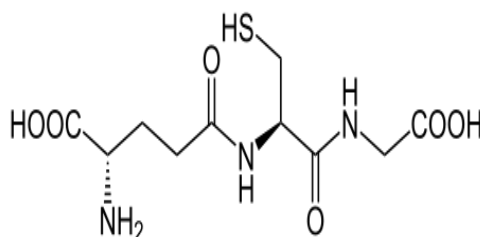


Figure 11 : structure du glutathion (Lenoir, 2011)

3.2.1.2 L'acide urique

L'acide urique, présent sous forme d'urate (forme ionisée) à pH physiologique, possède des propriétés antioxydantes. L'acide urique est un piègeur des radicaux peroxydes et hydroxyles (RO_2^\bullet et HO^\bullet). La réaction de l'acide urique avec ces ERO génère des radicaux moins réactifs que HO^\bullet . Il peut également chélater les ions métalliques et donner des chélates peu réactifs sur le plan catalytique (Whiteman *et al.*, 2002).

3.2.1.3 Le coenzyme Q

Le coenzyme Q est présent dans les membranes cellulaires et dans les lipoprotéines (composé hydrophobe) où il joue un rôle d'antioxydant. Il est également présent dans la chaîne mitochondriale de transport d'électrons. L'ubiquinol (forme réduite du coenzyme Q) contenu dans les LDL (low density lipoprotein) joue un rôle important dans leur résistance à l'oxydation (Lenoir, 2011).

3.2.2 Les antioxydants exogènes

3.2.2.1 La vitamine C (ou acide ascorbique)

La vitamine C (fig. 12) est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présent dans les fluides intra- et extracellulaires (compartiments hydrophiles). Elle peut directement réagir avec des espèces oxygénées et/ou azotées (majoritairement l' $O_2^{\bullet-}$ et $ONOO^-$) et former le radical semi déshydroascorbate. Peu réactif, ce dernier est rapidement oxydé en acide déshydroascorbique. La vitamine C peut également contribuer à limiter la peroxydation lipidique en régénérant d'autres antioxydants comme la vitamine E. Il faut, toutefois, signaler qu'à forte dose et en présence de quantités importantes de fer, elle peut se comporter comme un pro-oxydant générateur de radicaux libres (Hadi, 2004).

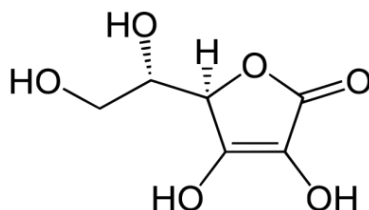


Figure 12 : acide ascorbique (Hadi, 2004).

3.2.2.2 La vitamine E (ou α -tocophérol)

La vitamine E désigne sous un terme générique toutes molécules possédant des activités biologiques identiques à celle de la famille des tocophérols (fig. 13). Sa structure moléculaire comporte une extrémité hydrophile, correspondant au noyau chromanol et une extrémité hydrophobe (chaîne phytyle). Cette structure lui permet de capter les radicaux libres :

- dans les zones lipophiles des membranes cellulaires, grâce à sa chaîne phytyle.
- dans les zones hydrophiles, à la surface des membranes plasmiques, grâce à son hydroxyle phénolique.

La vitamine E est la molécule antioxydante liposoluble la plus abondante dans notre organisme. Elle est présente dans les membranes cellulaires et circule dans le sang liée aux lipoprotéines. Elle est chargée de neutraliser les radicaux libres en excès et agit de deux façons différentes, soit en piégeant directement les ERO, soit en régulant à la hausse les enzymes antioxydantes, telles que la SOD, la glutathion peroxydase, la catalase du foie, la glutathion-transférase et la NAD(P) H réductase (Vertuani *et al.*, 2004).

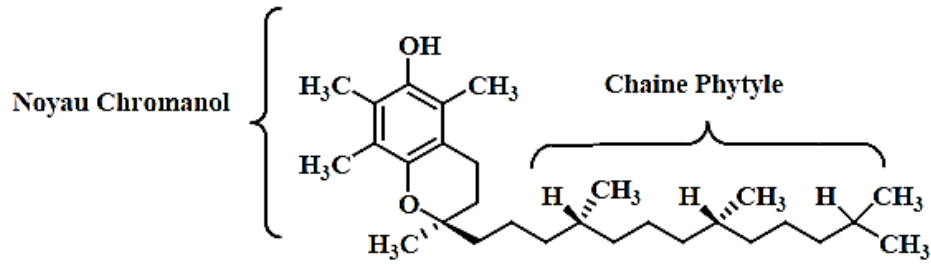


Figure 13 : Structures chimiques des tocophérols (Belkheiri, 2010).

3.2.2.3 Les antioxydants phénoliques

Les phénols sont des molécules qui contiennent un ou plusieurs noyaux aromatiques avec un ou plusieurs groupes hydroxyle (OH). Leur capacité antioxydante réside dans leur faculté à « terminer » les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons et à chélater les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique (Schroeter *et al.*, 2002 ; Leopoldini *et al.*, 2011).

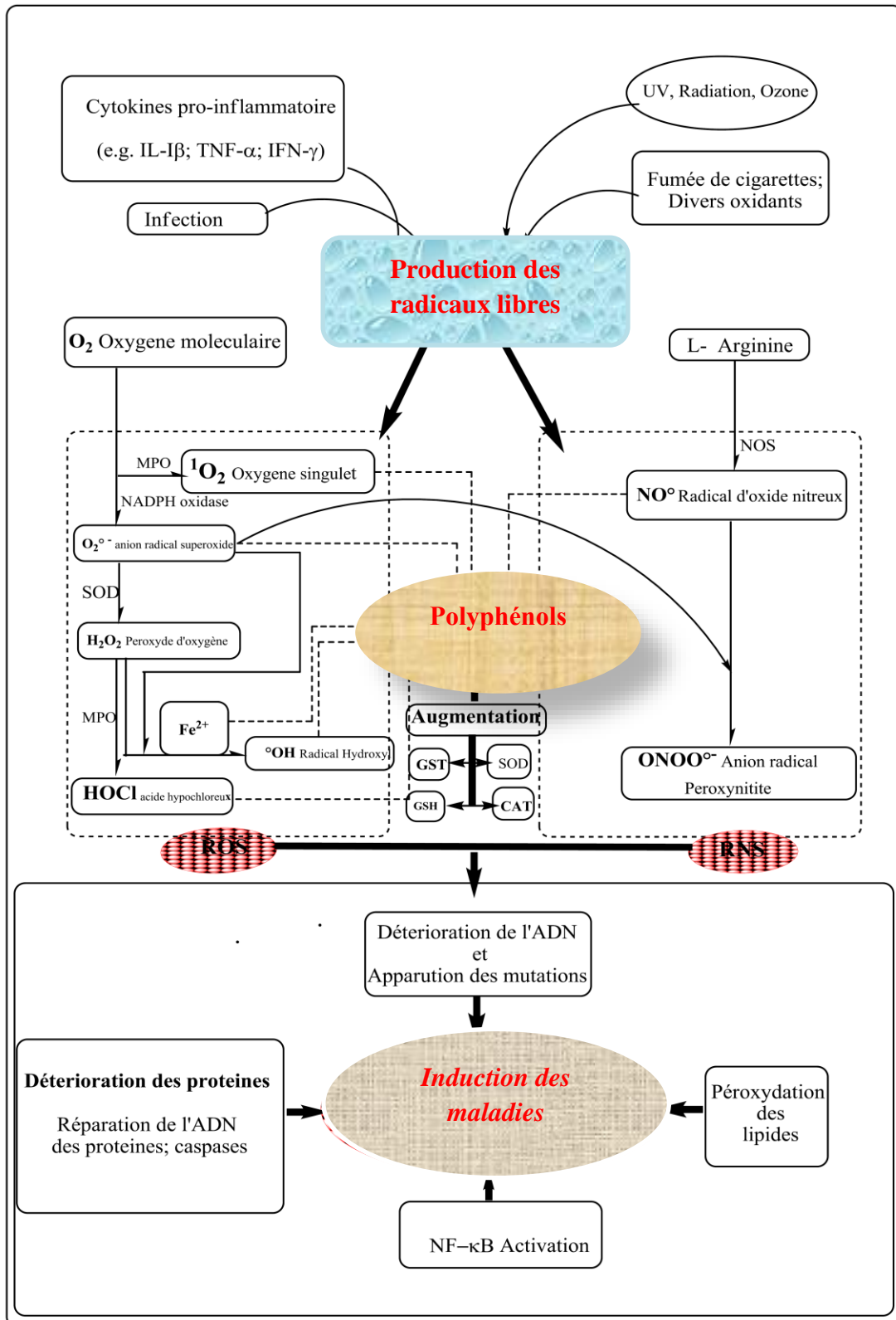


Figure 14 : antioxydant, polyphénols et prévention de certaines maladies (Rezaire, 2012)

Chapitre III : Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont dotés d'un grand pouvoir antioxydant ; pour cela, l'un des objectifs principaux de la thèse sera l'évaluation de l'activité antioxydante par voie chimique des biomolécules issues des feuilles et des baies du palmier nain (*C. humilis*), reconnues pour leur aptitude à piéger les radicaux libres.

1. Généralités sur les polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires synthétisés par les végétaux pour se défendre contre les agressions environnementales (Buchanan *et al.*, 2000). Il s'agit de molécules organiques possédant un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. On compte, à l'heure actuelle, pas loin de 8000 composés (Lobstein, 2010).

La large variété de polyphénols peut être divisée en une dizaine de classes dont la structure chimique peut être répartie en deux grands groupes, les flavonoïdes et les non flavonoïdes (Corona, 2011).

1.1 Les non flavonoïdes

Les composés non-flavonoïdes regroupent les acides phénoliques et les stilbènes ; Ils ne possèdent pas de squelette « flavone ».

1.1.1 Les acides phénoliques

On distingue deux principales classes d'acide phénolique ; les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. Les composés les plus fréquents sont l'acide *p*-coumarique, l'acide caféique (les acides hydroxycinnamiques), l'acide vanillique (les acides hydroxybenzoïques), l'acide gallique (Rezaire, 2012).

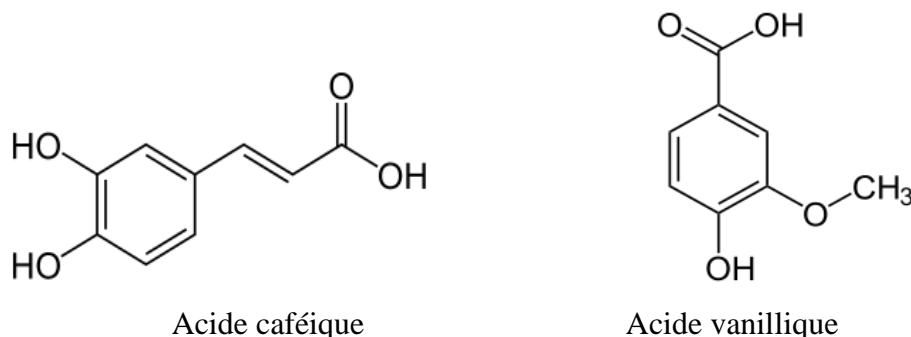


Figure 15 : structures de certains acides phénoliques (Michel, 2011)

1.1.2 Les Stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par un groupe éthylénique (C6-C2-C6), formant un système conjugué. Le plus connu d'entre eux est le resvératrol, qui a été largement étudié pour ses propriétés anticancéreuses mises en évidence lors de l'étude des activités biologiques de plantes médicinales (El Gharras, 2009).

1.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes (fig. 16) sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phenyl chromone portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides. Ces composés ont une structure de base formée de 2 noyaux benzéniques A et B reliés par un noyau C qui est un hétérocycle pyranique (Lobestein, 2010).

Le terme flavonoïde rassemble de nombreux composés naturels répartis en plusieurs familles. On dénombre près de 6500 flavonoïdes répartis en 12 classes, et dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les isoflavones et les anthocyanines (Stöckigt *et al.*, 2002).

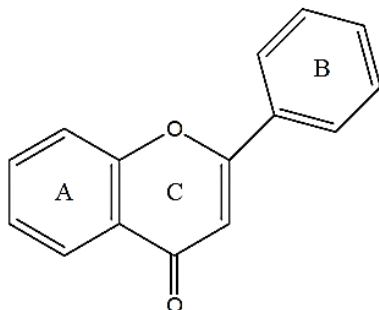


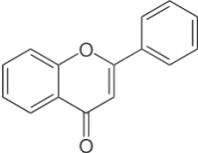
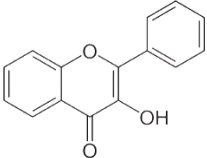
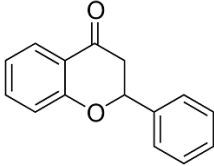
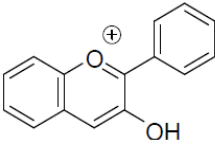
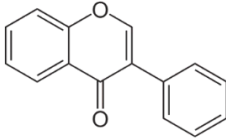
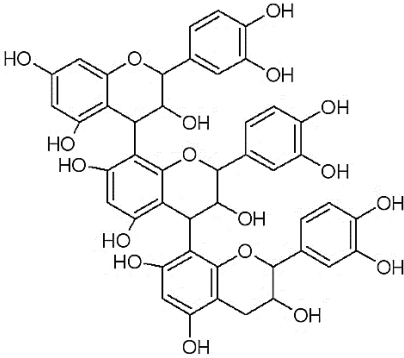
Figure 16 : Structure de base des flavonoïdes (Michel, 2011).

Dans la plupart des cas, les flavonoïdes sont présents sous forme glycosidique dans les vacuoles des fleurs, des feuilles, des tiges ou des racines. Les flavonoïdes aglycones, notamment les flavonoïdes simples et polyméthylés, sont plutôt présents sous forme de cires dans les feuilles, les écorces, les bourgeons floraux (Iwashina, 2000).

1.2.1 Classification des flavonoïdes

Comme l'indique le tableau 2 plusieurs classes de flavonoïdes apparaissent en fonction du degré d'oxydation du noyau pyranique central.

Tableau 2 : Différentes classes des flavonoïdes (Sartori-Thiel, 2003 ; Hallgas *et al.*, 2004)

Classe	Structure de base
Flavone	
Flavonol	
Flavanone	
Anthocyanidines	
Isoflavonoïdes	
Proanthocyanidines Ou Tanins condensés	

1.2.1.1 Les flavones

De tous les flavonoïdes, cette sous-classe est la moins abondante dans les fruits et légumes. Ils sont essentiellement constitués de lutéoline et apigénine glycosylés ; Caractérisés par une structure C6-C3-C6 avec une liaison C2-C3 insaturé et une fonction cétone (Rezaire, 2012).

1.2.1.2 Les flavonols

Les flavonols sont les flavonoïdes les plus abondants dans l'alimentation. Les composés les plus représentatifs de cette famille sont le kaempferol et la quercétine (Rezaire, 2012) ; ils se caractérisent par la présence d'un groupement hydroxyle (OH) en position 3 de l'hétérocycle central C.

1.2.1.3 Les flavanones

Les flavanones sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2,3 et la présence d'un centre chiral en position 2. Elles sont synthétisées à partir des chalcones, grâce à une chalcone isomérase (Morel, 2011).

1.2.1.4 Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des flavonoïdes qui portent une charge sur l'oxygène de l'hétérocycle central C. Ce sont des composés responsables de la plus grande partie des couleurs rouge, violet et bleu observées dans la nature (Buchanan *et al.*, 2000).

1.2.1.5 Les Isoflavonoïdes

Les isoflavonoïdes diffèrent des autres flavonoïdes par la position du cycle B, qui dans le cas des isoflavonoïdes est attaché en position 3 (en 2 pour les autres flavonoïdes), formant un squelette de base 1,2-diphénylpropane (Morel, 2011).

1.2.1.6 Les tanins condensés

Ces composés sont aussi connus sous le nom de proanthocyanidines. Ces composés possèdent, comme structure de base, le flavan-3-ol ou le flavan-3,4-diol (Bruneton, 1999). Ces tannins ne renferment pas de sucres dans leurs molécules. Ils ne sont pas hydrolysés par les acides, comme c'est le cas des tannins hydrolysables.

Ils diffèrent fondamentalement des tanins galliques et ellagiques (tanins hydrolysables) :

- leur structure est voisine de celle des flavonoïdes
- ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule

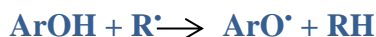
Les tanins condensés sont des oligomères et polymères (correspondant à l'union de 2 à 10 unités de catéchine) qui sont liés entre eux en position C4, C8 ou encore C6 (Tarascou *et al.*, 2011).

2. Mécanismes antioxydants des systèmes phénoliques

Les principaux oxydants dans les milieux biologiques sont les radicaux libres et les métaux de transition. Les polyphénols désactivent les radicaux libres via trois mécanismes :

2.1 Transfert d'atome d'hydrogène (HAT, hydrogen atom transfer)

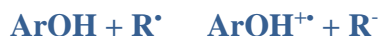
L'antioxydant phénolique agit avec le radical libre par transfert d'un atome d'hydrogène via la rupture homolytique de la liaison O-H.



Les produits de cette réaction sont la forme réduite (RH) du radical néfaste et le radical ArO[•] (forme oxydée de l'antioxydant). Bien que cette réaction donne naissance à un autre radical libre, celui-ci est moins réactif (Leopoldini *et al.*, 2011).

2.2 Transfert mono-électronique d'électron (SET, single electron transfer)

Dans ce mécanisme, un électron est transféré au radical libre R[•]. L'anion R⁻ et le cation radical ArOH^{•+} ainsi formés sont généralement des entités stables.



Le potentiel d'ionisation est le facteur déterminant du pouvoir piègeur d'électrons. Un potentiel bas implique un arrachement facile d'électron et en conséquence une réaction avec le radical libre (Leopoldini *et al.*, 2011).

2.3 La chélation des métaux de transition (Transition Metals Chelation, TMC)

C'est un mécanisme indirect ; Il consiste à la chélation des métaux de transition, tels que le fer ou le cuivre, conduisant à des composés plus stables (Brown *et al.*, 1998 ; Jovanovic *et al.*, 1998 ; Van Acker *et al.*, 1996). Les polyphénols peuvent piéger les métaux et éviter ainsi leur participation aux réactions génératrices des radicaux libres. En effet, certains métaux, dans leur faible état d'oxydation (principalement Fe²⁺), peuvent être impliqués dans les réactions de Fenton avec le peroxyde d'hydrogène, à partir duquel l'espèce d'oxygène réactif OH[•] est formée (Leopoldini *et al.*, 2011).

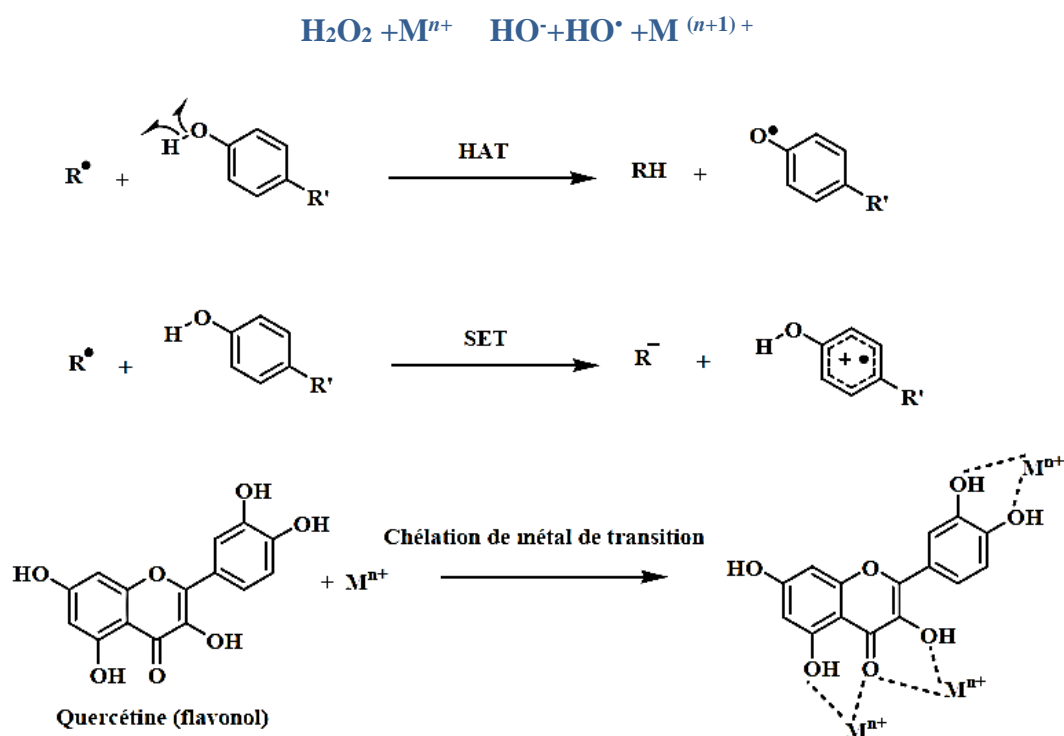


Figure 17 : Mécanismes antioxydants des polyphénols (Leopoldini *et al.*, 2011)

3. Effet de la structure des composés phénoliques sur l'action antiradicalaire

Selon leur structure, les composés phénoliques sont capables de réagir et de neutraliser les radicaux libres produits par notre organisme.

Les éléments structuraux indispensables à l'obtention d'une activité antioxydante sont indiqués dans le tableau 3.

Tableau 3 : Effet de la structure sur les activités antioxydants des polyphénols (Chebil, 2006).

Activité	Facteurs améliorant le pouvoir antioxydant
anti-radicalaire	<ul style="list-style-type: none"> - le nombre de groupements OH disponibles - la méthylation (CH₃) - groupements (OCH₃) sur C-3 - une fonction catéchol sur le cycle B
Complexation métallique	<ul style="list-style-type: none"> - la présence d'une partie catéchol - la présence d'un sucre (glycosylation)

4. Propriétés biologiques des polyphénols

4.1 Activité antioxydante

Les polyphénols et, en particulier, les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de l'oxydation. Le rôle protecteur de divers composés phénoliques vis-à-vis de la peroxydation lipidique a fait l'objet de nombreuses études (Chan *et al.*, 2014; Tátraaljai *et al.*, 2014 ; Wu *et al.*, 2015). La propriété antiradicalaire des flavonoïdes est étroitement liée à leur structure, en particulier au phénomène de résonance électronique stabilisant exercé par les noyaux aromatiques.

4.2 Activités antibactérienne, antifongique et antivirale

La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des microorganismes est souvent corrélée avec la synthèse des composés phénoliques ; il n'est donc pas surprenant que certains de ces composés possèdent un potentiel en thérapeutique contre les microorganismes (bactéries, virus, champignons).

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Ces composés agissent par deux mécanismes d'actions : le premier consiste à l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique dans les bactéries et le deuxième provoquant l'endommagement des membranes cellulaires des bactéries (Tsuchiya et Linuma, 2000).

Selon Martins *et al.*, (2013), les feuilles de *Larrea tridentata* posséderaient des propriétés antimicrobiennes importantes du fait qu'elles possèdent de nombreux polyphénols, notamment le kaempferol et la quercétine.

4.3 Activité vasodilatatrice

D'après Muanda, (2010) les polyphénols participeraient à la prévention des maladies cardio-vasculaires. Les flavonoïdes favorisent la relaxation vasculaire et empêchent l'agglutinement des plaquettes sanguines. Par conséquent, ils réduisent la coagulation du sang et le rendent plus fluide. Ils limitent l'oxydation des lipides sanguins et contribuent à la lutte contre les plaques d'athérome. Ils sont aussi anxiolytiques et protègent nos artères contre l'athérosclérose et réduisent la thrombose (caillots dans les artères).

4.4 Activité anti-inflammatoire

Les polyphénols sont capables de moduler le système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes tels que les phosphodiesterases, qui peuvent être responsables des inflammations. Ils peuvent aussi moduler la prolifération des lymphocytes B et T durant l'inflammation en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires (González-Gallego *et al.*, 2007) ; d'autres flavonoïdes sont capables d'inhiber l'histamine (Kim *et al.*, 2004).

4.5 Activité anticancéreuse

Depuis longtemps, on associe le cancer avec le type d'alimentation ; de nombreux chercheurs ont étudié le rôle des nutriments dans le développement des cancers (Mojarrab *et al.*, 2013 ; Khlifi *et al.*, 2013 ; Dhingra *et al.*, 2017). Plus récemment des recherches expérimentales suggèrent que les flavonoïdes seraient parmi les substances susceptibles de retarder, voire, d'empêcher l'apparition de certains cancers ; La quercétine, en particulier, peut prévenir les cancers et, notamment, diminuer l'incidence des tumeurs mammaires induites chez le rat. Les travaux réalisés par Mojarrab *et al.* (2013) montraient que les polyphénols extraits à partir d'*Artemisia armeniaca* avaient la capacité d'induire l'apoptose des cellules cancéreuse (K562 et HL-60 cell).

Chapitre IV : Matériels et Méthodes

1. Echantillonnage

Feuilles et baies de *Chamaerops humilis*, identifiées par le Dr Hamel Tarek (Botanique et Biologie de l'environnement, Université d'Annaba), ont été collectées dans leur habitat naturel autour de la plage de Seraïdi "Jnane El Bey" Wilaya d'Annaba (Figure 18). Ces parties de plante ont été choisies essentiellement sur la base de leur fréquence d'emploi en médecine traditionnelle obtenue au cours de l'enquête ethnobotanique. Leurs conditions de récolte sont réunies dans le Tableau 4.

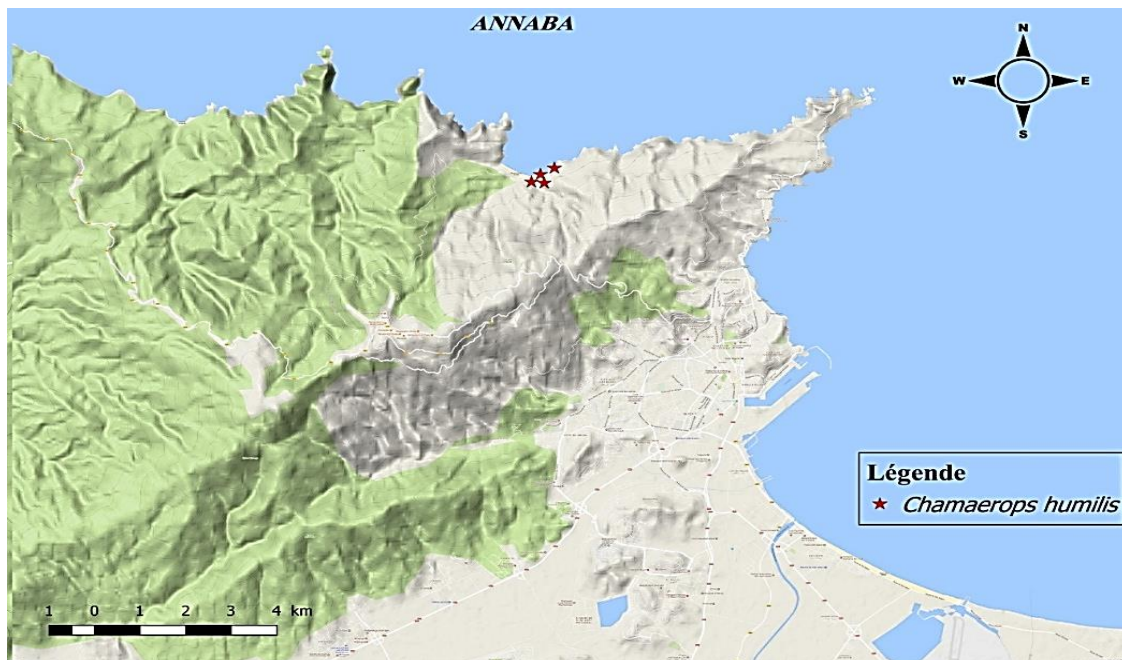


Figure 18 : Site de récolte de *Chamaerops humilis* (QGIS, 2017)

Tableau 4 : Récapitulatif des conditions de récoltes de *C.humilis*

Date de récolte	Coordonnées géographiques	Organes	Stade de développement	Etage bioclimatique	Milieu végétatif
14/10/2014	Latitude 36°56'56.3"N Longitude 7°42'34.1"E	feuilles baies	Fruits mûrs (estimé visuellement)	Humide supérieur à hiver tempéré	Maquis méditerranéen

Juste après leurs récoltes, les feuilles et les baies sont débarrassées des salissures à l'eau du robinet puis lavées à l'eau distillée. On procédera ensuite à un séchage de 2 semaines

pour les feuilles et de 3 semaines pour les baies, à l'abri de la lumière pour éviter la perte des substances bioactives. Les feuilles et les baies sont étalées en couches minces pour optimiser le séchage afin d'éviter les moisissures.

Après séchage, feuilles et baies ont été broyées finement à l'aide d'un moulin à café. 100 grammes de poudre obtenue pour chaque partie de la plante sont stockés dans des bocaux ambrés adaptés à l'abri de l'air et de l'humidité.

2. Analyses phytochimiques préliminaires

Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques contenus dans un organe végétal. Parmi les groupes phytochimiques les plus importants on peut citer : les alcaloïdes, les polyphénols (flavonoïdes, anthocyanes, tannins), les saponosides, les sucres réducteurs (oses-holosides et mucilages). Ces tests se basent généralement sur l'apparition d'une couleur distinctive ou d'une précipitation spécifique à la molécule chimique recherchée.

2.1 Caractérisations des Tanins (Muanda, 2010)

5 g de poudre végétale dans 100 ml d'eau bouillante. Après infusion pendant 15 mn, 200 µl de FeCl₃ (1%) sont ajoutés à 1 ml du liquide d'infusion ; En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu - noir.

La différenciation entre les tanins galliques et catéchiqes se fait par l'utilisation du réactif de Stiasny (méthanal-acide chlorhydrique concentré 2 : 1 v/ v).

2.1.1 Tanins catéchiqes (Muanda, 2010)

A 1 ml de l'infusion, nous ajoutons 0,5 ml de réactif de Stiasny; le mélange obtenu est chauffé au bain-marie à 90°C pendant 15 minutes. L'apparition d'un précipité montre la présence des tanins catéchiqes.

2.1.2 Tanins galliques (Muanda, 2010)

Pour révéler les tanins galliques, nous avons filtré le mélange précédemment chauffé et prélevé 0,5 ml du filtrat. Le filtrat est ensuite saturé avec de l'acétate de sodium ; à ce mélange il est ajouté 100 µl d'une solution de FeCl₃ à 1 % (P/V). Le développement d'une teinte bleu-noire indique la présence de tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny

2.2 Caractérisations des mucilages (Karumi *et al.*, 2004)

Les mucilages sont des polyholosides hétérogènes dont la propriété est de gonfler au contact de l'eau avec laquelle ils donnent des masses gélatineuses ou des solutions colloïdales. Ils sont formés d'oses et d'acides uroniques.

Pour la recherche des mucilages, on introduit 1 ml de décocté à 10 % dans un tube à essai auquel on ajoute 5 ml d'alcool absolu. L'apparition, après une dizaine de minutes, d'un précipité floconneux indique la présence de mucilage.

2.3 Caractérisations de substances saponosides (Karumi *et al.*, 2004)

Nous avons porté à ébullition 100 ml d'eau distillée dans un erlenmeyer de 250 ml puis nous avons ajouté 1g de poudre et nous avons maintenu une ébullition modérée pendant 15 mn. Après filtration, nous avons ajusté le filtrat à 100 ml.

Dans un tube à essais nous avons rempli 1ml du décocté à 1 % et nous avons ajusté le volume à 10 ml avec de l'eau distillée. Ensuite, nous avons agité le tube dans le sens de la longueur pendant 15 secondes. La formation d'une mousse plus ou moins importante indique la présence de saponosides.

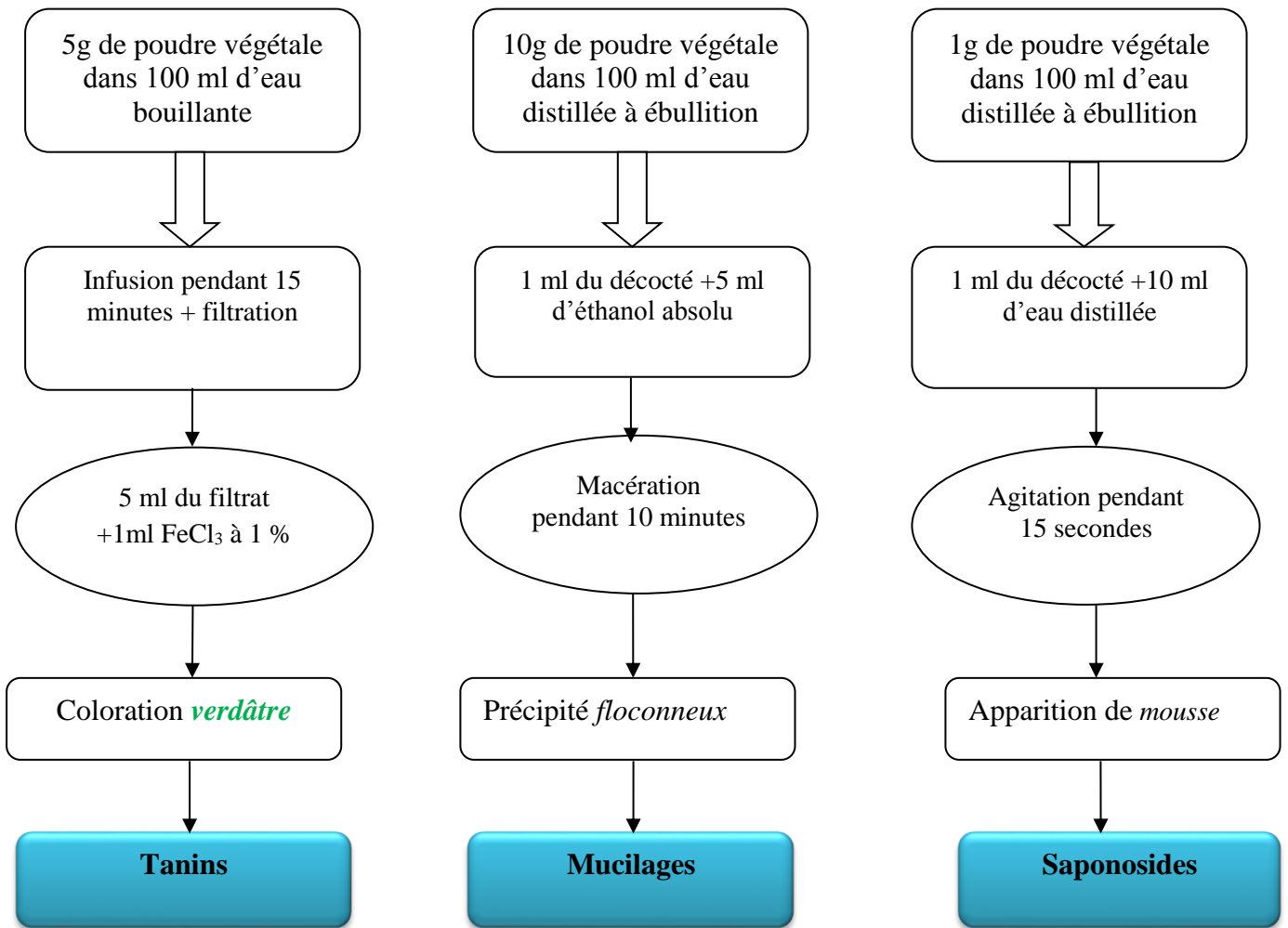


Figure 19 : Tests phytochimiques : tanins, mucilages, saponosides

2.4 Caractérisations des alcaloïdes (Muanda, 2010)

Un extrait sulfurique est préparé à partir de 10 g de la drogue végétale et de 50 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré dilué à 10 % dans un erlenmeyer de 250 ml. Le mélange obtenu est mis sous agitation et macéré pendant 3 heures ; Ce mélange est ensuite filtré et le volume complété avec de l'eau distillée à 5 ml. Dans deux tubes différents, nous plaçons 1 ml du filtrat obtenu, puis 5 gouttes du réactif de Dragendorff sont ajoutées dans l'un et 5 gouttes de réactif de Mayer dans l'autre. L'apparition de précipités rouge orangé et blancs jaunâtres respectivement dans ces tubes, indiquent la présence des alcaloïdes.

2.5 Caractérisations des composés réducteurs (Karumi *et al.*, 2004)

Pour la recherche des composés réducteurs, une décoction à 10 % de la drogue végétale dans de l'eau distillée est réalisée. A 5 ml du décocté, ajouter 1 ml de la liqueur de Fehling (Fehling (0,5 ml de réactif A et 0,5 ml de réactif B, mélange extemporané) et chauffer dans un bain-marie. L'obtention d'un précipité rouge brique indique la présence de composés réducteurs.

2.6 Caractérisations des flavonoïdes (Paris *et al.*, 1969)

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5ml de l'extrait éthanolique avec 1ml d'HCl concentré et 0,5g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3 minutes.

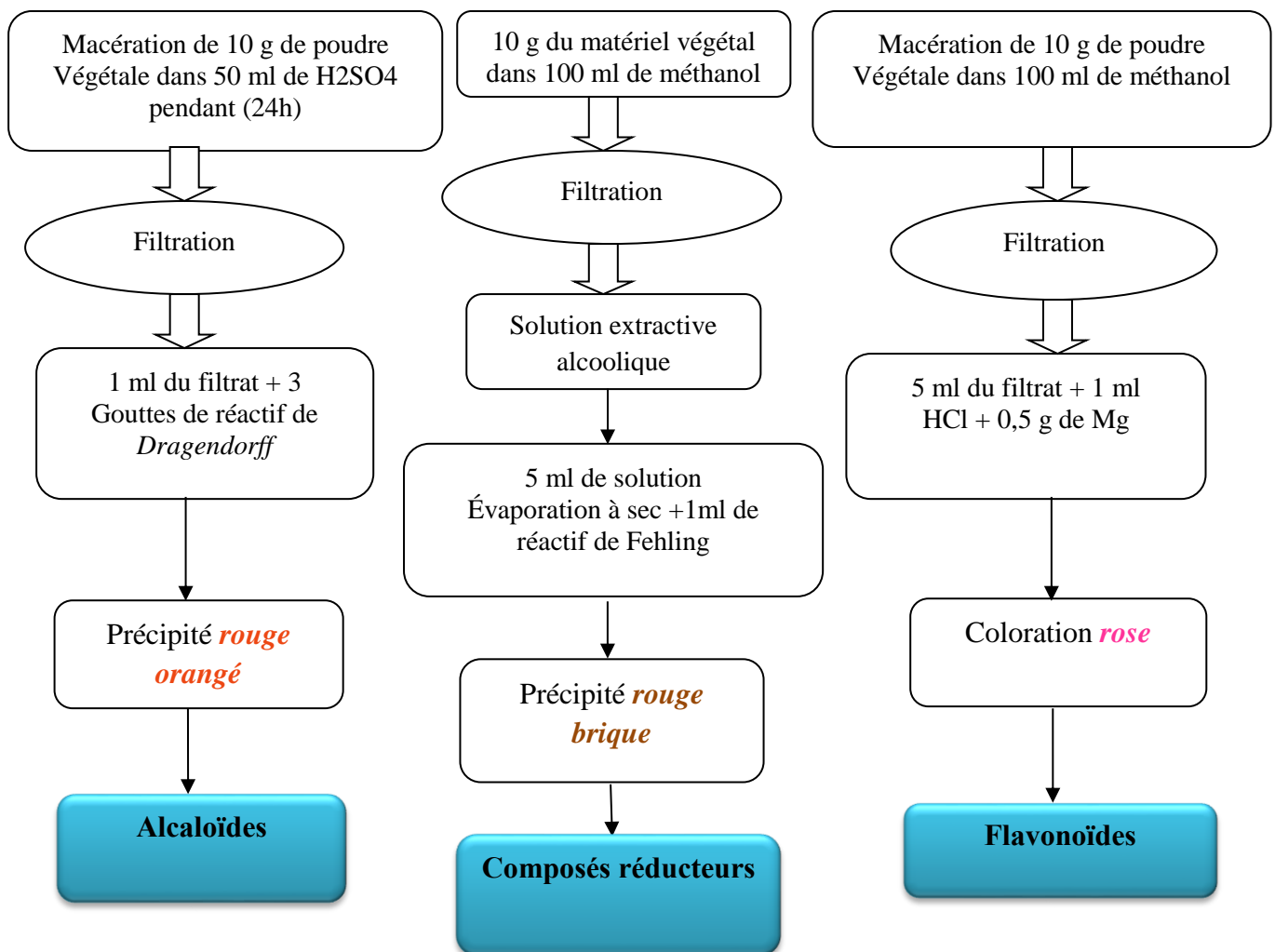


Figure 20 : Tests phytochimiques : alcaloïdes, composés réducteurs, flavonoïdes.

3. Extraction des composés phénoliques

La préparation des échantillons est d'une importance capitale pour toute analyse fiable. L'extraction est une étape très importante avant l'analyse quantitative et qualitative proprement dite. Elle est fonction des composés phytochimiques à étudier. Le solvant utilisé, le pH et la température, jouent également un rôle important dans cette procédure (Muanda, 2010).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour extraire les composés phénoliques à partir de drogues végétales (l'utilisation des ultrasons, des micro-ondes, des hautes pressions et par CO₂ supercritique). Cependant la méthode la plus utilisée reste l'extraction conventionnelle par solvant (ECS) (M'hiri, 2015). Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont le méthanol, l'acétone, l'éthanol et moins fréquemment le dichlorométhane (Kim et Lee, 2002).

Le solvant utilisé lors de notre étude est un mélange méthanol/eau à 80%. En effet selon les données de la littérature, les solvants donnant les teneurs les plus élevées en phénols totaux sont des solutions hydro alcooliques avec une concentration d'alcool variant de 70 à 85%. Cependant, dans les applications industrielles, l'éthanol moins toxique est le plus souvent utilisé (Bartnick *et al.*, 2006).

3.1 Préparation des extraits bruts méthanoliques

3.1.1 Etape de dégraissage de la matière végétale

La forte teneur lipidique des fruits et des feuilles de la famille des palmiers nous a amené à envisager une étape préliminaire de délipidation dans le protocole d'extraction. La matière végétale (100g) de chaque partie de la plante (feuille et baie) est dégraissée initialement avec 500 ml d'éther de pétrole. Après 24 h d'agitation permanente, le soluté est filtré sur papier Whatman. Le marc récupéré est délipidé, encore à deux reprises, avec le même solvant avant d'être extrait selon le protocole schématisé dans la figure 21.

3.1.2 Étape d'extraction des polyphénols

Le marc récupéré après dégraissage de chaque partie de la plante est macéré dans 500 ml d'une solution hydro-alcoolique (méthanol/eau 80/20 v/v) pendant 24 h sous agitation permanente. Le macérât est récupéré dans un bécher et le marc est de nouveau macéré avec le même solvant. La macération est répétée 3 fois pour optimiser le rendement de

l'extraction. Après filtration, le filtrat obtenu est concentré sous pression réduite à 50 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif de type Büchi R-200.

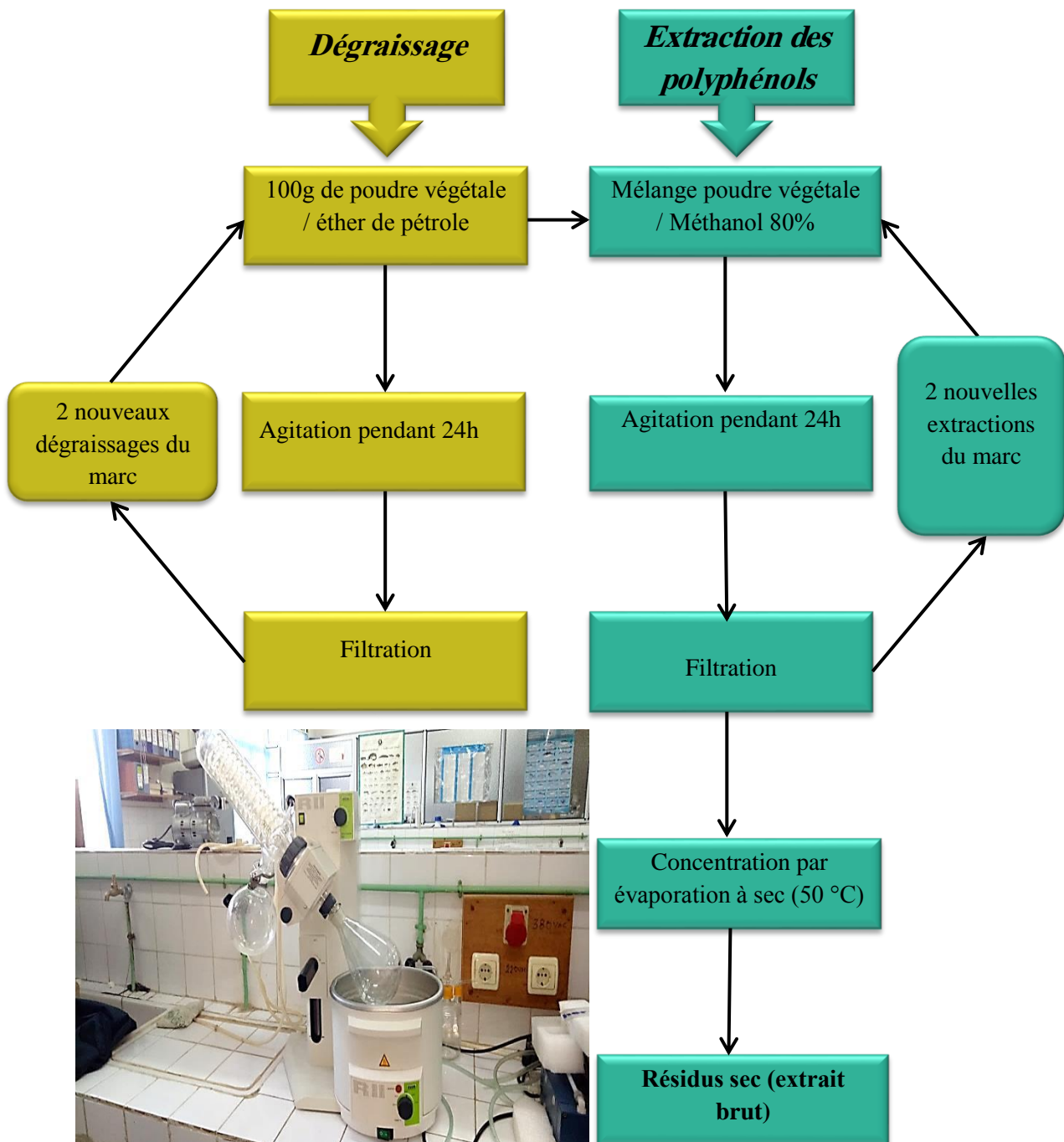


Figure 21 : Schéma simplifié des étapes d'obtention des extraits bruts

3.2 Fractionnement des extraits bruts par Extraction Liquide-Liquide (ELL)

Dans l'optique de séparer les extraits bruts méthanoliques des deux organes (feuille, baie) en fractions de polarités différentes nous avons opté pour un fractionnement par

ELL ; cette technique permet de partager les molécules selon leurs propriétés physicochimiques entre deux phases liquides non miscibles.

La méthode utilisée pour le fractionnement des extraits bruts est celle proposée par Mariod *et al.* (2009) ; cette dernière a, toutefois, subi quelques modifications. Ainsi, Les extraits bruts méthanoliques secs de chaque partie de la plante ont été, d'abord, dissous dans 100ml d'un mélange H₂O:Méthanol (9:1) puis partagés, successivement, avec trois volumes (3x200ml) de dichlorométhane (DCM), dans une ampoule à décanter. Après agitation et décantation des deux phases, la phase dichlorométhane est récupérée et la phase aqueuse est à nouveau partagée avec trois volumes d'acétate d'éthyle (AE), puis finalement avec trois volumes de butanol (B). Les différentes phases ainsi obtenues ont été concentrées séparément à l'aide d'un évaporateur rotatif pour constituer respectivement : une fraction apolaire dans le dichlorométhane (FDCM), une fraction peu polaire dans l'acétate d'éthyle (FAE) et une fraction moyennement polaire dans le butanol (FB). A la fin du partage liquide-liquide la solution hydro-alcoolique restante (partie résiduelle) est séchée à l'aide d'un lyophilisateur (figure 22) et constitue la fraction aqueuse (Faq). Les résidus secs obtenus sont pesés puis conservés à -20°C.

✓ **Rendements de l'extraction**

Pour chaque partie de la plante, les rendements des différentes fractions sont déterminés par la formule suivante :

$$R (\%) = (X/Y) \times 100$$

R : rendement de l'extraction (%)

X : poids de la fraction (g)

Y : poids de la poudre de plante initiale(g)

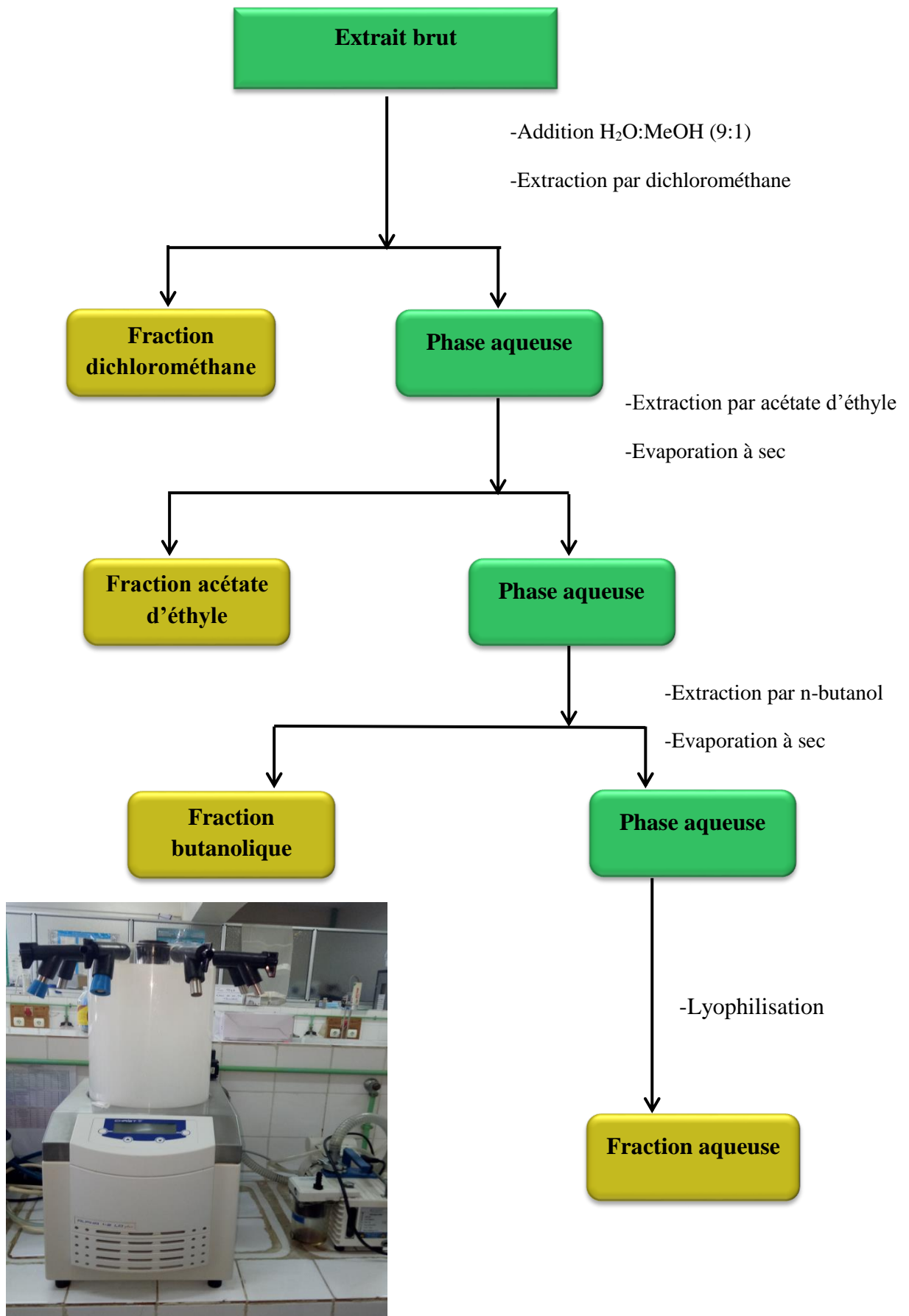


Figure 22 : fractionnement des extraits bruts

4. Dosage des composés phénoliques

La détermination des composés phénoliques (polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT), tannins condensés (TC) et anthocyanes (AMT)) présents au niveau des différentes fractions de la plante étudiée a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible de type (Shimadzu. UV1700, Japon).

4.1 Dosage des polyphénols totaux

Le réactif utilisé est le réactif de «Folin-Ciocalteu»; c'est un mélange de complexes des acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) de couleur jaune dont la réduction par l'action des composés phénoliques donne un mélange de complexes de sels de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) de couleur bleue qui absorbe à 765 nm. Le dosage de PPT est effectué par la comparaison de la D.O observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue (Muanda, 2010).

Mode opératoire

D'abord une courbe d'étalonnage a été réalisée. Pour cela une solution mère d'acide gallique est préparée à une concentration de 1 mg/ml dans le méthanol. Des solutions diluées de concentrations connues en acide gallique ont été préparées (0, 12.5, 25, 50, 100, $\mu\text{g/ml}$) ; elles permettront de tracer la courbe d'étalonnage (figure 23).

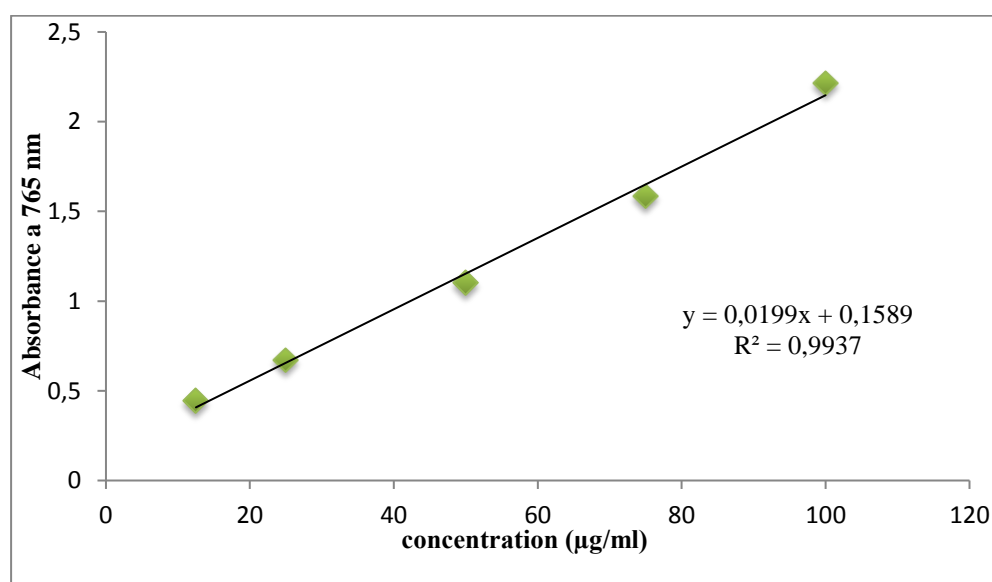


Figure 23 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

Les teneurs en polyphénols totaux des fractions de la plante ont été déterminées par la méthode décrite par Singleton et Ross (1965). Brièvement 200µl de chaque extrait (dissous dans le méthanol) ont été ajoutés à 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué (dans l'eau distillé). Les solutions ont été mélangées à l'aide d'un vortex puis incubées à température ambiante pendant 4 minutes.

Après l'incubation 800 µl de la solution de carbonate de sodium Na₂CO₃ (7.5%) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel est finalement laissé à incuber durant 2 heures à l'obscurité. L'absorbance des extraits a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 765 nm. Les résultats ont été exprimés en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme de fraction (µg EAG/mg de fraction).

4.2 Dosage des flavonoïdes totaux

Trois solutions sont réalisées ; La première est une solution aqueuse de chlorure d'aluminium (AlCl₃) à 2 % dans l'eau distillée, la deuxième est une gamme des extraits de plante à différentes concentrations (entre 0 et 1mg/ml) dans le méthanol, et, enfin, la troisième est une solution méthanolique à 1 mg/ml de quercétine qui va servir de référence. Les solutions filles (2.5, 5, 10, 20, 30, 40µg/ml) qui seront obtenues à partir de cette dernière permettront de tracer la courbe d'étalonnage (Figure 24).

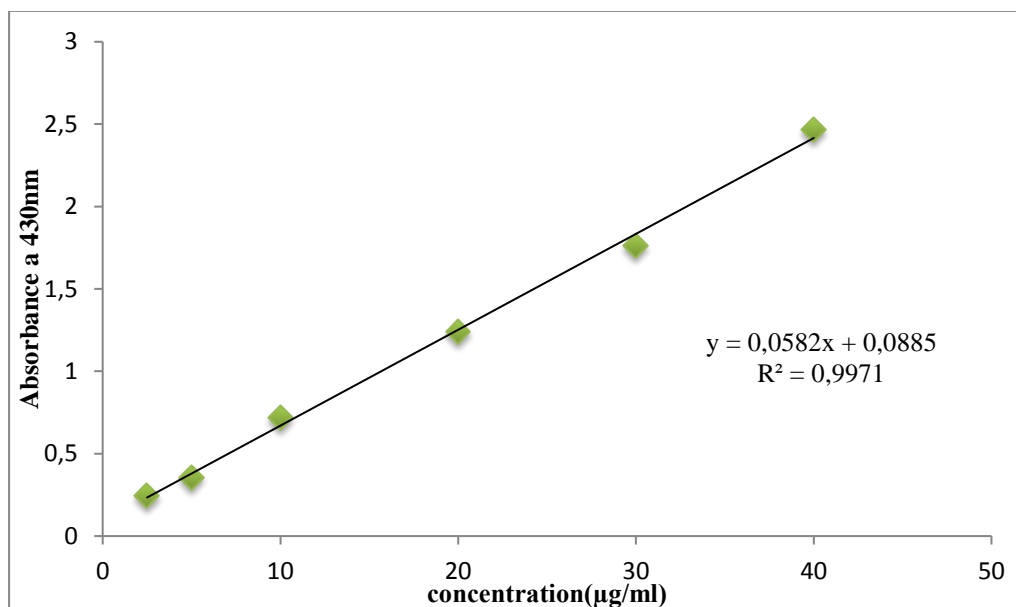


Figure 24 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux

Mode opératoire

L'évaluation quantitative des flavonoïdes dans les différentes fractions est réalisée selon la méthode du trichlorure d'aluminium, décrite par Arvouet-Grand *et al.* (1994). Pour cela, 1 ml de chaque extrait et du standard (dissous dans le méthanol) avec les dilutions convenables a été ajouté à un volume égal d'une solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol). Le mélange a été vigoureusement agité à l'aide d'un vortex et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes d'incubation.

Les valeurs de la concentration seront directement lues à partir de la droite d'étalonnage établies à l'aide de la quercétine. Il s'ensuit que la concentration de l'échantillon est exprimée en μg d'équivalent de quercétine par milligramme de fraction ($\mu\text{g EQ/mg}$ de fraction).

4.3 Dosage des tanins condensés (proanthocyanidines)

La méthode de la vanilline a été utilisée pour doser les tannins condensés par le protocole décrit par Sun *et al.* (1998) en y apportant quelques modifications. Au cours de cette réaction, la vanilline en milieu acide va réagir avec les tannins condensés pour donner des complexes colorés qui absorbent à 500 nm.

Mode opératoire

D'abord un volume de 100 μl de chaque fraction, catéchine, ou blanc dilué dans le méthanol (1mg/ml) ont été introduits dans des tubes à essai. Ensuite, une solution méthanolique à 4% de vanilline (1200 μl) a été ajoutée, suivi de l'addition de 600 μl d'acide chlorhydrique (HCl) concentré. Le mélange a été laissé au repos pendant 15 min. L'absorbance est mesurée, à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc à 500nm.

Les résultats obtenus sont exprimés en microgramme (μg) équivalent de la catéchine par milligramme de fractions ($\mu\text{gEC/mg}$) en utilisant une équation linéaire basée sur la courbe d'étalonnage de la catéchine de 50 à 750 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (Figure 25).

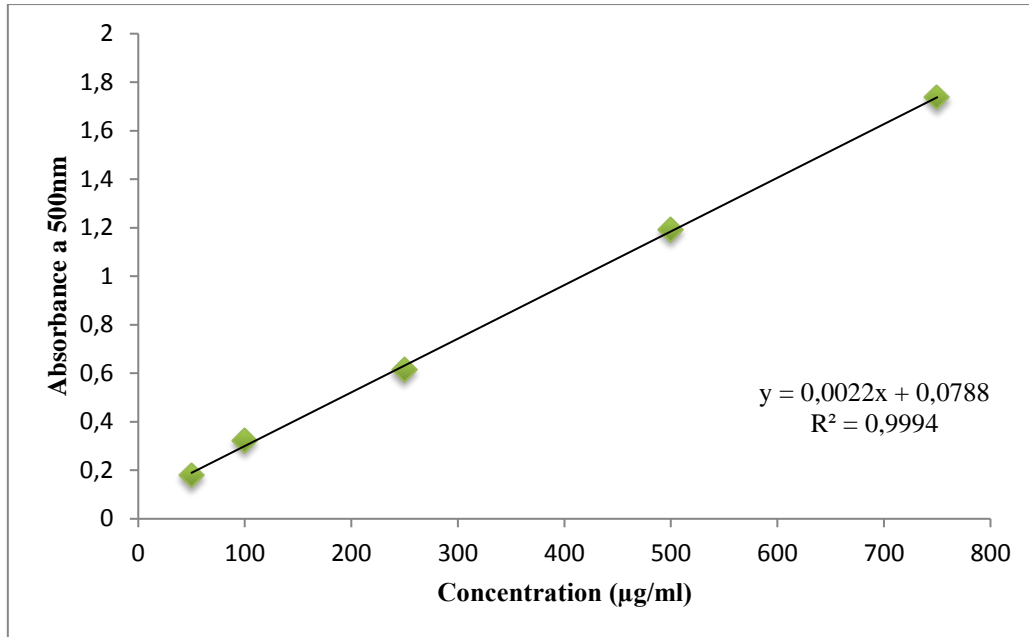


Figure 25 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des proanthocyanidines

4.4 Dosage des anthocyanes monomères totaux : méthode des pH différentiels

Brièvement, une solution aqueuse de chlorure de potassium (KCL) à 0,025 M sert de premier réactif. On ajuste ensuite le pH de la solution jusqu'à la valeur 1 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique (HCL) à 6 N (tampon 1).

Une solution aqueuse d'acétate de sodium à 0,4 M sert de second réactif. Le pH de la solution est ensuite ajusté à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 6 N jusqu'à la valeur de 4,5 (tampon 2).

Mode opératoire

Le protocole utilisé au laboratoire est basé sur celui décrit par Lako *et al.* (2007). Pour cela 400 µl de chaque fraction (1 mg/ml) sont mélangés à 3,6 ml du tampon (1) et 400 autres microlitres (µl), au tampon (2). Les solutions sont incubées pendant 30 minutes à l'abri de la lumière et les absorbances sont ensuite successivement mesurées à 510 et 700 nm contre le témoin contenant de l'eau distillée. La variation des absorbances est calculée selon la formule suivante :

$$\Delta A = (A_{510} - A_{700})_{pH_1} - (A_{510} - A_{700})_{pH_4}$$

La concentration du pigment est exprimée en µg de cyanidine-3 glucoside équivalents/mg de fraction (Brito *et al.*, 2014) et calculée selon la formule suivante :

$$AMT = \Delta A \times Mm \times Df \times 1000 / (Ma \times L)$$

Avec ΔA : variation des absorbances

Mm : masse molaire de la cyanidine-3- glucoside (449,2 g/mol)

Df : facteur de dilution de l'échantillon analysé

Ma : 26.900 M⁻¹ cm⁻¹ : le coefficient d'extinction molaire de la cyanidine-3-glycosylée

L : la longueur de la cellule de mesure en cm

5. Identification des composés phénoliques

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est, de loin, le moyen le plus utilisé pour l'analyse des produits naturels possédant un ou plusieurs chromophores. Dans cette partie de l'étude, nous avons utilisé une RP-HPLC (HPLC en phase inverse) de type Agilent sérié 1200, couplé à un détecteur UV et muni d'un injecteur automatique. La colonne, de 150 mm de longueur et de 4,6 mm de largeur, est remplie d'une phase de silice greffée. La détection a été réalisée à deux longueurs d'ondes 280 et 320 nm. La séparation des solutés de nos échantillons a été réalisée en mode gradient d'élution.

Les conditions chromatographiques pour l'analyse de nos composés phénoliques, en particulier pour les choix des détections UV et des éluant utilisés, sont tirées des travaux issus de la thèse de Ghnimi (2015).

✓ Gradient d'élution :

Le gradient utilisé est constitué de 3 phases mobiles :

- **Solvant A** : composition 0,05 M de phosphate d'ammonium (NH₄H₂PO₄) à pH 2,6 ajusté avec l'acide orthophosphorique (H₃PO₄).
- **Solvant B** : composition acétonitrile/solvant A 80 : 20 (v/v).
- **Solvant C** : composition 0,2 M d'acide orthophosphorique (H₃PO₄) à pH 1,7.

Avant chaque utilisation, les solvants sont préparés et filtrés sur papier Whatman N°3.



Figure 26 : appareil chromatographique (Agilent 1200 HPLC System)

Le débit d'élution est de 1 ml/minute, la température est de 20°C et la capacité d'injection des extraits/standards est de 20µl. Le profil du gradient utilisé pour analyser les fractions des feuilles et des baies est donné dans le tableau 5.

Tableau 5 : Profil du gradient utilisé pour l'analyse HPLC

Solvants utilisés en %			
Temps (min)	A	B	C
Initial	100	0	0
4	95	5	0
10	92	8	0
15	90	10	0
25	0	14	86
45	0	20	80
50	0	30	70
55	0	60	40
60	100	0	0

6. Evaluation de l'activité antioxydante

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il apparaît clairement qu'une seule méthode ne suffit pas à refléter le profil antioxydant d'un échantillon. C'est la raison pour laquelle, différentes méthodes de mesure du pouvoir antioxydant ont été développées. Ces méthodes impliquent l'interaction d'espèces oxydantes, tels que des

concentrations de chaque fraction (0.1, 0.2 ,0.4, 0.6, 0.8, et 1 mg/ml), préparée dans le méthanol. Le mélange est mixé rigoureusement, puis, incubé à l'obscurité pendant 30 minutes.

L'absorbance est mesurée à 515 nm contre un blanc formé de 1,90 ml de la solution méthanolique de DPPH et 100 µl de méthanol. L'acide ascorbique (vitamine C), préparée dans le méthanol dans les mêmes conditions opératoires, a été utilisé à titre comparatif (control positif). La capacité antioxydante de nos échantillons a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH* selon l'équation suivante :

$$PI (\%) = [(Abs_{DPPH} - Abs_{extrait}) / Abs_{DPPH}] \times 100$$

Avec :

PI (%) : pourcentage d'inhibition du radical DPPH*

Abs_{DPPH} : absorbance du témoin (ne contenant aucun antioxydant) après 30 minutes

Abs_{extrait} : absorbance des extraits mesurés après 30 minutes.

Une courbe de régression linéaire qui relie les différentes concentrations et les pourcentages d'inhibition appropriés permet de calculer les IC₅₀ qui correspondent aux concentrations des échantillons qui entraînent 50% d'inhibition du radical DPPH. Notons que l'activité antioxydante est inversement proportionnelle à la valeur de l'IC₅₀. Ainsi, l'échantillon qui présente l'IC₅₀ la plus faible est celui qui présente l'activité anti-radicalaire la plus importante.

6.2 Test du blanchissement du β-carotène

✓ Principe du test

Compte tenu de la présence de 11 paires de doubles liaisons dans sa structure, le β-carotène est extrêmement sensible aux radicaux libres. Dans ce test l'activité antioxydante a été déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β-carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique.

En effet, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes ; ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β-carotène entraînant ainsi la disparition de sa

couleur orange, qui est suivie spectrophotométriquement. Cependant, la présence des antioxydants, tel que les composés phénoliques, provoque la réduction de l'ampleur de la destruction du β -carotène en neutralisant les peroxydes et d'autres espèces radicalaires formées à l'intérieur de ce système.

Mode opératoire

Le protocole qui suit se base sur la méthode mise au point par Pratt (1980), qui par la suite a subi quelques modifications.

L'émulsion de β -carotène/acide linoléique a été préparée par solubilisation de 0,5mg de β -carotène dans 1ml de chloroforme auquel 25 μ l d'acide linoléique et 200mg de Tween 40 ont été additionnés ; après passage au rotavapor le chloroforme s'est complètement évaporé. Le résidu obtenu est repris par 100 millilitres de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 30% et le mélange résultant est agité vigoureusement.

Nous prenons 2,5 millilitres de cette émulsion, auxquels nous rajoutons 350 μ l d'extraits de notre plante ou d'antioxydant de référence (Butylhydroxytoluène (BHT)) à la concentration 1 mg/ml. Un autre tube a été préparé dans les mêmes conditions, sans antioxydant (Contrôle négatif) où l'échantillon est remplacé par 350 μ l de méthanol.

L'absorbance est mesurée immédiatement à 490 nm ce qui correspond à $t = 0$ min contre un blanc contenant l'émulsion sans β -carotène. Les tubes couverts sont ensuite placés dans un bain marie, réglé à 50°C, et la lecture est effectuée toutes les 20 minutes durant 2 heures. L'application de la formule suivante permet le calcul du pourcentage de l'inhibition de la peroxydation lipidique :

$$\% \text{ inhibition} = (\beta \text{ carotene après } 2 \text{ h} / \beta \text{ carotene à } t_0) \times 100$$

6.3 Pouvoir réducteur (FRAP, Ferric Reducing Antioxydant Power)

✓ Principe du test

Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}) à un pH de 6,6 pour maintenir la solubilité du fer (figure 28). En d'autres termes, ce test permet de définir la capacité d'un antioxydant à inhiber l'initiation des réactions radicalaires par les ions métalliques (Techer, 2013).

Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe bleu intense qui est suivi spectrophotométriquement.

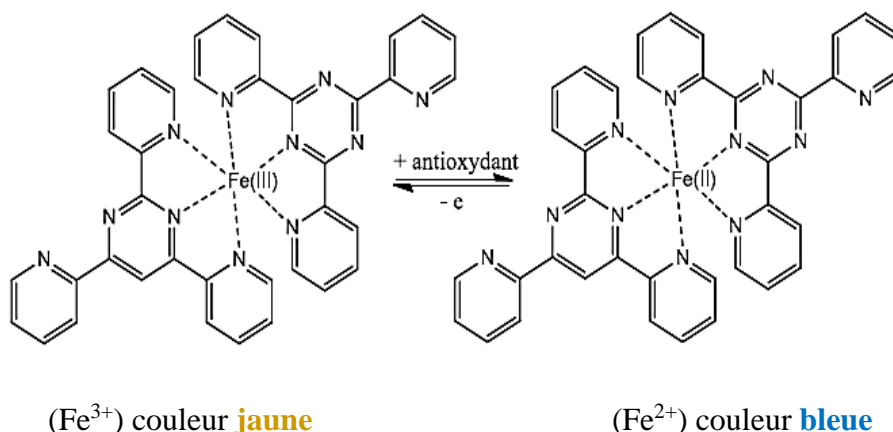


Figure 28 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP (Techer, 2013)

Mode opératoire

Le pouvoir réducteur des échantillons a été déterminé selon le procédé d'Oyaizu, (1986). Les différentes concentrations des extraits (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1mg/ml) dans le méthanol (1 ml) sont mélangées avec 2.5 ml de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium [$K_3Fe(CN)_6$ à (1%)]. L'ensemble a été incubé à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 2,5ml d'acide trichloroacétique (TCA) (10%) ont été additionnés au mélange qui va subir une centrifugation pendant 10 min à 3000 rpm. L'eau distillée (2,5ml) et le chlorure ferrique ($FeCl_3$) (500 μ l à 0,1%) ont été ajoutés à 2,5ml de surnageant. La lecture des absorbances se fait contre un blanc sans l'antioxydant à 700 nm.

Dans cette expérience, l'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif aux mêmes concentrations choisies et dans les mêmes conditions opératoires. Les graphes des absorbances obtenues en fonction des différentes concentrations utilisées sont tracés. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées. La concentration EC_{50} qui est définie comme La concentration fournissant 0,5 d'absorbance est un indice utilisé pour comparer et exprimer les capacités réductrices des composées phénoliques (Wu *et al.*, 2015).

6.4 Test de réduction du radical-cation ABTS^{•+}

✓ Principe du test

Dans cette méthode l'activité antioxydante d'un extrait est déduite de sa capacité à inhiber le radical cationique ABTS^{•+} (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) traduit par l'apparition d'une coloration bleu-verdâtre. Ce radical cationique est formé par oxydation de l'ABTS incolore avec différents composés, comme le phosphate de potassium.

Le radical ABTS^{•+} est formé par arrachement d'un électron e⁻ à un atome d'azote de l'ABTS. En présence d'antioxydant donneur de H[•], le radical d'azote concerné piège un H[•], conduisant à l'ABTSH⁺, ce qui entraîne la décoloration de la solution (figure 29).

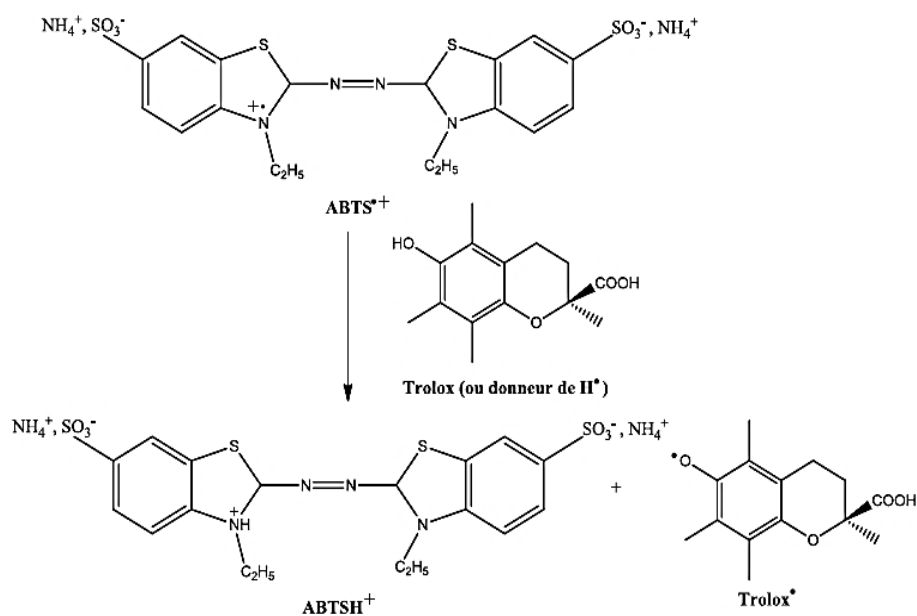


Figure 29 : Formation et piégeage du radical ABTS^{•+} par un antioxydant donneur de H[•] (Techer, 2013)

Mode opératoire

La méthode utilisée est celle décrite par Re *et al.* (1999) ; cette dernière ayant subi quelques modifications. Nous ajoutons une solution de persulfate de potassium à 2,45 mM à une solution d'ABTS à 7 mM (dans l'eau distillée). Le mélange est agité pendant 18 heures dans le noir à température ambiante pour former le radical cation ABTS^{•+}. Ce dernier est dilué pour obtenir une absorbance voisine de 0,70±0,05 à 734 nm. La solution obtenue est stable lorsqu'elle est conservée à l'abri de la lumière et à température

ambiante. A 1,9 ml de solution d'ABTS^{•+}, sont ajoutés 50µl de chaque échantillon préparé dans le méthanol à différentes concentrations (entre 0,1 et 1 mg/ml). Le mélange est incubé pendant 10 min à l'abri de la lumière. L'absorbance est mesurée à 734 nm.

L'activité des extraits est comparée au Trolox (acide 6-hydroxy-2,5, 7,8 tétraméthylchroman-2-carboxylique), analogue structural hydrosoluble de la vitamine E. Pour chaque extrait et/ou standard, l'absorbance obtenue est exprimée en pourcentage d'inhibition selon la formule ci-dessous :

$$\text{PI (\%)} = [(\text{Abs}_{\text{ABTS}\cdot+} - \text{Abs}_{\text{extrait}}) / \text{Abs}_{\text{ABTS}\cdot+}] \times 100$$

À partir de cette formule, il est possible de déduire les concentrations qui permettent de piéger 50 % des radicaux ABTS^{•+} (IC₅₀) ; l'expression générale des résultats est déterminée sur le même mode décrit pour le test DPPH.

7. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'inhibition *in vitro* de la croissance bactérienne par les différents extraits de plantes a été testée sur un panel de bactéries comprenant des bactéries, Gram positif (+) et Gram négatif (-) qui se différencient par des enveloppes extérieures de natures différentes et dont la particularité morphologique et l'origine sont résumées dans le tableau 6.

Les bactéries testées sont souvent responsables d'infections alimentaires, nosocomiales ou urinaires. Les souches de bactéries utilisées dans le cadre de cette étude sont des souches de référence ; quant à l'activité antibactérienne des fractions de notre plante, elle a été évaluée par l'application de deux méthodes complémentaires : la diffusion en milieu gélosé et la dilution en milieu liquide.

Tableau 6 : Description et pouvoir pathogène des souches de bactéries, utilisées lors de cette étude

Type de micro-organisme et morphologie	Espèces	ATCC	Pouvoir pathogène
Bacille Gram -	<i>Escherichia coli</i>	25922	Gastro-entérite, infection urinaire
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	Infection alimentaire
	<i>Salmonella typhimurium</i>	14028	Infection alimentaire
Cocci Gram +	<i>Klebsiella pneumonia</i>	700603	Infections urinaires et respiratoires
	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Infection alimentaire et nosocomiales
	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	Infection nosocomiale, urinaire, et inflammations chronique de l'intestin

ATCC: American Type Culture Collection

7.1 Technique de diffusion en milieu gélosé

La méthode de diffusion en milieu gélosé standardisée par NCLLS (National committee for clinical laboratory standards) citée par Celiktas *et al.*, (2007), a été utilisée pour évaluer les activités antibactériennes de nos extraits. Cette technique, strictement réalisée sur milieu solide, consiste à déposer un disque de papier imprégné de l'échantillon sur une géloseensemencée avec l'inoculum bactérien. Les molécules actives diffusent à partir des disques et la présence d'une zone d'inhibition, dans laquelle il n'y a pas eu de croissance, indique la présence de molécules actives vis-à-vis de la bactérie testée (Michel, 2012).

✓ Préparation des extraits

400 mg de chaque fraction de la plante sont dissoutes dans 1 ml de diméthyl sulfoxyde (DMSO) à 5%, cette solution mère sera utilisée pour la série de dilution.

✓ **Préparation de la suspension bactérienne**

Les bactéries sont ensemencées sur une gélose nutritive à partir du stock de bactéries conservées à 5°C dans des tubes stériles contenant 10ml de gélose inclinée. Après avoir vérifié l'aspect macroscopique des colonies et l'aspect microscopique, une grande colonie est prélevée, à l'aide d'une anse de platine stérile et dispersées dans 10 ml de bouillon nutritif stérile pour préparer les suspensions de chacune des six souches. Ainsi l'activité antibactérienne doit être réalisée sur des souches bactériennes jeunes en phase de croissance exponentielle.

La densité de la suspension est ajustée à 0,5 McFarland (10^8 UFC/ml) à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620nm. La *Do* obtenu doit être comprise entre 0,08 et 0,1, puis une dilution supplémentaire au 1/100 est effectuée (Muanda *et al.*, 2011).

✓ **Ensemencement**

Dans des boîtes de Pétri, nous faisons couler le milieu de culture gélosé Mueller Hinton, en surfusion (à raison de 15ml par boîte) ; ensuite nous laissons refroidir préalablement à tout ensemencement.

L'ensemencement des boîtes est effectué à l'aide d'un écouvillon stérile ; l'inoculum est dispersé sur toute la surface du milieu gélosé MH, puis des disques de 6 mm imprégnés par des concentrations croissantes d'extraits à raison de 25, 50, et 75 µl par disque (correspondant respectivement à des concentrations de 10, 20 et 30 mg/ml) sont déposés délicatement à l'aide d'une pince stérile sur la gélose (3 disques par boîte).

Des disques "témoins", imprégnés d'*Imipenem* (15µg /disque) et de DMSO 5% (75 µl/disque) servant respectivement de témoin positif et négatif, ont été aussi déposés sur la surface de la gélose ensemencée.

Après 1 heure de pré-diffusion au réfrigérateur (4°C), pour assurer une bonne diffusion des extraits dans la gélose (Das *et al.*, 2010), les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24h. L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition (mm), autour des disques.

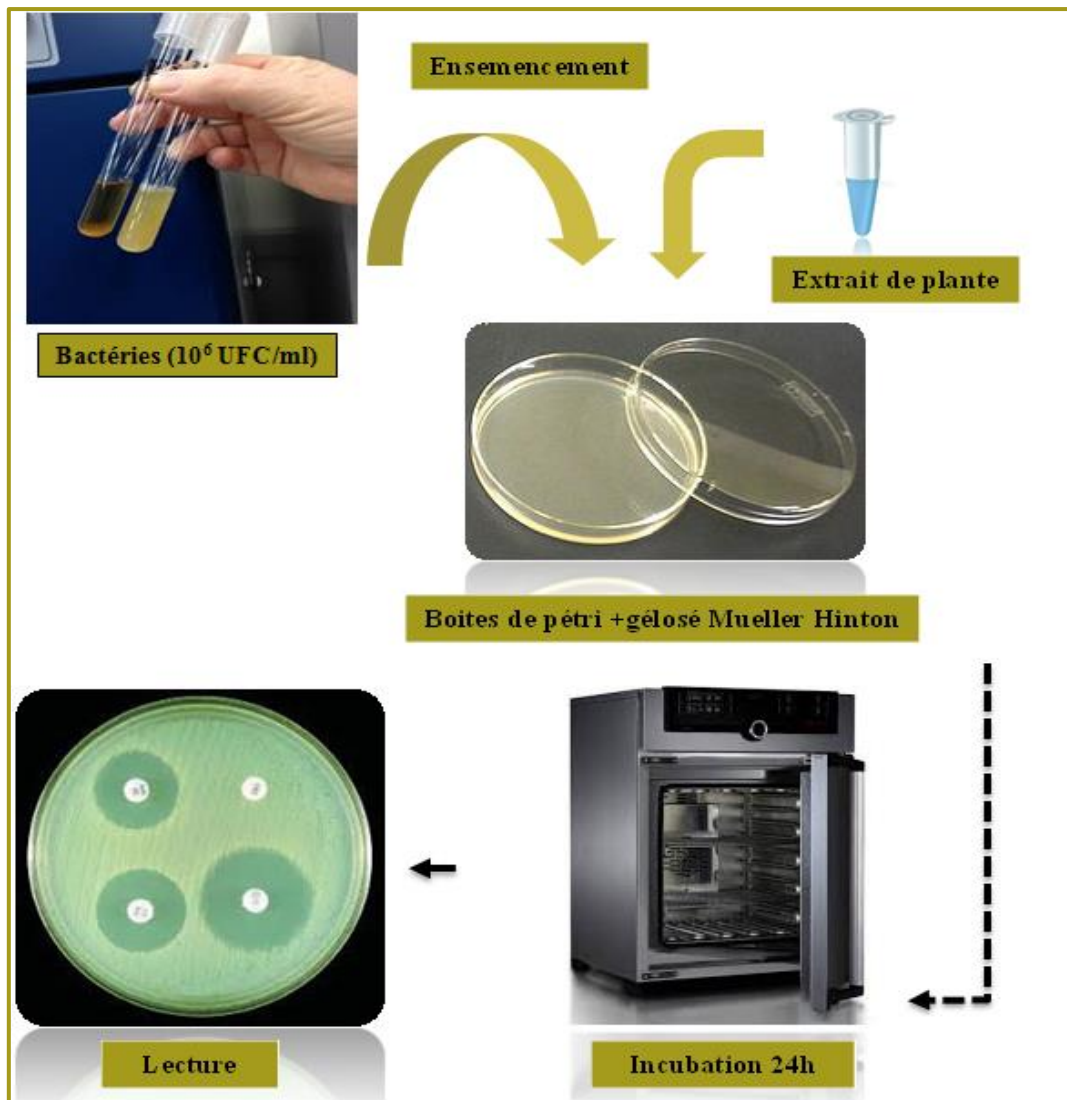


Figure 30 : Représentation schématique de la méthodologie employée pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits.

7.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de dilution en milieu liquide

L'activité antibactérienne des 8 fractions est réalisée en utilisant la méthode de dilution en milieu liquide selon la procédure décrite par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010), à laquelle quelques modifications ont été apportées. Cette méthode permet de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en agent actif capable d'inhiber totalement la croissance d'une bactérie donnée.

2ème Partie : Partie expérimentale

Un inoculum pour chaque souche bactérienne a été ajusté à environ 10^6 CFU (unité de formation de colonies) dans le bouillon Mueller-Hinton (BMH) ; ensuite une série de dilution, pour chaque substance végétale à tester, est préparée dans le DMSO 5%.

Dans des tubes à essai stériles, nous répartissons 500 μ l de chaque dilution correspondant à des concentrations croissantes allant de 0,25mg/ml à 32 mg/ml (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, et 32 mg/ml), auxquels nous ajoutons 500 μ l de la suspension bactérienne. Les tubes sont incubés pendant 24h à 37°C. Le tube dans lequel aucune croissance bactérienne n'a été constatée à l'œil nue (absence de trouble ou de dépôt bactérien au fond des tubes), correspond à la concentration minimale inhibitrice (CMI).

Chapitre V : Résultats et discussions

1. Analyses phytochimiques

Les résultats de la composition phytochimique préliminaire des deux parties (feuilles et baies) de *chamaerops humilis* par screening chimique sont repris dans le tableau 7.

Tableau7 : Composition phytochimique des feuilles et baies de *chamaerops humilis*

Métabolites secondaires		<i>Chamaerops humilis</i>	
		Feuilles	Baies
Tanins	galliques	+	+
	catéchiques	-	-
Mucilages		+	+
Saponosides		+	-
Alcaloïdes		-	-
Composés réducteurs		+	+
Flavonoïdes		+	+

(+) présent, (-) absent

De ces résultats, nous remarquons que les feuilles et les baies de *chamaerops humilis* contiennent aussi bien, des flavonoïdes, des tanins galliques, des mucilages, que des composés réducteurs. Les feuilles se distinguent par la présence des saponosides. L'étude préliminaire montre que la plante est dépourvue d'alcaloïdes et de tanins catéchiques.

Ces résultats sont en accord avec ceux établis par Benmehdi *et al.* (2011) ; cependant, ces derniers notent aussi la présence : de stéroïdes, de terpénoïdes et d'antraquinones.

2. Rendement de l'extraction

Le choix des solvants pour l'extraction des composés phénoliques a été orienté par de nombreuses études réalisées sur la recherche de conditions optimales d'extraction des polyphénols. Les solvants d'extractions les plus communément utilisés sont des solvants mixtes acétone/eau, éthanol/eau et méthanol/eau. D'après Rezaire (2012), la présence d'eau dans ces solvants mixtes augmenterait significativement la perméabilité des tissus végétaux et favoriserait la solubilisation d'un maximum de composés dans l'étape

d'extraction. Cependant, dans le cadre de cette étude, l'emploi du solvant acétone/eau a été écarté en raison de sa faculté à précipiter certaines classes de flavonoïdes et de tanins généralement associées à des protéines. L'emploi de l'acétone pourrait favoriser la diminution en tanins et, donc, altérer les activités biologiques des extraits (Burns *et al.*, 2001).

La figure 31 présente les rendements d'extraction obtenus par macération des deux organes, en utilisant comme solvant méthanol/eau (80/20 v/v), suivi d'un fractionnement par des solvants à polarité croissante. Il est noté que, quel que soit l'organe et/ou la fraction, les rendements d'extraction obtenus n'excèdent pas les 12%.

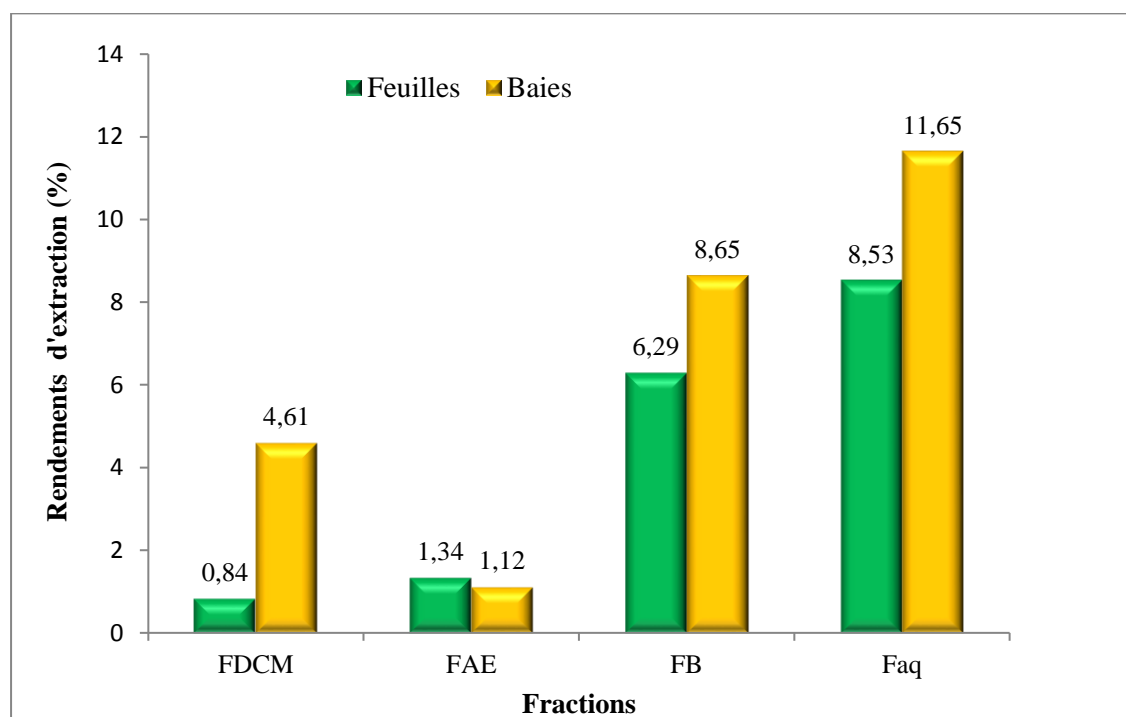


Figure 31 : Pourcentage massique (%) des fractions obtenues après fractionnement de l'extrait brut méthanolique.

FDCM ; Fraction dichlorométhane ; FAE, Fraction acétate d'éthyle ; FB : Fraction butanolique ; Faq, Fraction aqueuse.

En général, la quantité de composés extractibles diminue avec la polarité décroissante du solvant dans l'ordre : de l'eau, du butanol, de l'acétate d'éthyle, et du dichlorométhane. Il ressort de la figure 31 que les rendements d'extraction sont sensiblement plus élevés dans le cas des baies, par rapport à ceux des feuilles. Les valeurs les plus élevées sont

obtenues avec la Faq (11,56 et 8,53% respectivement pour les baies et les feuilles). Les solvants dits apolaires (dichlorométhane) ou peu polaires (acétate d'éthyle) présentent les rendements les plus faibles. Cette différence pourrait être attribuée à la sélectivité de l'extraction. L'eau et le butanol sont des solvants polaires connus pour extraire une large gamme de molécules dont les sucres, et les composés glycosylés ; en revanche, l'acétate d'éthyle (AE) et le dichlorométhane (DCM) sont des solvants de polarité intermédiaire et faible qui extraient préférentiellement des composés hydrophobes tels que des aglycones et des molécules à longues chaînes carbonées (Michel *et al.* , 2012). Par ailleurs, les rendements faibles obtenus avec les solvants peu polaires peuvent être attribués à la phase de délipidation (dégraissage) effectué en amont de l'extraction. L'étape de délipidation entraînerait une perte de molécules à caractère amphiphile et/ou lipophile comme la chlorophylle, les cires et les acides gras.

Ces tendances sont en accord avec de nombreux résultats issus de la littérature. Ainsi Dhingra *et al.* (2017) ont effectué l'extraction progressive de poudres sèches de *Prunus dulcis* avec des solvants de polarité croissante : hexane, acétate d'éthyle et n-butanol. Ces auteurs ont obtenu des rendements de l'ordre de 1,5 % pour les extractions à l'hexane, de 11,46 % pour les extractions à l'acétate d'éthyle, de 12,26% pour les extractions au butanol et un maximum de 24,46% obtenus avec l'eau. Dans le cas de notre étude, la fraction aqueuse a effectivement donné le meilleur rendement.

De ce fait, les rendements d'extraction varient d'un végétal à l'autre et dépendent des caractéristiques physico-chimiques des solvants utilisées et notamment leur polarité ; ce qui suggère que les plantes contiennent des molécules couvrant une large gamme de polarité (Hadj Salem, 2009).

3. Dosage des composées phénoliques

3.1 Dosage des polyphénols totaux (PPT)

Les résultats obtenus suite au dosage colorimétrique des polyphénols totaux (PPT) des différentes fractions sont reportés dans la figure 32.

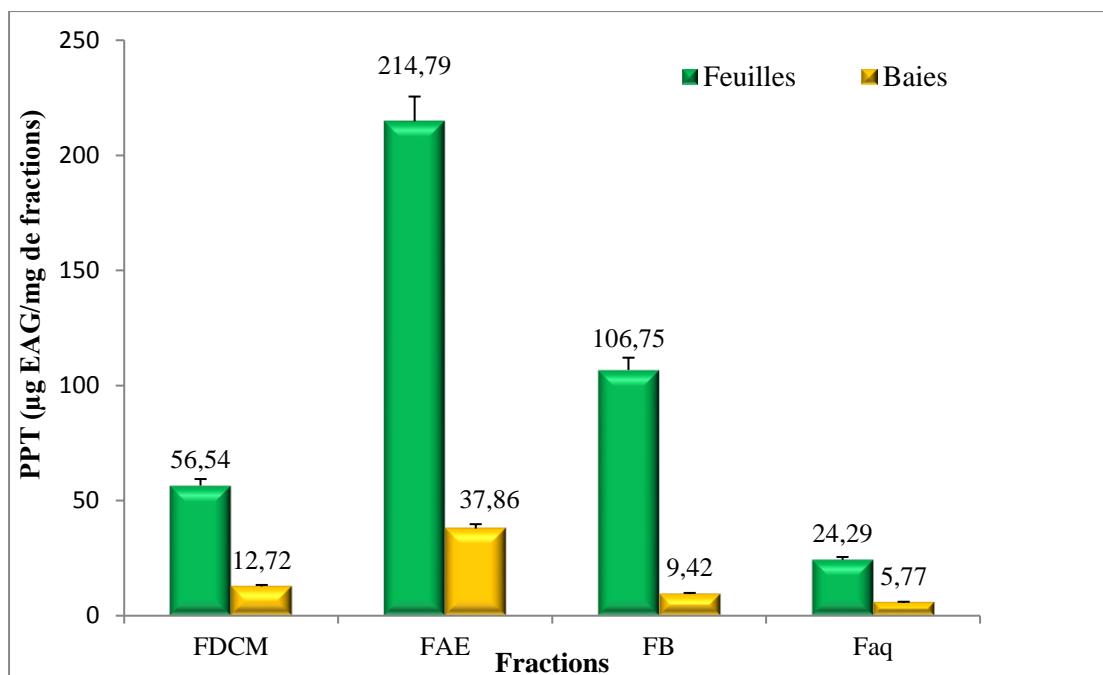


Figure 32 : Teneurs en polyphénols totaux des différentes fractions de feuilles et baies de *Chamaerops humilis*

Les résultats obtenus montrent que les feuilles de *chamaerops humilis* sont plus riches ($p < 0,05$) en PPT que les baies (environ cinq fois supérieure) et que les teneurs obtenues varient en fonction de la polarité des solvants utilisés. La teneur la plus élevée est notée dans la fraction acétate d'éthyle des feuilles ($214,80 \pm 3,26 \mu\text{g EAG/mg de fraction}$), suivie de celle de la fraction butanolique ($106,75 \pm 4,55 \mu\text{g EAG/mg de fraction}$). Les fractions dichlorométhane et aqueuse avec respectivement $56,53 \pm 4,82$, et $24,29 \pm 0,30 \mu\text{g EAG/mg de fraction}$ montrent les plus faibles proportions de PPT.

En ce qui concerne les extraits obtenus à partir des baies, nous notons que c'est la fraction acétate d'éthyle qui possède la quantité la plus importante en PPT (moyenne de $37,86 \mu\text{g EAG/mg de fraction}$) et la fraction aqueuse la quantité la moins importante (moyenne de $5,76 \pm 0,17 \mu\text{g EAG/mg de fraction}$). De ce fait, le solvant acétate d'éthyle s'avère être le plus efficace dans l'extraction des PTT ; ce qui suggère que les polyphénols présents dans *chamaerops humilis* seraient de nature moyennement polaire.

L'analyse de la variance (Annexe II) a montré que la différence entre les fractions des feuilles est hautement significative ($p < 0,05$). Concernant les baies les différences sont moins importantes, notamment pour FDCM, FB, et Faq qui ne montre pas de différences ($p > 0,05$).

Les informations concernant les constituants chimiques de *C. humilis* sont rares et les travaux existants sont préliminaires et rapportent différentes valeurs. Les teneurs en PPT obtenues par Coelho *et al.* (2017) à partir des feuilles de *chamaerops humilis* récolté à Algarve (sud du Portugal) sont de l'ordre de 153,1 µg EAG/mg d'extrait ; toutefois, l'extraction s'est faite à l'aide de méthanol par Soxhlet.

Il n'est pas facile d'établir des comparaisons avec les données des autres auteurs, en raison notamment de la différence dans la façon d'extraire les composés phénoliques. Relevons tout de même que la Faq de nos feuilles montre une teneur en PPT équivalente à celle trouvée par Benguag *et al.* (2009) (respectivement 24,29 µg EAG/mg de fraction et 25,2 µg EAG/ mg d'extrait) à partir de feuilles récoltées à Oran et un extrait préparé sous reflux avec l'eau distillée comme solvant d'extraction.

Les différentes valeurs rapportées dans la littérature pourraient ainsi s'expliquer par la méthode d'extraction des composés phénoliques utilisés, la période de récolte de la plante, le stade de développement de la plante. En outre, le test Folin-Ciocalteu utilisé pour la quantification des composés phénoliques, implique la réduction de tous les groupes d'hydroxyles, non seulement ceux des composés phénoliques mais également de certains sucres réducteurs, d'acides gras insaturés, ou de vitamines telle que la vitamine C ; ce qui, selon Fukushima *et al.*, (2009), rend ce dosage non sélectif vis-à-vis des polyphénols en surestimant les valeurs obtenues.

3.2 Dosage des Flavonoïdes totaux (FVT)

Les flavonoïdes sont le principal groupe de composés phénoliques. La plupart des études ont montré que les extraits de plantes riches en flavonoïdes sont une bonne source d'antioxydants (Djeridane *et al.*, 2006 ; Bouterfas *et al.*, 2016).

Les flavonoïdes totaux sont évalués par colorimétrie, selon la méthode de trichlorure d'aluminium, qui donne une indication de la quantité de flavonoïdes présents dans les échantillons sans interférer avec d'autres groupes de substances phénoliques (Funari & Ferro 2006).

Les résultats obtenus (figure 33) montrent l'existence de grosses différences entre les teneurs rencontrées dans les deux parties de la plante et aussi entre les solvants utilisés.

Nous notons, en effet, des valeurs variant de 2,36 à 54,27 µg EQ/mg de fraction d'extrait de feuilles et de 1,19 à 4,85 µg EQ/mg de fraction d'extrait de baies.

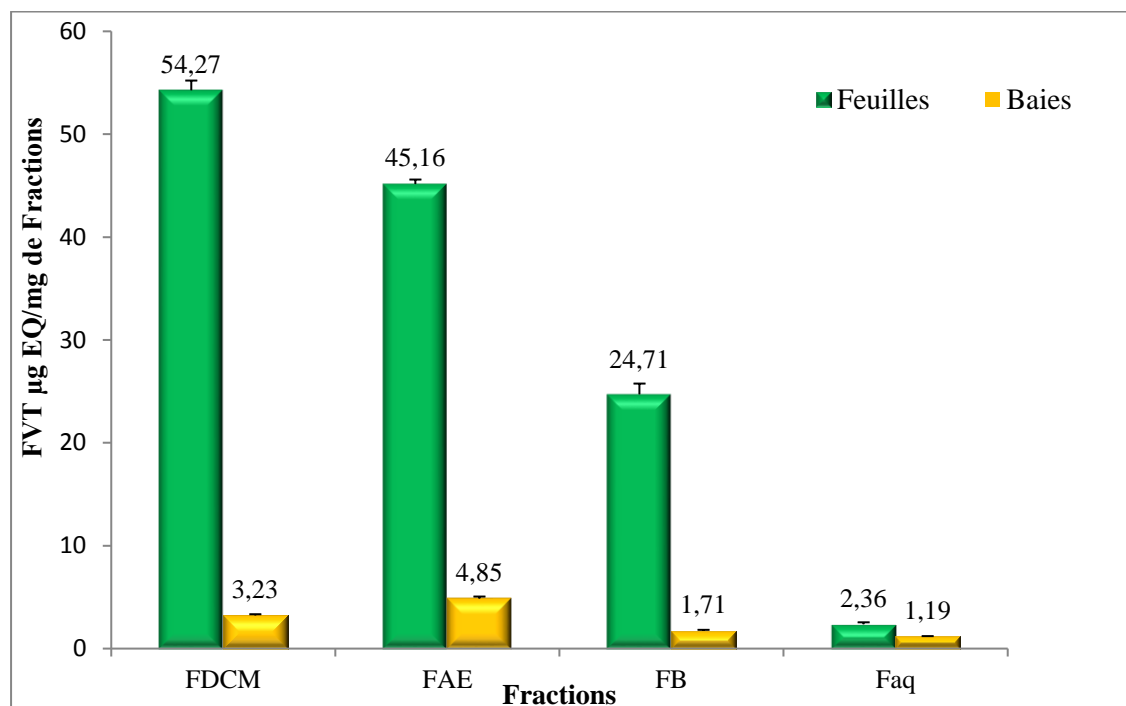


Figure 33 : Teneurs en flavonoïdes totaux des différentes fractions des feuilles et baies de *Chamaerops humilis*

Les teneurs en FVT enregistrées dans les feuilles sont significativement plus élevées que celles des baies ($p < 0.001$). En ce qui concerne les fractions, la FDCM et la FAE des feuilles montrent les valeurs les plus élevées (en moyenne 54,27 µg EQ/mg de fraction et 45,16 µg EQ/mg de fraction respectivement). C'est toutefois, la FDCM qui possède significativement plus de flavonoïdes que les autres fractions ($p < 0.05$). La FB présente pratiquement la moitié des teneurs rencontrées dans FDCM et FAE (en moyenne 24,71 µg EQ/mg de fraction) et plus de 10 fois les teneurs de la Faq qui s'élèvent seulement à 2,36 µg EQ/mg de fraction.

Au niveau des baies les teneurs en FVT varient de 1,19 à 4,85 µg EQ/mg de fraction ; c'est la FAE qui enregistre la teneur en FVT la plus élevée. A l'exception de la FAE les différences entre fractions sont non significatives ($P > 0,05$).

L'évaluation des proportions de flavonoïdes par rapport aux polyphénols totaux rencontrés dans l'extrait se fait par le calcul du rapport FVT/PPT ; les valeurs de ce rapport varient d'une fraction à l'autre ; elles sont très élevées pour la FDCM des feuilles (96%) et varient de 9% à 25 % pour les autres fractions. Nos résultats suggèrent que les polyphénols non flavonoïdiques (Stilbènes, Coumarines, acides phénoliques, phénols

simples...) sont prépondérants dans les feuilles et baies de *C. humilis* sauf en ce qui concerne la FDCM des feuilles.

Nos résultats rejoignent ceux trouvés dans la littérature, à savoir des teneurs élevées en flavonoïdes dans les feuilles de *C. humilis* (Williams & Harborne 1973; Benahmed *et al.*, 2013 ; Coleho *et al.*,2017). Ces auteurs ont identifié plusieurs flavonoïdes dans les feuilles de *C. humilis*, à savoir les leucoanthocyanidines (flavane-3,4-diols), la tricetine-5-O-glycoside, la lutéoline, et l'apigénin-6-C-glucoside-8-C-glucoside (flavone). En ce qui concerne les fruits (baies), il a été rapporté par Monache *et al.* (1972) la présence d'épicatéchine et de catéchine.

3.3 Dosage des tanins condensés (TC)

Le contenu en tannins condensés également connu sous le nom de proanthocyanidines (dérivés polymériques de flavan-3-ol) a été effectuée par la méthode développée par Sun *et al.* (1998). La méthodologie consiste à dépolymériser les tannins en milieu acide et, après réaction avec la vanilline, à les transformer en anthocyanidols de couleur rouge facilement analysables à 500 nm (Michel *et al.*, 2012). Les résultats ont été exprimés en μg d'Equivalent de Catéchine/mg de fractions ($\mu\text{g EC/mg}$).

Chez *C. humilis* les teneurs en tanins (figure 34) enregistrées varient de 1,41 et 198,1 $\mu\text{g EQC /mg}$ dans les feuilles et de 3,7 à 55,551 $\mu\text{g EQC /mg}$ dans les baies. Les teneurs en tanins notées dans les feuilles montrent une différence significative ($p < 0.05$) par rapport à celles relevées dans les baies.

Les teneurs en tanins condensés rencontrées dans les feuilles font 4 et 8 fois celles relevées dans les baies pour les fractions DCM et AE respectivement ; Les teneurs enregistrées dans les deux organes sont très proches dans les FB et légèrement plus élevées dans les baies en ce qui concerne les Faq.

Toutes les fractions contiennent des TC ; cependant, seule la FAE des feuilles (198,10 \pm 13,32 $\mu\text{g EQC /mg}$) possède une teneur aussi élevée et qui est, par ailleurs, significativement différente de celle des autres fractions ($p < 0.001$)

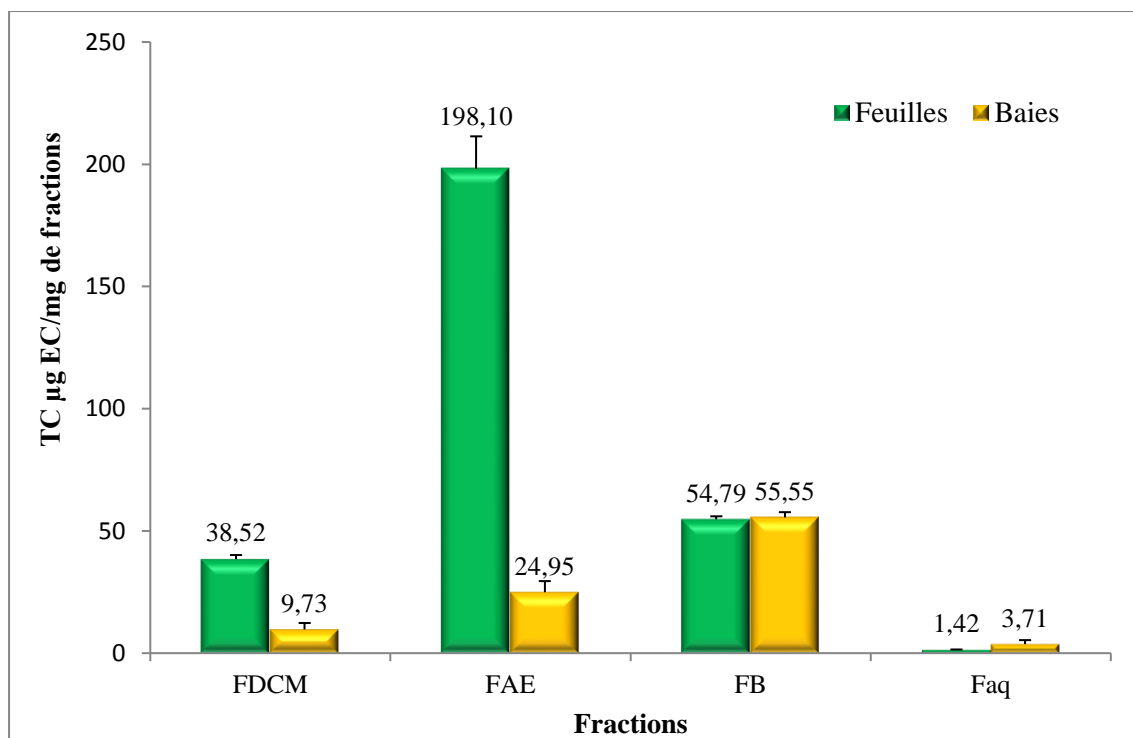


Figure 34 : Teneurs en tanins condensés des différentes fractions des feuilles et baies de *Chamaerops humilis*.

Jusqu' à présent, les recherches sur les feuilles et fruits de *chamaerops humilis* ne s'intéressaient qu'aux polyphénols et flavonoïdes de cette plante. Il n'y a pas d'information sur les teneurs en tanins condensés et/ou en anthocyanes ce qui rend difficile la discussion de nos résultats. Néanmoins en comparant nos résultats avec ceux d'autres plantes rapportés dans la littérature nous pouvons déduire que les teneurs en Tc sont très élevées. Des extraits éthanoliques de plusieurs parties de l'Argousier (*Hippophae rhamnoides*) montrent des teneurs en proanthocyanidines comprises entre 13 ± 6 et 176 ± 27 µg EC/mg d'extrait (Michel *et al.*, 2012). Dans une autre plante, *Stevia rebaudiana*, les teneurs en proanthocyanidines obtenues par Muanda (2011) sont de l'ordre de 10,2 µg EC/mg d'extrait. Les fortes teneurs en Tc obtenus dans le cadre de cette étude suggéreraient que, dans *C. humilis*, les proanthocyanidines constituent la proportion la plus abondante en composés phénoliques par rapport aux autres sous familles notamment, les flavonoïdes et les anthocyanes.

3.4 Dosage des anthocyanes monomères totaux (AMT)

Les anthocyanes sont des colorants naturels dérivés de nombreuses fleurs, fruits, légumes et légumineuses. Ils sont présents exclusivement sous forme de composés glycosidiques dans les plantes (Harborne & Grayer, 1988). Selon le pH, les pigments des anthocyanes sont rouges à violets ou bleus.

La figure 35, illustre les teneurs en AMT obtenus pour les différentes fractions testées. Dans cette composition nous constatons que les feuilles sont quantitativement plus riches en AMT que les baies. Au niveau des feuilles les teneurs sont très faibles et varient de 0,75 à 2,55 $\mu\text{g EC3G/mg}$ de fraction. Les baies présentent aussi des teneurs très faibles qui varient de 0,1 à 1,2 $\mu\text{g EC3G/mg}$ de fraction.

Ainsi la couleur jaune orangé des baies de *C. humilis* ne serait pas due à la présence de pigments d'anthocyanes mais vraisemblablement à celle d'autres pigments, tels que le carotène, responsables de la coloration des fruits. Cependant, il est signalé que plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en AMT tels que, l'emplacement géographique, le degré de maturation des fruits et les facteurs environnementaux tels que, la température, le degré d'exposition au soleil et des relations avec l'eau pendant la période de végétation (Kalt *et al.*, 1999 ; Tomás-Barberán and Espín, 2001).

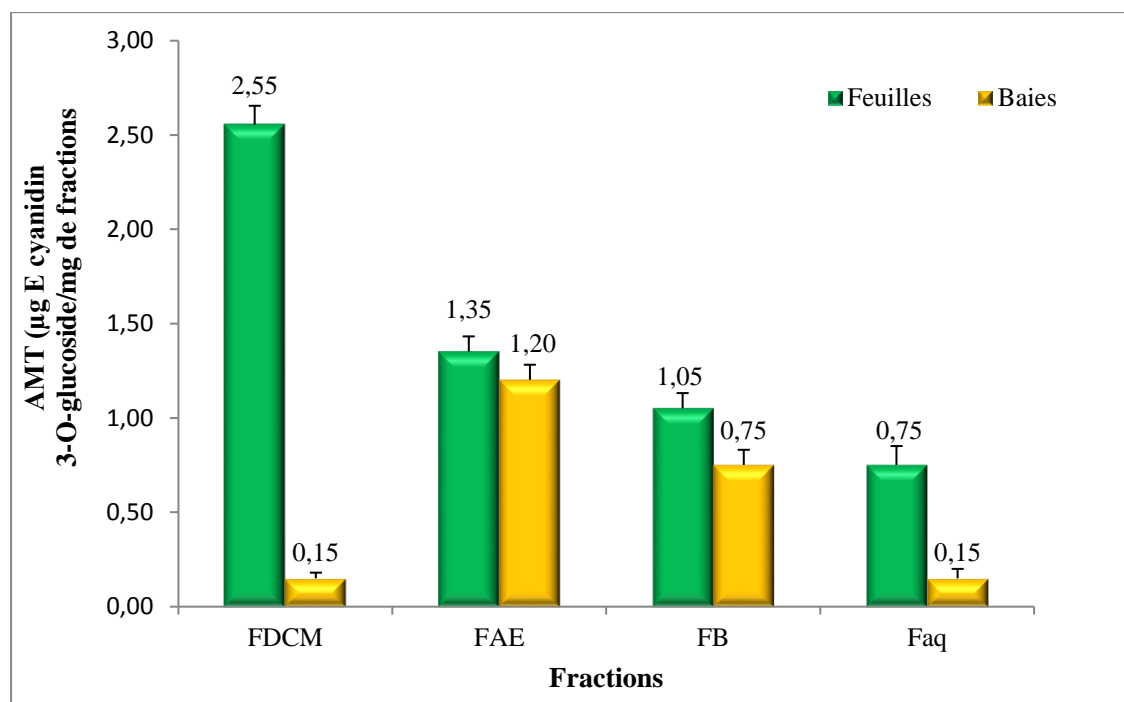


Figure 35 : Teneurs en anthocyanes monomères totaux des différentes fractions des feuilles et baies de *Chamaerops humilis*.

En comparant les résultats de notre recherche avec ceux d'autres auteurs (Muanda, 2010 ; Rezaire, 2012), Il apparaît que les quantités d'AMT des extraits de *C. humilis* montrent des teneurs très faibles par rapport à celles rencontrées dans la littérature. Il faut toutefois, en raison de la différence dans la façon d'exprimer les résultats (notamment les unités), être très prudent lors de la comparaison. Notons tout de même que Muanda (2010) a trouvé des teneurs en AMT très élevées dans les extraits de *Daniella oliveri* et *Ficus capensis* (245 et 283 mg EC3G/g respectivement). Relevons aussi que l'extrait hydrométhanolique de l'épicarpe d'*Oenocarpus bataua* (palmier amazonien) a montré des teneurs de $47,6 \pm 4,6$ mg EC3G/g (Rezaire, 2012).

Ainsi Les résultats des analyses quantitatives par spectrophotomètre UV-visible en composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes, tanins et anthocyanes) des extraits des feuilles et des baies de *C. humilis* indiquent que cette plante est majoritairement constituée de polyphénols et de tanins. Sa composition en flavonoïdes est importante au niveau des feuilles mais faible au niveau des baies. Enfin la plante ne contient pratiquement pas d'anthocyanes (PPT > TC > FVT > ATM).

4. Identification des composés phénoliques

4.1 Chromatogrammes des étalons

La figure 36 nous donne les chromatogrammes des mélanges des étalons utilisés ; les analyses sont faites à deux longueurs d'ondes différentes, 280 et 320 nm. Il est à noter que chaque étalon a été injecté séparément pour une meilleure détection, puis un mélange est réalisé pour le superposer sur les chromatogrammes des extraits de plante. Le mélange est composé d'une solution méthanol qui contient 13 étalons à des concentrations de 3 mg/ ml.

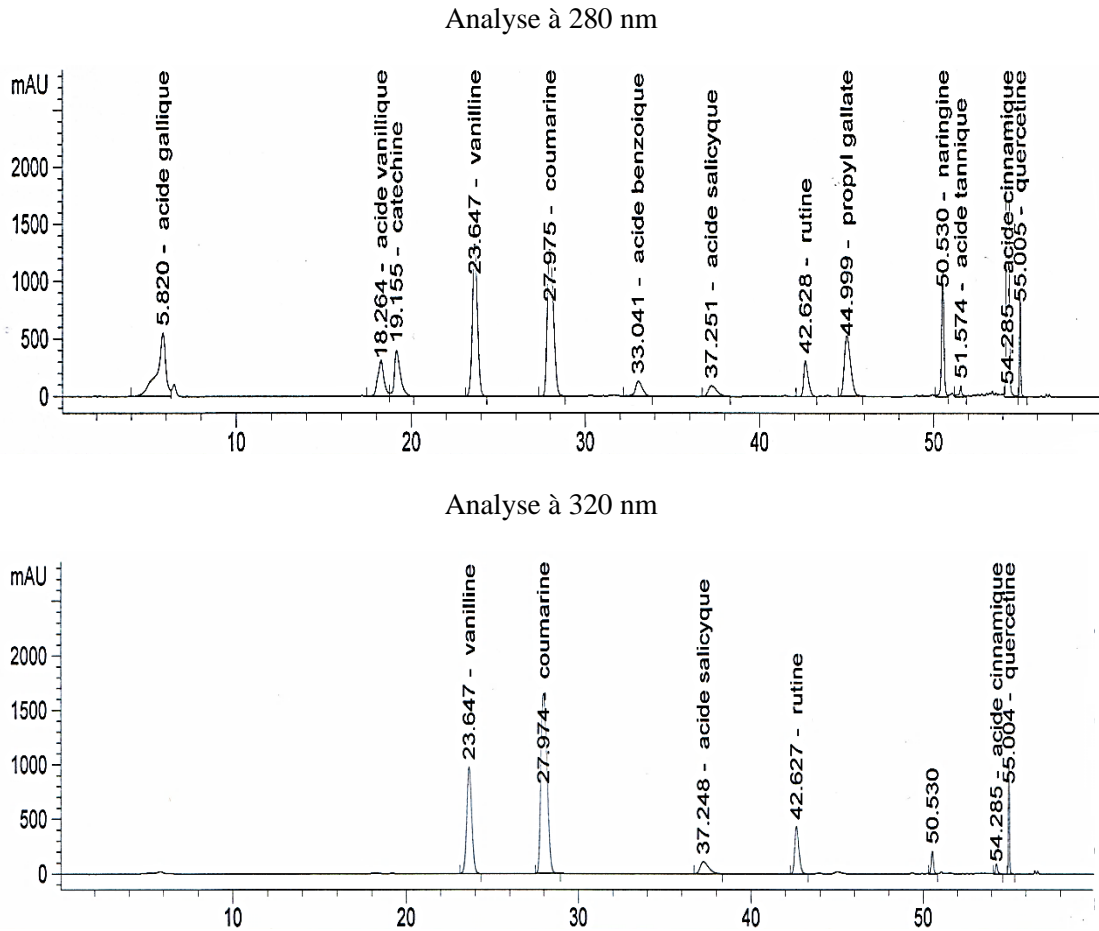


Figure 36 : Profil du chromatogramme du mélange des étalons à 280 et 320 nm.

La comparaison des deux chromatogrammes à 280 et à 320 nm montre que ceux-ci présentent de légères différences dues aux spectres d'absorption spécifique de certains composés phénoliques. Quercétine, rutine, acide salicylique et l'acide p-coumarique, absorbent préférentiellement à 320, tandis que les autres étalons sont mieux détectés à 280nm.

4.2 Analyses des extraits de *C. humilis*

L'identification et la quantification des composés phénoliques contenus dans les extraits sont faites par comparaison de leurs temps de rétention et des surfaces des pics obtenus avec ceux des étalons. Les résultats ont été exprimés en microgrammes par milligramme ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de fraction (Chan *et al.*, 2014). Notons qu'au cours de nos analyses tous les composés n'ont pas pu être identifiés par manque d'étalons adéquats.

4.2.1 Analyses des fractions des feuilles

Les profils chromatographiques des différentes fractions des feuilles de *C. humilis* analysés sont représentés au niveau des figures 37, 38, 39 et 40 tandis que les résultats des analyses qualitatives et quantitatives sont consignés dans le tableau 8.

En général, quatre composés phénoliques majeurs ont été détectés dans les fractions des feuilles de *C. humilis* selon l'ordre décroissant suivant : acide tannique > naringine > acide vanillique > acide p-coumarique.

L'analyse de ces résultats montre que dans la FDCM, l'acide tannique (10,81 µg/ mg fraction), la naringine (7,50µg/ mg fraction) et l'acide vanillique (6,12µg/ mg fraction) sont majoritaires.

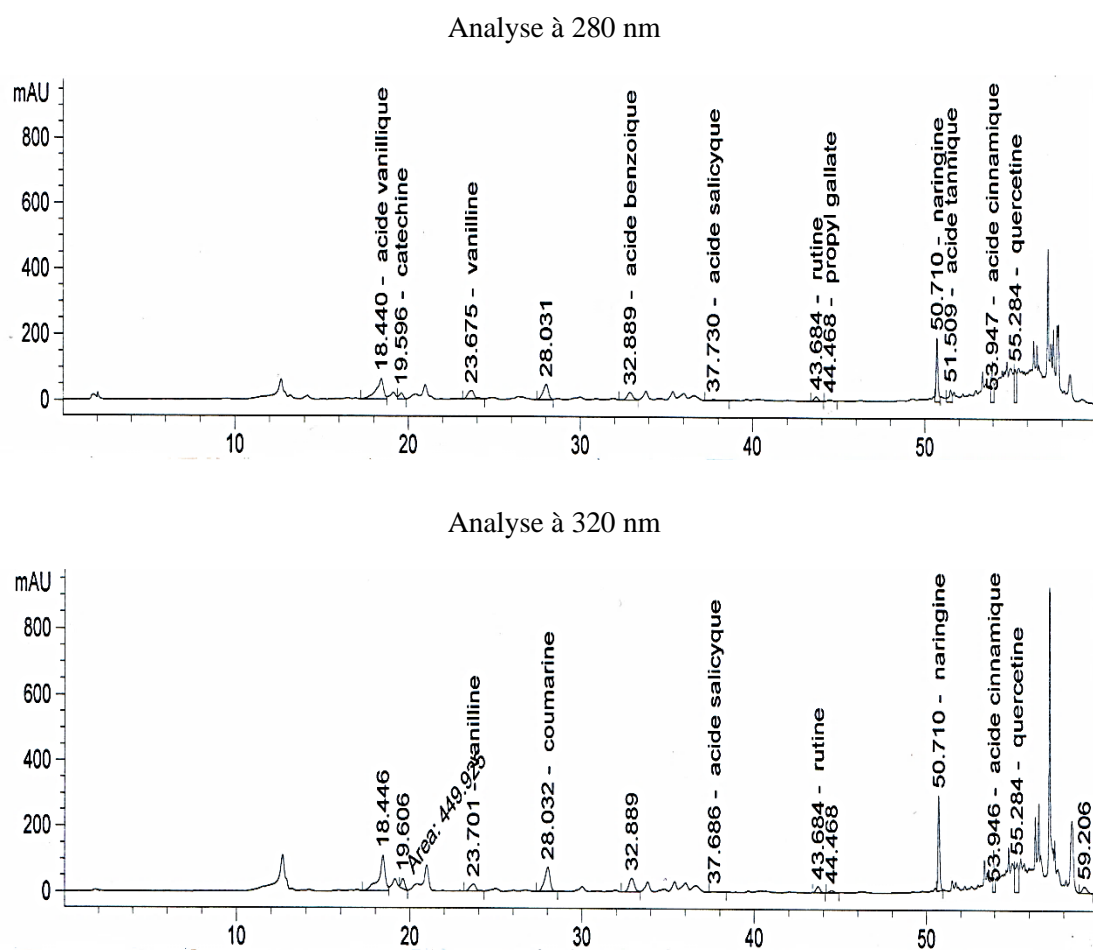


Figure 37 : Profil chromatographique de la FDCM des feuilles de *C. humilis*

La FAE est la plus riche en composés phénoliques ; elle contient tous les composés recherchés (correspondants aux étalons utilisés). De plus, c'est la seule fraction qui contient l'acide gallique (sous forme de trace, à raison de 0,07 µg/mg fraction). La FAE montre des teneurs importantes en acide tannique (57,77µg/mg fraction), en naringine (48,58µg/mg fraction), en acide vanillique (22,71µg/mg fraction) et en acide p-coumarique (22,05µg/mg fraction). En outre, cette fraction contient aussi des quantités assez importantes d'acide cinnamique (15,99 µg/mg fraction) et de quercétine (11,47 µg/mg fraction).

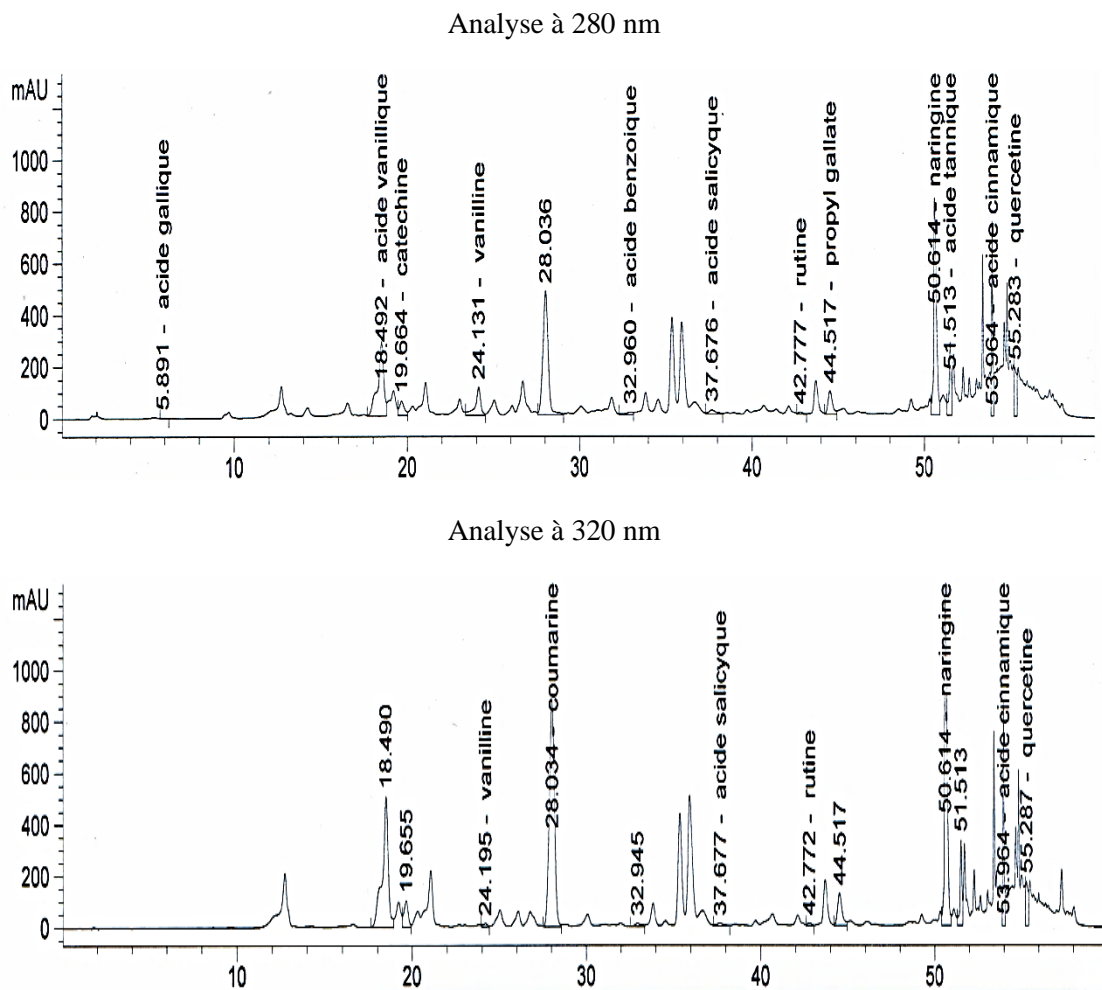


Figure 38: Profil chromatographique de la FAE des feuilles de *C. humilis*.

✚ La FB est riche en naringine (45,22 µg/ mg fraction) et en acide tannique (25,65 µg/mg fraction).

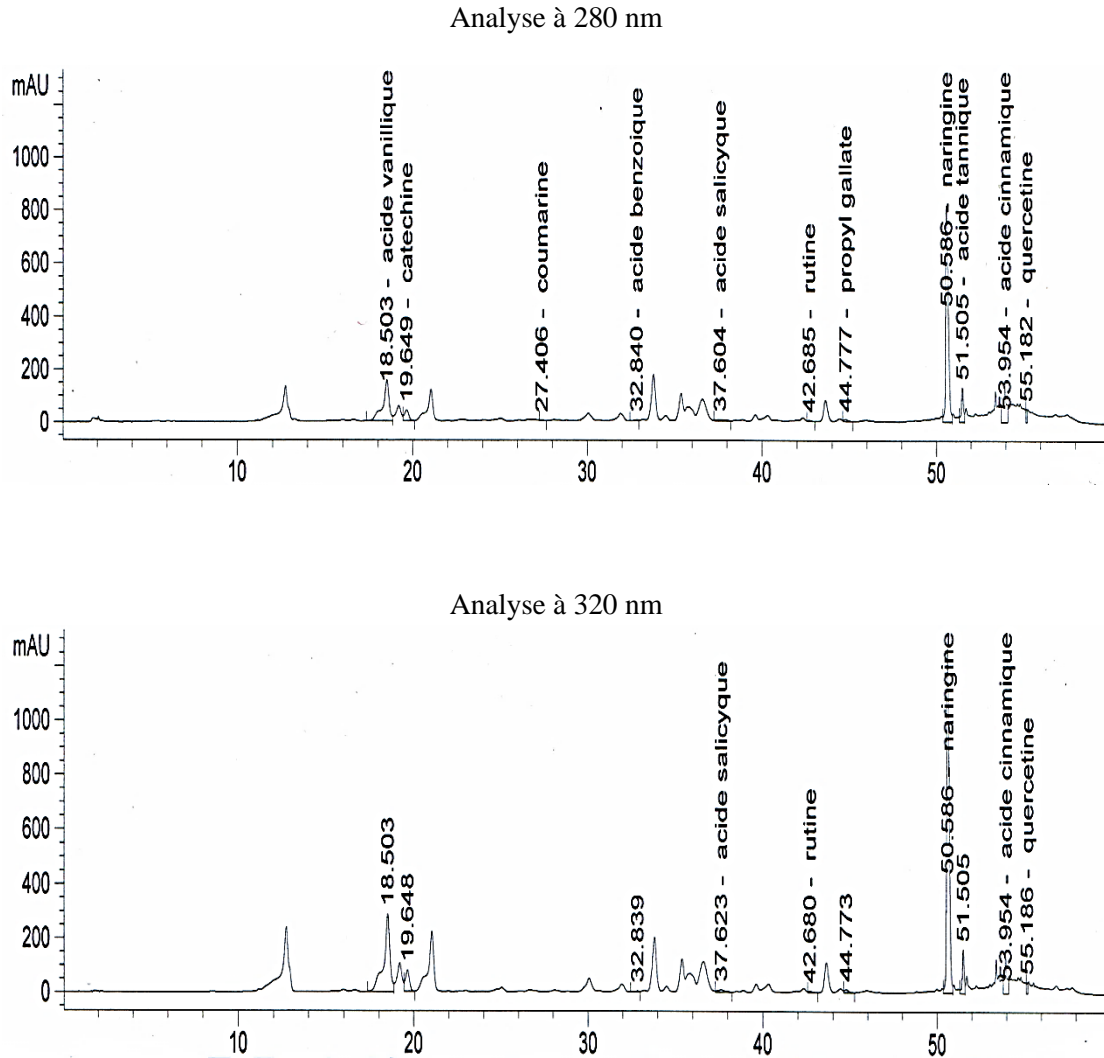
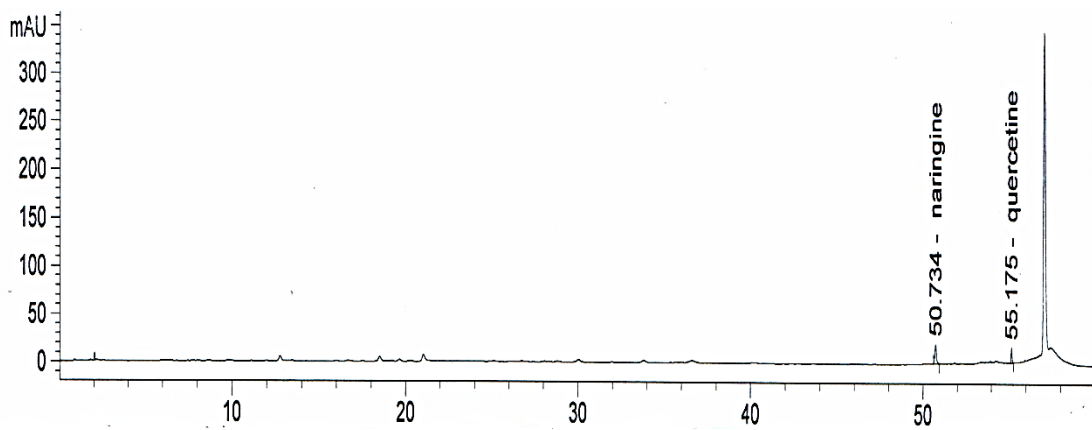


Figure 39: Profil chromatographique de la FB des feuilles de *C. humilis*

✚ Enfin, seule de faibles quantités en naringine (0,65µg/mg fraction) et en quercétine (0,35 µg/mg fraction) ont été détectées dans la Faq (Fig.40).

Analyse à 280 nm



Analyse à 320 nm

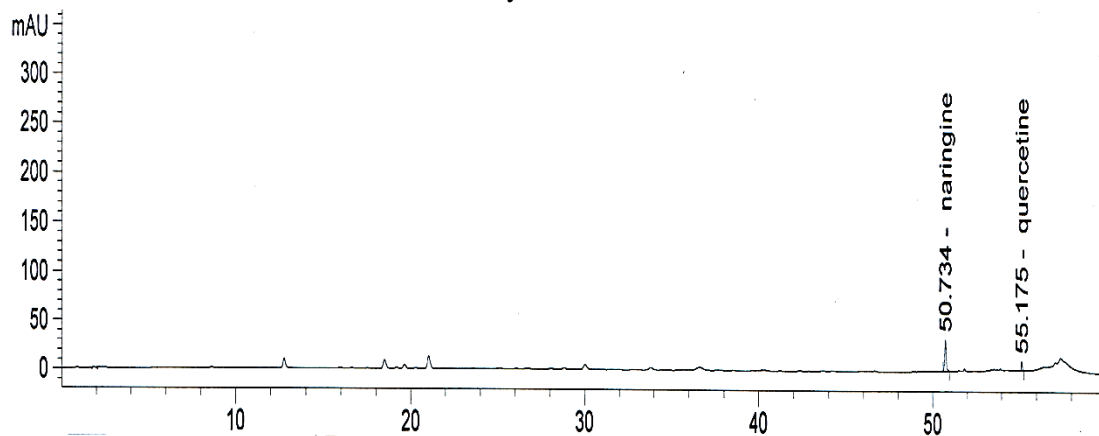


Figure 40 : Profil chromatographique de la Faq des feuilles de *C. humilis*

Nos résultats montrent que les différences, dans la composition phénolique entre les fractions (à l'exception de la Faq), sont significativement plus quantitatives que qualitatives ; ceci est d'ailleurs illustré par les quantités élevées en composés phénoliques que montre la FAE par rapport aux autres fractions.

Tableau 8 : Composés phénoliques identifiés dans les fractions des feuilles de *C. humilis*

Nom du composé	TR (min)	λ_{max} (nm)	Feuilles ($\mu\text{g}/\text{mg}$ fractions)			
			FDCM	FAE	FB	Faq
Acide gallique	5,82	280	-	0,07	-	-
Acide vanillique	18,26	280	6,12	22,71	12,90	-
Catéchine	19,15	280	1,87	6,40	4,07	-
Vanilline	23,64	280	1,17	4,11	-	-
Acide p-coumarique	27,97	320	1,98	22,05	0,05	-
Acide benzoïque	33,04	280	3,79	2,12	0,38	-
Acide salicylique	37,25	320	0,94	4,26	1,65	-
Rutine	42,62	320	0,98	0,71	0,21	-
Propyl gallate	44,99	280	0,08	2,15	0,16	-
Naringine	50,53	280	7,50	48,58	45,22	0,65
Acide tannique	51,57	280	10,81	57,77	25,65	-
Acide cinnamique	54,28	280	3,97	15,99	7,48	-
Quercétine	55,00	320	5,95	11,47	1,68	0,35

4.2.2 Analyses des fractions des baies

Les résultats des analyses quantitatives des composés phénoliques identifiés dans les fractions des baies de *C. humilis* sont regroupés dans le tableau 9. Les profils chromatographiques sont présentés dans les figures 41, 42, 43 et 44.

Ainsi, l'analyse des fractions des baies a montré que, celles-ci étaient moins riches en composés phénoliques que les fractions des feuilles. Les composés phénoliques identifiés dans ces fractions peuvent être classés selon l'ordre suivant : acide tannique > quercétine > acide vanillique > naringine.

Les résultats montrent que dans la FDCM, la quercétine ($1,35\mu\text{g}/\text{mg}$ fraction) est le composé phénolique majoritaire (fig. 41). D'autres composés comme l'acide cinnamique, l'acide tannique, et la rutine sont décelées à d'infimes quantités.

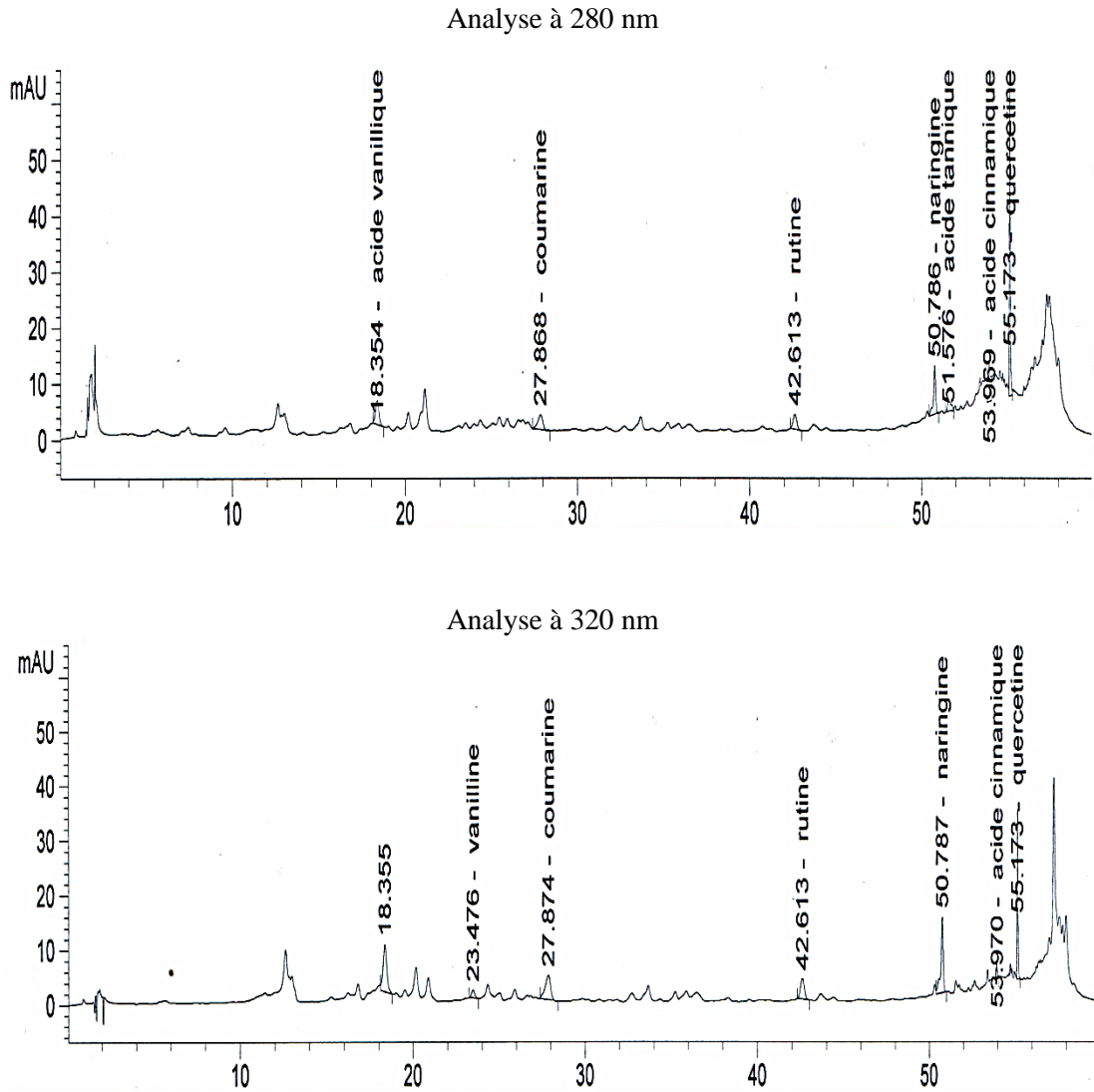


Figure 41 : Profil chromatographique de la FDCM des baies de *C. humilis*

- Dans la FAE c'est l'acide tannique (16,95µg/mg fraction), et la quercétine (11,43 µg/mg fraction) qui sont les plus représentatifs (fig.42). Par ailleurs, cette fraction est la plus riche en composés phénoliques d'un point de vue quantitatif et qualitatif.

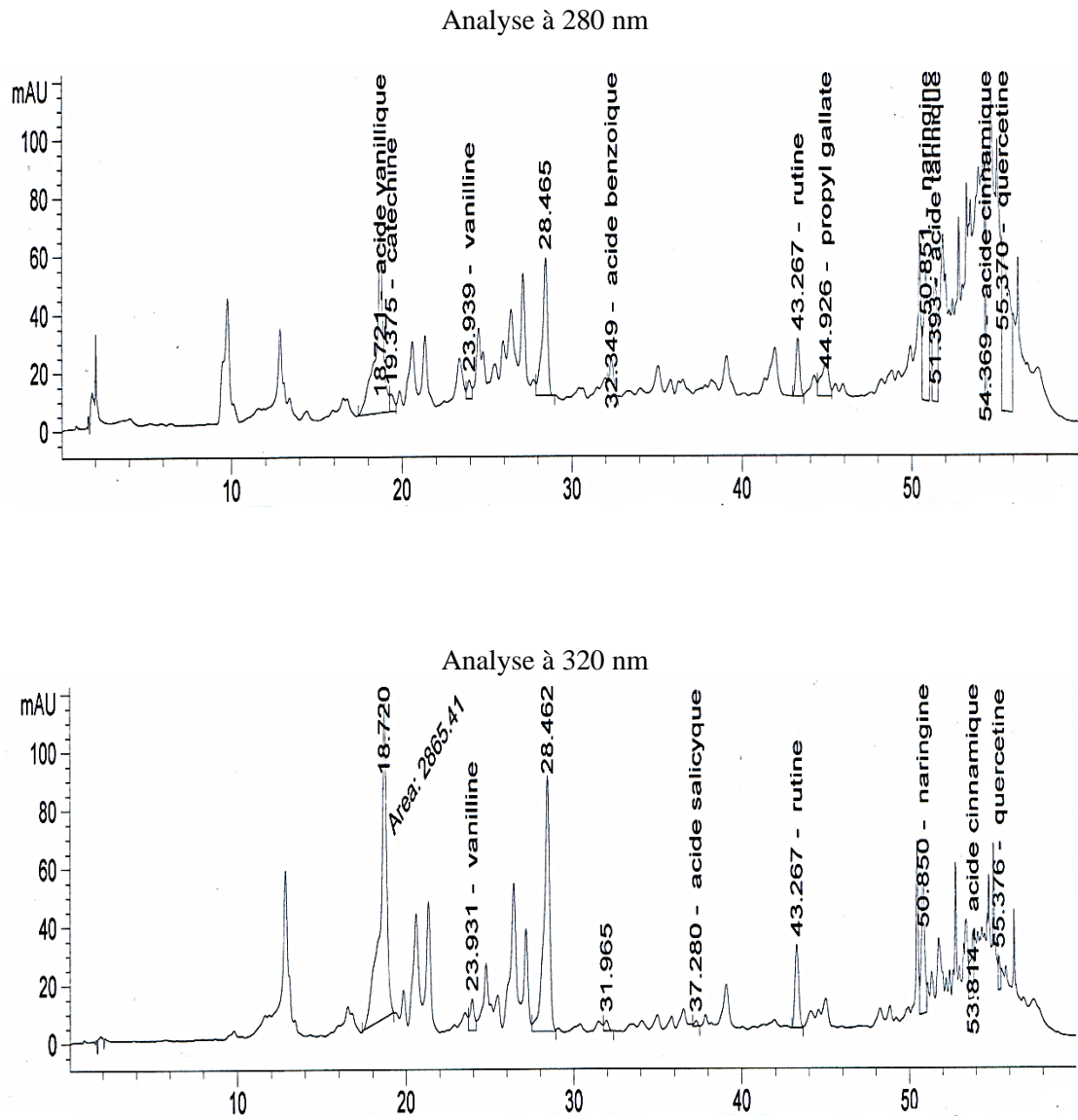


Figure 42: Profil chromatographique de la FAE des baies de *C .humilis*

✚ La FB présente des teneurs faibles en rutine, acide cinnamique, naringine, et quercétine (fig.43).

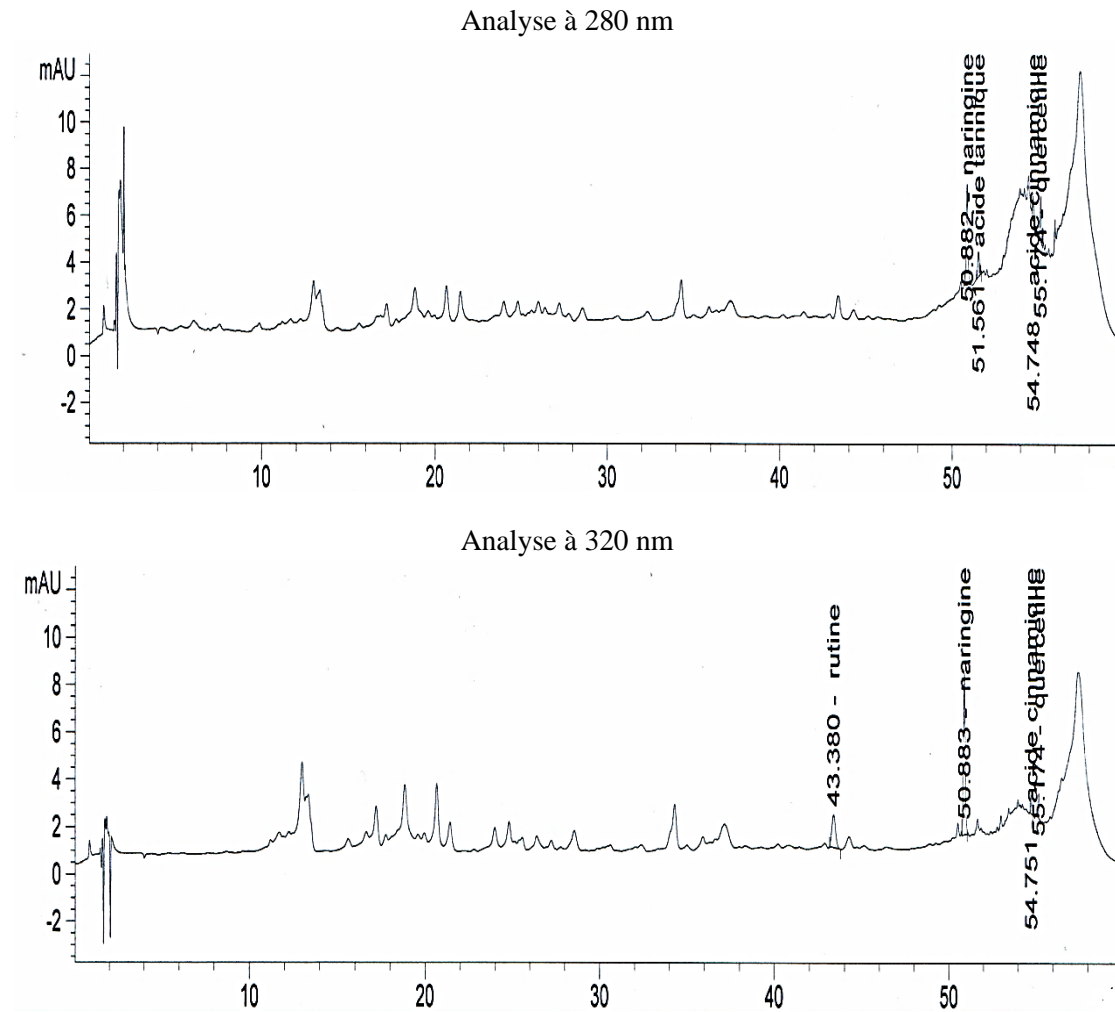


Figure 43 : Profil chromatographique de la FB des baies de *C. humilis*

- ✚ La Faq, est la moins riche en composés phénoliques, seules des traces en quercétine (0,03 µg/mg fraction) ont pu être décelées dans cette fraction (fig.44).

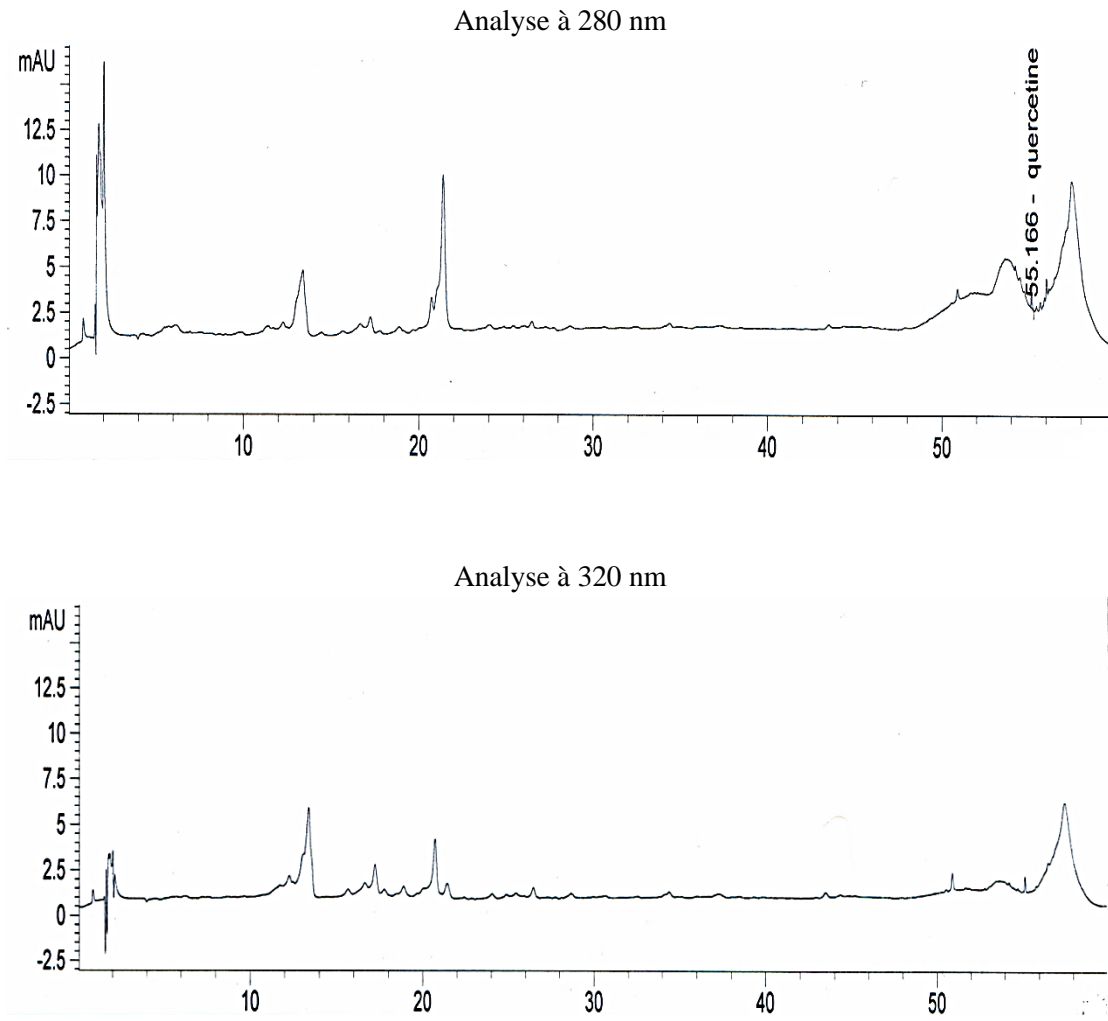


Figure 44 : Profil chromatographique de la Faq des baies de *C. humilis*

Tableau 9 : Composés phénoliques identifiés dans les fractions des baies de *C. humilis*

Nom du composé	TR (min)	λmax (nm)	Baies (µg/mg fraction)			
			FDCM	FAE	FB	Faq
Acide gallique	5,82	280	-	-	-	-
Acide vanillique	18,26	280	0,19	6,14	-	-
Catéchine	19,15	280	-	0,61	-	-
Vanilline	23,64	280	0,03	0,18	-	-
Acide p-coumarique	27,97	320	0,06	-	-	-
Acide benzoïque	33,04	280	-	1,53	-	-
Acide salicylique	37,25	320	-	-	-	-
Rutine	42,62	320	0,17	1,42	0,66	-
Propyl gallate	44,99	280	-	0,49	-	-
Naringine	50,53	280	0,40	4,43	6,09	-
Acide tannique	51,57	280	0,65	16,95	-	-
Acide cinnamique	54,28	280	0,32	1,71	0,24	-
Quercétine	55,00	320	1,34	11,43	0,44	0,03

Ainsi, les quantités en PPT mesurées par HPLC sont en bon accord avec à celles déterminées par spectrophotométrie. Cette observation implique clairement que l'acétate d'éthyle a une sélectivité élevée pour tous les principaux composés phénoliques présents dans les extraits. Les résultats de cette étude sont en accord avec les résultats de Dhingra *et al.* (2017), qui notent que le fractionnement à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de *Prunus dulcis* L augmentait le taux en composés phénoliques.

5. Etude des activités anti-oxydantes

Jusqu'à présent, il n'existe pas de méthode universelle, unique et fiable qui permettrait de refléter au mieux la capacité antioxydante d'un extrait végétal. En effet, pour juger de l'effet antioxydant global, l'utilisation de plusieurs tests à différents mécanismes d'actions est nécessaire.

Les antioxydants peuvent réduire les radicaux libres par deux mécanismes majeurs : par transfert d'électron ou par transfert d'atome d'hydrogène. La méthode DPPH joue sur le transfert d'un atome d'hydrogène. Le test FRAP quant à lui se base uniquement sur un

transfert d'électron. Alors que la méthode ABTS^{•+} se base sur un transfert simultané d'électron et d'atome d'hydrogène (Prior *et al.*, 2005 ; Seeram *et al.*, 2008).

De plus, la solubilité des radicaux est un paramètre important à prendre en considération. En effet l'ABTS^{•+} est soluble en milieux organique et aqueux tandis que le DPPH[•] est soluble uniquement en milieu organique et plus particulièrement dans les solutions alcooliques. Ainsi, le test ABTS^{•+} permet l'évaluation de la capacité antioxydante de tous les agents hydrophiles et lipophiles. Alors que le test au DPPH[•] est plus sélectif et ne permet donc que l'étude des agents lipophiles (Belkheiri, 2010). Enfin, le test BBC (blanchissement du β -carotène), est considéré comme une simulation *in vitro* de l'oxydation des composants lipidiques membranaires (Tepe *et al.*, 2005).

5.1 Résultats du test DPPH

L'étude a montré que toutes les fractions des feuilles et des baies de *C. humilis* étudiées possédaient un pouvoir antioxydant intéressant (principalement les fractions AE, puis les FB). Ce pouvoir est confirmé par des valeurs d'IC₅₀ faibles (tableau10) et des pourcentages d'inhibitions important (figure 45et 46).

D'après les résultats, l'évolution de l'activité antiradicalaire est dose-dépendante. Les pourcentages d'inhibitions augmentent proportionnellement jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à l'inhibition presque totale du radical DPPH présent dans le milieu réactionnel. Ainsi, ce plateau témoignant d'une grande activité antioxydante, est atteint uniquement avec la solution témoin d'acide ascorbique (control positif) et la fraction AE des feuilles. Au niveau des feuilles, les valeurs d'IC₅₀ varient entre 12,41 et 136,5 μ g/ml. Quant aux fractions des baies, les valeurs d'IC₅₀ varient entre 75,85et 494,84 μ g/ml.

L'analyse de la variance réalisée sur les extraits des deux parties de la plante et le contrôle positif (acide ascorbique) à la concentration de 100 μ g/ml, indique que seul l'extrait acétate d'éthyle des feuilles (PI=90,44%) présente une activité antioxydante aussi active que celle montrée par le contrôle positif (PI=94,03%) ($p > 0,05$). Les fractions BF des feuilles (PI=82,59%) et la FAE des baies (PI=68,90%) présentent une activité élevée mais qui est significativement inférieure à celle de l'acide ascorbique ($p < 0,01$) et qui peuvent être donc qualifiée de fractions à activité intermédiaire.

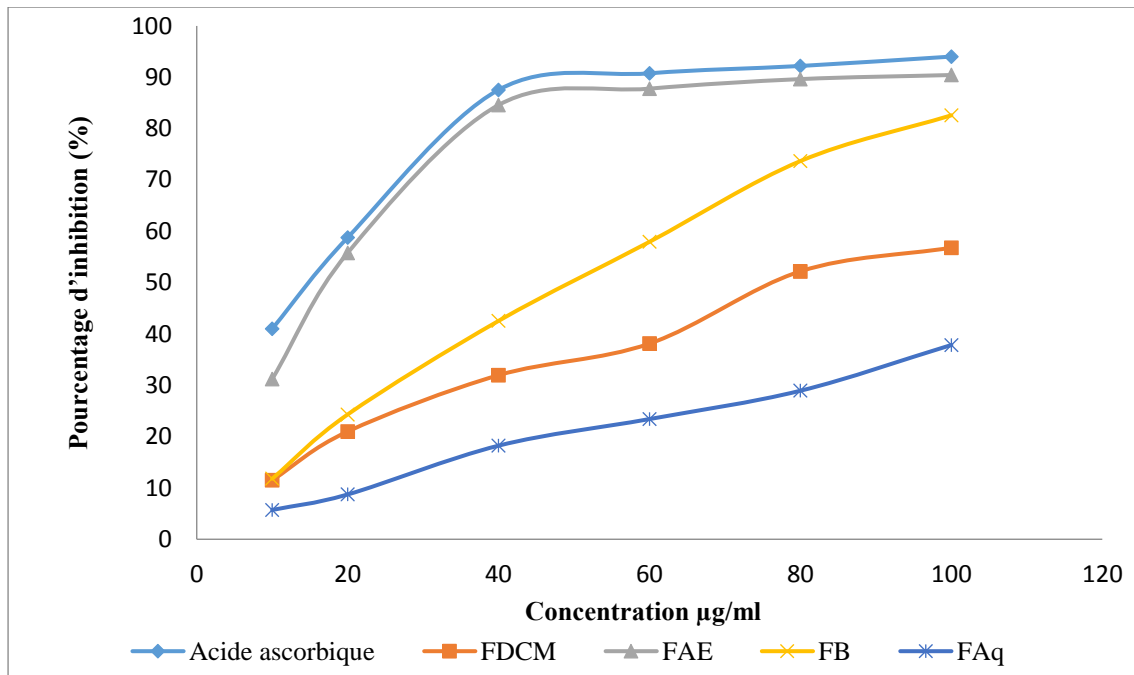


Figure 45 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations d'acide ascorbique et de fractions des feuilles

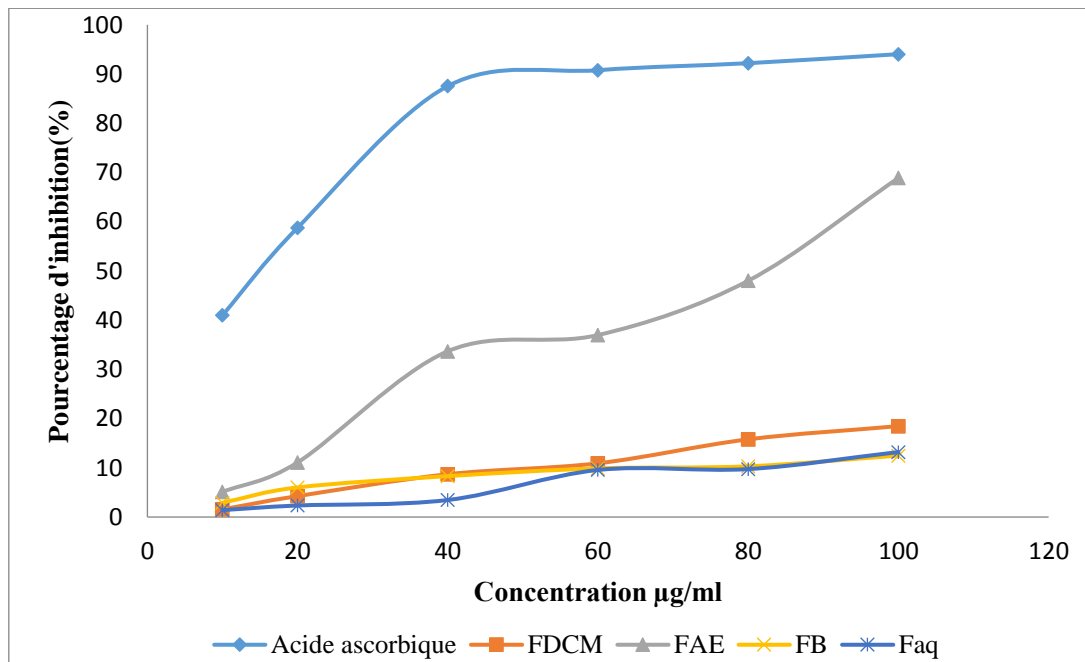


Figure 46 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations d'acide ascorbique et de fractions des baies

De plus, les fractions issues des feuilles ont montré des activités significativement supérieures à celle des baies ($p < 0,05$). Ces résultats sont cohérents avec l'évolution des teneurs en composés phénoliques (polyphénols, tanins, et flavonoïdes) rencontrées au niveau des différentes fractions. Ceci tend à indiquer que l'activité antioxydante, serait liée de façon privilégiée aux teneurs en composés phénoliques.

Tableau 10 : Activité antioxydante des fractions de feuilles et baies de *Chamaerops humilis*, et, de l'acide ascorbique avec le radical DPPH

Matériels végétale /Standard	Fractions	DPPH	
		PI (%) à 100 μ g/ml	IC ₅₀ (μ g/ml)
Feuilles	DCM	56,79 ^b	81,35 ^b
	AE	90,44 ^a	12,41 ^a
	B	82,59 ^b	53,17 ^b
	Aq	37,84 ^c	136,50 ^c
Baies	DCM	18,47 ^d	266,89 ^d
	AE	68,90 ^b	75,85 ^b
	B	12,49 ^f	494,84 ^f
	Aq	13,20 ^e	372,94 ^e
Standard	A/ascorbique	94,03 ^a	7,23 ^a

Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0,05$.

En comparant nos résultats avec ceux de la littérature, on peut conclure que les feuilles de *C. humilis* possèdent un pouvoir antioxydant très important. Miguel *et al.* (2014) dans leur entreprise d'évaluation, à l'aide de la méthode DPPH, de l'activité antioxydante de 11 plantes médicinales du Maroc notent que l'extrait des feuilles de *C. humilis* présente la plus forte activité antioxydante (IC₅₀ = 0,035mg/ml). En ce qui concerne le fruit de *C. humilis*, aucune étude n'a été réalisée sur son potentiel antioxydant.

5.2 Résultats du test du blanchissement du β -carotène

Les lipides membranaires sont riches en acides gras insaturés ; ces derniers sont les plus sensibles aux processus oxydatifs. En particulier, l'acide linoléique et l'acide arachidonique qui, selon Yu (2001), sont des cibles de la peroxydation lipidique. D'après Chan *et al.*, (2014), dans ce test, la présence d'antioxydants dans l'extrait minimiserait l'oxydation du β -carotène par les hydroperoxydes générés par l'oxydation de l'acide linoléique. Il est, par ailleurs, supposé que l'activité antioxydante des essais *in vitro* à base de peroxydation lipidique, refléterait, étroitement l'action *in vivo* (Prior *et al.*, 2005). Les figures 47 et 48 illustrent l'efficacité des extraits et du BHT à l'inhibition de la

peroxydation des lipides, traduite par le changement d'absorbance en fonction des différents intervalles de temps.

Nos résultats, montrent que l'absorbance diminue rapidement dans l'échantillon sans antioxydant (contrôle négatif), mais en présence d'un antioxydant, les échantillons conservent leurs couleurs et donc leurs absorbances plus longtemps. Il est évident que toutes les fractions, testés inhibent d'une manière efficace et significative ($p < 0,01$) l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β carotène par rapport au contrôle négatif qui représente 100% de la peroxydation.

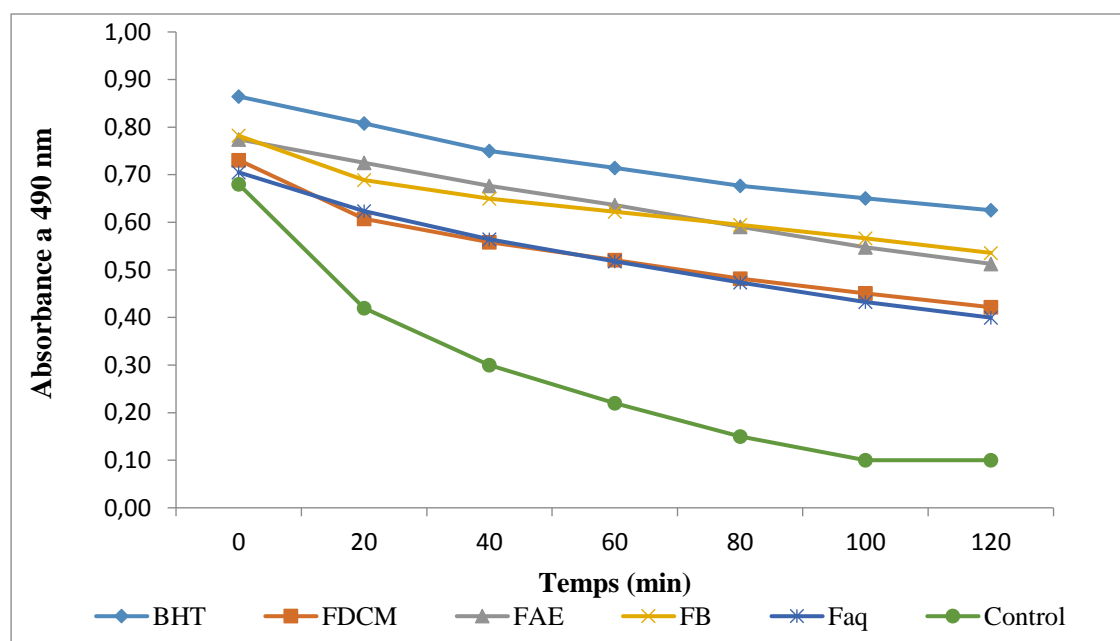


Figure 47 : Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en absence et en présence des fractions des feuilles de *Chamaerops humilis* et du BHT

Au niveau des feuilles (figure 47), Les deux fractions, FB (PI=68,51%) et FAE (PI=66,24%) montrent la plus grande activité inhibitrice. Ces deux fractions présentent des activités qui sont statistiquement similaires à celles du BHT (PI=72,38%) utilisé comme contrôle positif ($P > 0,05$). Une activité antioxydante pouvant être considérée comme intermédiaire est obtenue avec la FDCM (PI=57,66%) et la Faq (PI=56,69%).

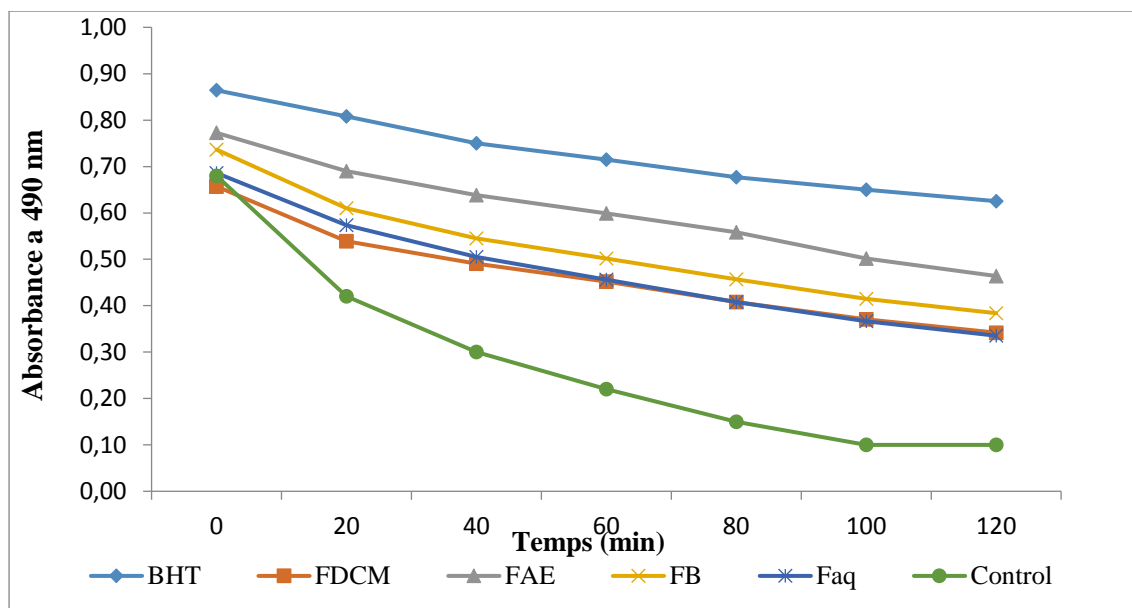


Figure 48 : Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en absence et en présence des fractions des baies de *Chamaerops humilis* et du BHT

Au niveau des baies, les activités antioxydantes sont moins importantes (figure 48). Néanmoins celles-ci restent intéressantes puisque toutes les fractions ont une activité qui se situe aux alentours d'un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 50%.

La FAE montre la plus grande activité inhibitrice dont l'activité antioxydante relative est de l'ordre de 60,06% ; toutefois, cette activité reste significativement inférieure ($p < 0,05$) à celle du BHT. La Faq (PI=48,88%) représente l'extrait le moins actif.

Ainsi, à l'exception des FAE et FB des feuilles, les six autres fractions ont des pourcentages d'inhibitions assez homogènes (tableau 11), ce qui démontre d'une part, que les molécules responsables de la protection de l'oxydation de l'acide linoléique dans le système β -carotène couvrent, une large gamme de polarité et, d'autre part, que celles-ci sont bien partagées entre les différentes fractions. De plus, ces résultats ne sont pas cohérents avec l'évolution des teneurs en composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes, tanins et anthocyanes). En effet, la FAE des feuilles, bien que contenant les teneurs les plus élevées en composés phénoliques, elle ne possède pourtant pas l'activité antioxydante la plus importante. Effectivement, la plupart des études ont montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre les composés phénoliques et l'inhibition de la peroxydation des lipides dans le Système β -carotène/acide linoléique (Chew *et al.*, 2008 ; Mariod *et al.*, 2009), ce qui suggérerait qu'en plus de la contribution probable des composés phénoliques, d'autres biomolécules interviendraient dans ce test.

Tableau 11 : Activité antioxydante des fractions de feuilles et de baies de *Chamaerops humilis* et du BHT dans le système β -carotène / acide linoléique.

Matériels végétale /Standard	Fractions	Système β -carotène/acide linoléique
		PI (%) à 0,35mg/ml
Feuilles	DCM	57,66 ^b
	AE	66,24 ^a
	B	68,51 ^a
	Aq	56,69 ^b
Baies	DCM	52,05 ^c
	AE	60,06 ^b
	B	52,11 ^c
	Aq	48,88 ^c
Standard	BHT	72,38 ^a

Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0,05$.

Par ailleurs, selon Frankel et Meyer (2000), le test de blanchissement du β carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau ; ces deux auteurs ont proposé que les antioxydants apolaires montrent des propriétés antioxydantes plus importantes étant donné qu'ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi la prévention de la formation des radicaux lipidiques et l'oxydation du β carotène.

Dans le cadre de notre étude les fractions dichlorométhaniques (fractions apolaires) n'ont pas montré la meilleure activité vis-à-vis du test β -carotène/acide linoléique. La phase de délipidation qui a eu lieu lors de l'extraction, pourrait expliquer ces résultats. De nombreux auteurs ont proposé que les molécules qui sont habituellement extraites par ce processus et qui sont à caractère amphiphile et lipophile, telles que les lipides, les acides gras et les vitamines liposolubles, jouent un rôle non négligeable dans la mesure de la capacité antioxydante (Simic *et al.*, 2003; Counet *et al.*, 2006).

5.3 Résultats du test FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power)

Les figures 49 et 50 montrent le pouvoir réducteur des fractions des feuilles et des baies de *C. humilis*, et de l'acide ascorbique en fonction de leur concentration. Dans ce test, la couleur jaune de la solution d'essai change en différentes nuances de vert et de bleue, selon le pouvoir réducteur de chaque composé. La présence de réducteurs (antioxydants) provoque la conversion du complexe $\text{Fe}^{3+} (\text{CN}^-)_6$, utilisé dans cette méthode, en fer ferreux ($\text{Fe}^{2+} (\text{CN}^-)_6$) (Wu *et al.*, 2015).

Au niveau des feuilles (figure 49), toutes les fractions ont montré la présence d'effets réducteurs ; ces derniers augmentent avec une augmentation de la concentration (effet dose-dépendant). Cependant, dans ce test, l'activité de l'acide ascorbique (contrôle positif) ($EC_{50}=0,06\text{mg/ml}$) est significativement supérieure à celle des fractions ($p<0,01$). La FAE est la plus active ($EC_{50}=0,19\text{mg/ml}$), suivie de la FB (0,62mg/ml), tandis que les fractions FDCM, et Faq sont les moins efficaces à la réduction des complexes Fe^{3+} avec respectivement des EC_{50} de 1,06 et 0,9 mg/ml. Ceci pourrait être lié à la faible quantité en composés phénoliques que ces deux fractions présentent.

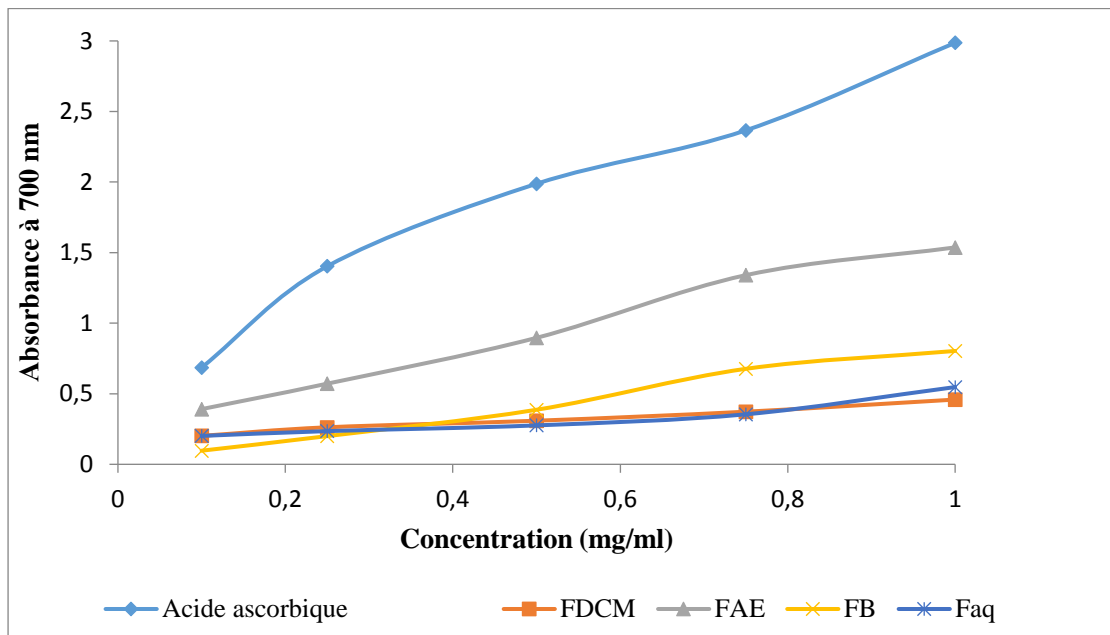


Figure 49 : Pouvoir réducteur des fractions des feuilles de *C. humilis* et de l'acide ascorbique

En ce qui concerne les baies, celles-ci ne possèdent pratiquement pas d'activité réductrice (figure 50). Les EC_{50} varient entre 1,22 et 10,18mg/ml ; c'est la FAE qui présente le pouvoir réducteur le plus élevé. Sur la base de ces résultats, on peut en déduire que seule, la FAE des feuilles neutralise les radicaux libres en raison de sa capacité à donner des électrons. Cela aurait pour effet de convertir les radicaux libres en produits beaucoup plus stables et de mettre fin aux réactions en chaîne initiées par les radicaux libres (Dhingra *et al.*, 2017).

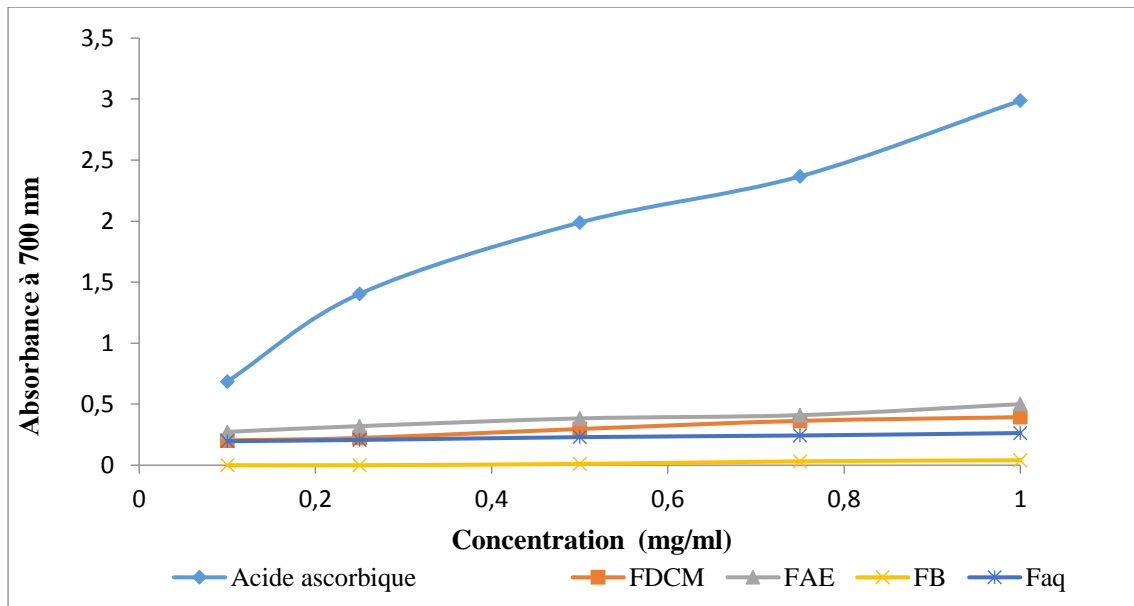


Figure 50 : Pouvoir réducteur des fractions des baies de *C. humilis* et de l'acide ascorbique

De ce fait, le test FRAP confirme, par rapport au test DPPH, la perte d'activité observée dans toutes les fractions. Ceci tend à indiquer que l'activité antioxydante des biomolécules de *C. humilis* serait liée de façon privilégiée à un mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène et que les mécanismes de transfert d'électrons seraient moins importants. Par conséquent, ce test démontre que l'activité antioxydante ne dépend pas seulement de la concentration en composés phénoliques, mais aussi de la structure et de la nature des antioxydants. En effet, de nombreux auteurs ont établi que l'activité antioxydante est positivement corrélée avec la structure des polyphénols (Li *et al.*, 2012 ; Bouterfas *et al.*, 2016).

Tableau 12 : Test FRAP des fractions de *C. humilis* exprimés en EC₅₀

Matériels végétale /Standard	Fractions	FRAP
		EC ₅₀ (mg/ml)
Feuilles	DCM	1,06 ^d
	AE	0,19 ^b
	B	0,62 ^c
	Aq	0,90 ^d
Baies	DCM	1,60 ^f
	AE	1,22 ^e
	B	10,18 ^h
	Aq	4,43 ^g
Standard	A/ascorbique	0,06 ^a

Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0,05$.

Aucune étude n'a été réalisée sur le potentiel antioxydant par le test FRAP sur les extraits de *C. humilis*. Néanmoins, l'activité antioxydante totale de certaines espèces de plantes algériennes a été évaluée à l'aide du test FRAP par Benhammou *et al.*, (2009); ces auteurs rapportent dans l'extrait de feuilles d'*Atriplex halimus* (famille des *Amaranthaceae*) des EC₅₀ de l'ordre de 1,52 mg/ml et 1,76mg/ml, respectivement pour les fractions acétate d'éthyle et butanol. Nos résultats montrent que les FAE et FB des feuilles de *C. humilis* possèdent un pouvoir réducteur plus important que celui rapporté par ces auteurs. Cependant, la capacité de réduction ne reflète pas nécessairement l'activité antioxydante, comme l'ont suggéré Wong *et al.* (2006).

5.4 Résultats du test ABTS•+

L'étude des activités anti-oxydantes, par l'application du test chimique ABTS, des fractions des feuilles et des baies de *C. humilis* a montré que ces extraits sont actifs du point de vue pouvoir anti-radicalaire. Les résultats confirment, comme pour les tests précédents, que les fractions des baies sont moins actives que celles des feuilles ($p < 0,05$).

Dans les feuilles, la FAE (PI=81,83%, IC₅₀= 21,17±0,2 µg/ml) et la FB (PI=52,71%, IC₅₀= 46,63±0,2 µg/ml) montrent les activités les plus élevées (tableau 13). Toutefois ces résultats restent significativement inférieurs ($p < 0,05$) au contrôle positif (Trolox) qui parvient à inhiber la quasi-totalité des Cations ABTS^{•+} à seulement 5µg /ml (IC₅₀=0,88±0,01µg/ml). Les FDCM et Faq montrent des activités moins importantes, avec toutefois, des pourcentages d'inhibition respectifs de 36,29 et 26% (figure 51).

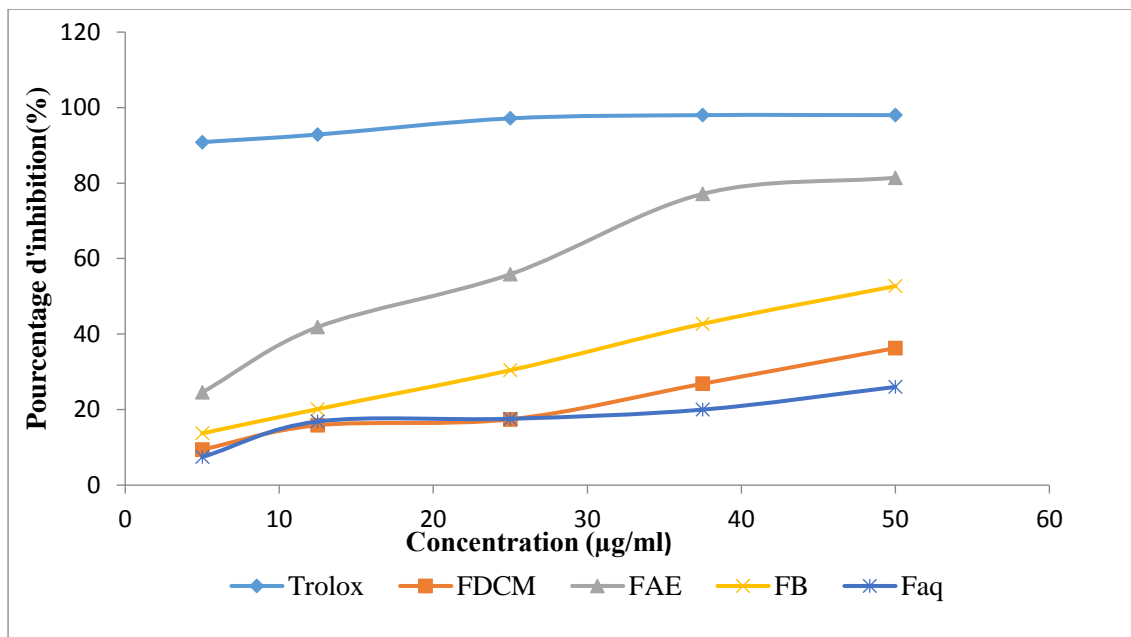


Figure 51 : Pourcentages d'inhibition du radical ABTS^{•+} en fonction des concentrations utilisées pour le Trolox et les fractions des feuilles

Dans le cas des baies (figure 52), les activités sont relativement faibles, puisque aucune fraction ne parvient à dépasser les 50% d'inhibition à une concentration de 50µg/ml. Les FAE et FB montrent les activités les plus intéressantes avec respectivement 29,71 et 36,57% de pourcentage d'inhibition ; en revanche, les FDCM et Faq n'excèdent pas 19% de pourcentage d'inhibition et possèdent ainsi un pouvoir antioxydant assez faible.

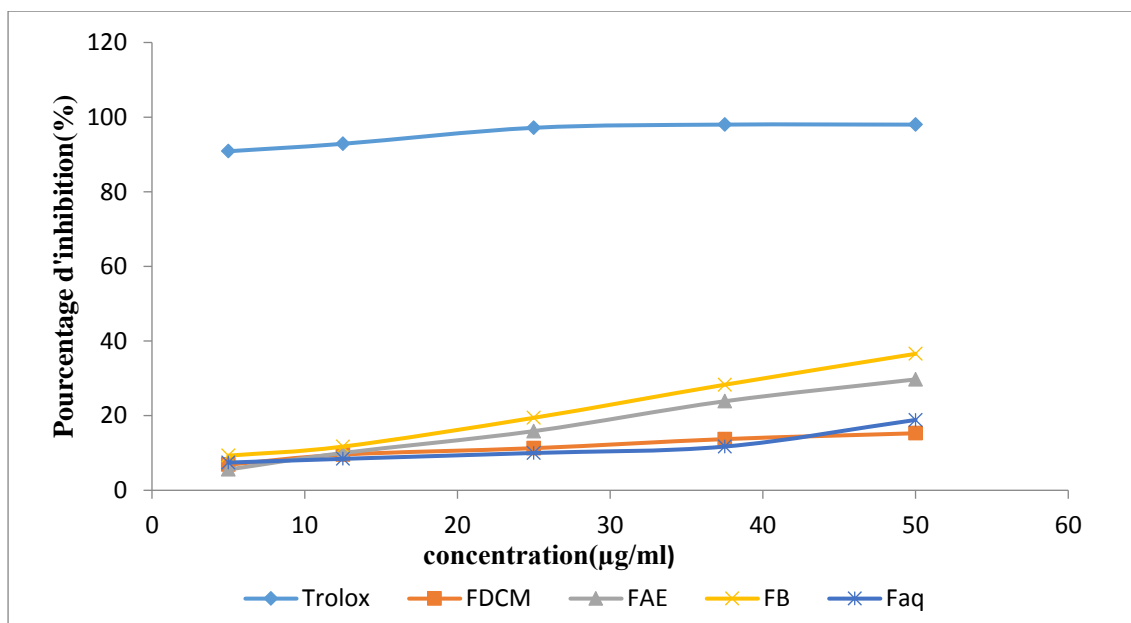


Figure 52 : Pourcentages d'inhibition du radical ABTS^{•+} en fonction des concentrations utilisées pour le Trolox et les fractions des baies

Tableau13 : Activité antioxydante des fractions de feuilles et baies de *Chamaerops humilis*, et, du Trolox avec le radical ABTS

Matériel végétale /Standard	Fractions	ABTS	
		PI (%) à 50µg/ml	IC ₅₀ (µg/ml)
Feuilles	DCM	36,29 ^e	77,20 ^e
	AE	81,43 ^b	21,17 ^b
	B	52,71 ^c	46,63 ^c
	Aq	26,00 ^g	121,4 ^g
Baies	DCM	15,29 ⁱ	240,51 ⁱ
	AE	29,71 ^f	87,09 ^f
	B	36,57 ^d	72,44 ^d
	Aq	18,86 ^h	193,73 ^h
Standard	Trolox	98,12 ^a	0,88 ^a

Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0,05$.

Dans la littérature, l'activité antioxydante de l'extrait brut méthanolique des feuilles de *C. humilis* a été évaluée ; Les auteurs rapportent que cet extrait possède une très forte capacité à piéger les radicaux ABTS^{•+} (IC₅₀=0,035mg/ml). Par ailleurs, ces auteurs associent cette forte activité antioxydante à la présence de composés phénoliques (Miguel *et al.*, 2014). Ces résultats sont relativement en accord avec les nôtres, notamment, en ce qui concerne les fractions les plus actives ; toutefois, quelques différences, dues au fractionnement effectué dans le cadre de notre étude, sont notées.

Par ailleurs, la comparaison de ces résultats avec ceux obtenus à l'aide du test du DPPH nous permet de constater une amélioration de l'activité avec le test ABTS, notamment pour les fractions les plus polaires (FB, et Faq). D'une part, cela peut s'expliquer par une sous-estimation de la capacité antioxydante lors de l'application du test du DPPH ; Ce fait, observé par Kim *et al.* (2002), s'expliquerait par les interférences qui se produiraient à 417 nm. D'autre part, cela s'expliquerait par le fait que l'ABTS^{•+} peut être dissous dans des milieux aqueux et organiques, dans lesquels l'activité antioxydante peut être mesurée, en raison de la nature hydrophile et lipophile des composés présents dans les échantillons. En revanche, le DPPH ne peut être dissout que dans les milieux organiques, en particulier dans le méthanol, ce qui constitue une limitation importante dans l'interprétation du rôle des antioxydants hydrophiles (Wojdyło *et al.*, 2007).

6. Etude des relations entre teneurs en composés phénoliques et activités antioxydantes

Dans cette partie nous avons cherché à établir les relations entre la présence des composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes, tanins, et anthocyanes), et l'activité antioxydante des extraits, par les tests chimiques DPPH, ABTS, et Frap. Le test BBC, qui se base sur une cinétique temporelle, incluant une seule concentration (0,35mg/ml) n'a pas pu être utilisé lors de cette étude.

La figure 53 montre l'analyse en composante principale (ACP), réalisée sur l'ensemble des observations, prenant en compte les deux organes de la plante, ainsi que leurs fractions respectives. Les deux axes principaux (F1 et F2) décrivent 93,4% de la variance totale des observations. On peut ainsi conclure, que les interprétations faites à partir de cette ACP seront donc hautement significatives.

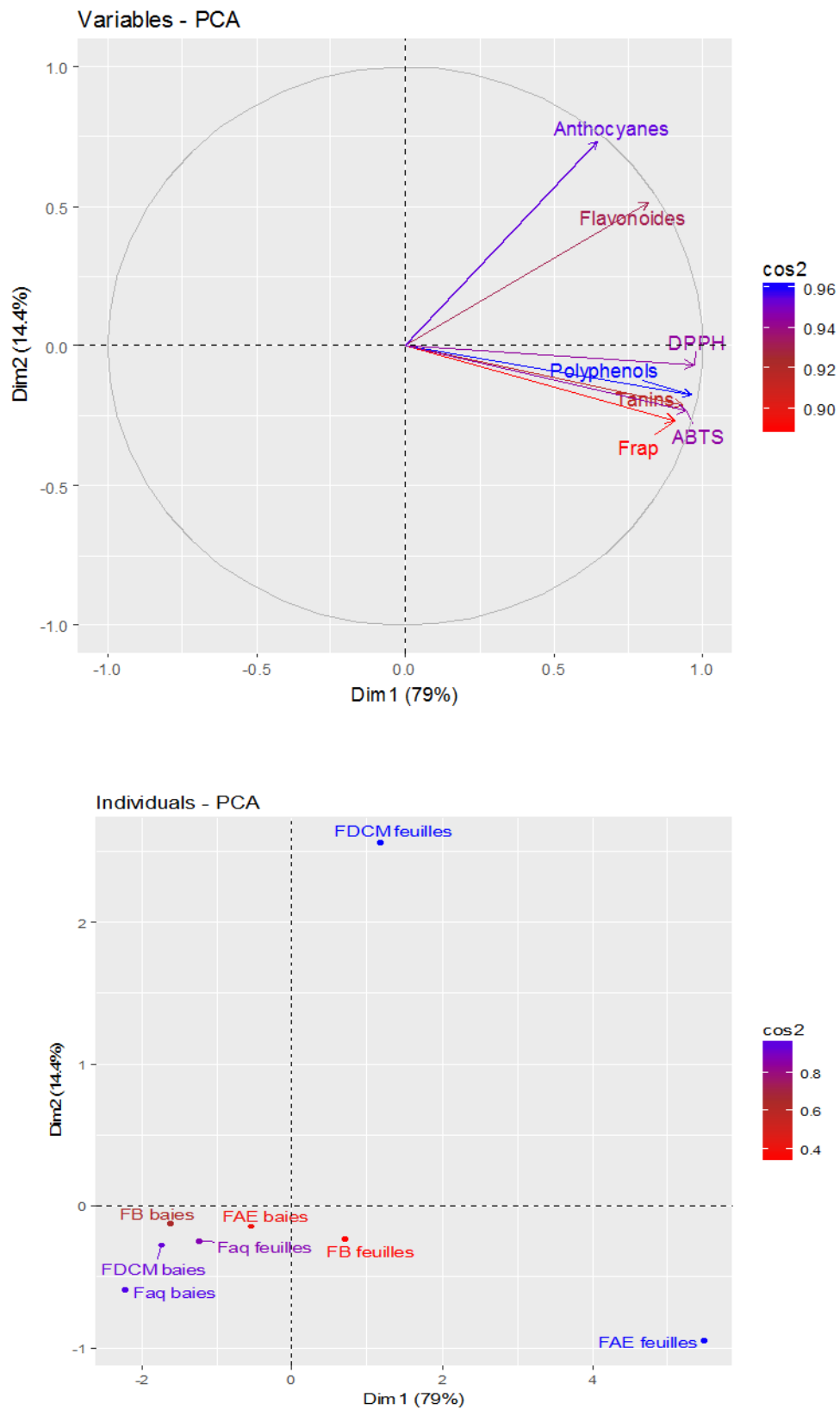


Figure 53 : Analyse en composante principale(ACP)

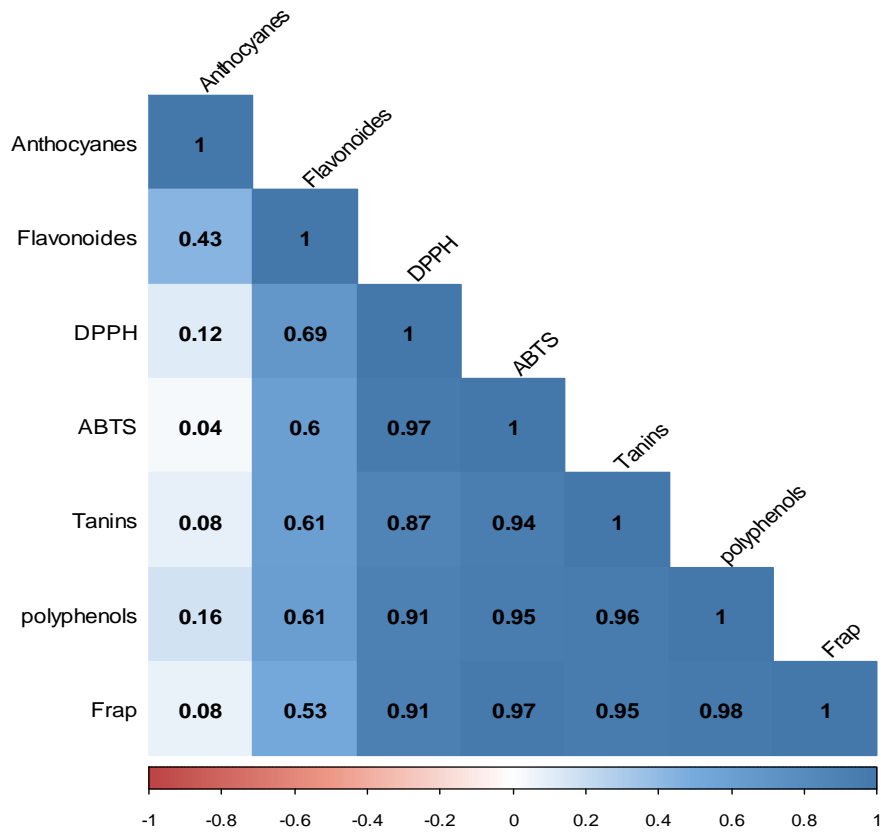


Figure 54 : Matrice des corrélations de Pearson des fractions de feuilles

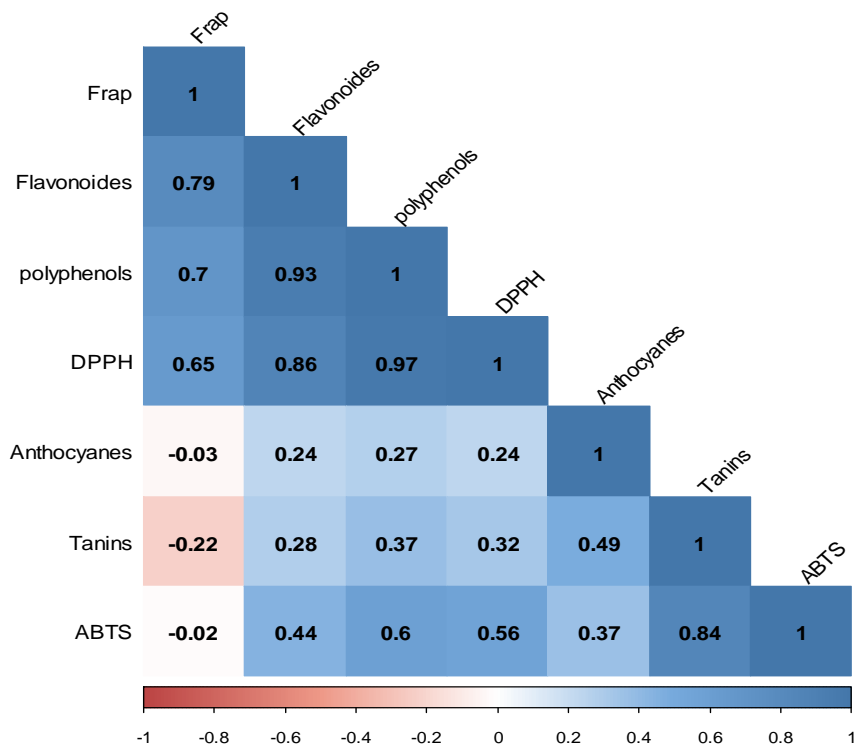


Figure 55 : Matrice des corrélations de Pearson des fractions de baies

L'analyse en composante principale (ACP) a permis de démontrer que les composés (polyphénols/tanins) étaient corrélés de manière significative avec les tests (DPPH/ABTS) et moyennement corrélés avec le test Frap. Les flavonoïdes semblent jouer un rôle intermédiaire dans l'effet antioxydant. Par contre, l'activité antioxydante des extraits n'est pas liée à la présence des anthocyanes, d'autant plus que les coefficients de corrélation de Pearson (figure 54 et 55), utilisé pour mesurer l'intensité de la liaison, donne des corrélations extrêmement faibles avec, au niveau des feuilles, des coefficients de $r=0,12$ ($p=0,61$) pour le test DPPH, de $r=0,04$ ($p=0,88$) pour le test ABTS, et de $r=0,08$ ($p=0,74$) pour le test Frap.

Dans le cas des feuilles, une très bonne corrélation a été établie entre les polyphénols et les tests ABTS, DPPH et Frap avec respectivement des coefficients de corrélations de $r=0,95$ ($p=0,0001$), $r=0,91$ ($p=0,0001$) et $r=0,98$ ($p=0,0001$). Les tanins présentent des tendances quasi similaires à celles de polyphénols ; Les tanins et les tests ABTS, DPPH et Frap montrent des corrélations positives hautement significatives avec respectivement des coefficients de $r=0,94$ ($p=0,0001$), $r=0,87$ ($p=0,0001$) et $r=0,95$ ($p=0,0001$). Cette forte corrélation entre polyphénols totaux/tanins et activité antioxydante montre que l'essentiel de cette activité est majoritairement lié à la présence de ces biomolécules. Quant aux flavonoïdes et les tests ABTS, DPPH et Frap, les corrélations sont positives et présentent des coefficients respectifs de $r=0,6$ ($p=0,004$), $r=0,69$ ($p=0,0008$) et $r=0,53$ ($p=0,01$).

Dans le cas des baies, des corrélations nettement inférieures à celles montrées par les feuilles ont pu être constatées. Nous notons tout de même que les polyphénols et les flavonoïdes ont présenté les relations les plus importantes avec le test DPPH confirmées par des indices de corrélations respectifs de $r=0,97$ ($p=0,0001$) et $r=0,87$ ($p=0,0001$) ; Toutefois, seuls les tanins ont enregistré une forte corrélation avec le test ABTS avec un coefficient de $r=0,84$ ($p=0,0001$).

En ce qui concerne les relations entre les différentes fractions et les trois tests (DPPH/ABTS/Frap), nous constatons que l'activité antioxydante de la fraction FAE des feuilles est toujours la plus élevée ; elle est suivie par celle des FB feuilles et FAE baies qui montrent une activité antioxydante relativement importante. Quant aux FDCM

feuilles et FB baies, elles représentent les extraits à activité moyenne. Enfin, quel que soit le test utilisé, les FDCM baies, Faq feuilles et Faq baies, montrent les capacités antioxydantes les plus faibles.

Ces regroupements de fractions sont justifiés non seulement par leurs teneurs en composés phénoliques mais aussi par leurs structures ; ces dernières ont une influence considérable sur les mécanismes mis en jeu au cours de la neutralisation des radicaux libres.

De nombreuses études indiquent une relation linéaire entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante (Falleh *et al.*, 2008; Zaho *et al.*, 2014 ; Dhingra *et al.*, 2017). Chez *Artemisia herba-alba*, Khlifî *et al.* (2013), trouvent des corrélations positives élevées entre le contenu phénolique total et le dosage DPPH et ABTS ($R^2 = 0,71$ et $R^2 = 0,87$ respectivement). De même, Djeridane *et al.* (2006) suggèrent que 79% de la capacité antioxydante (à l'aide du test ABTS) des plantes médicinales algériennes est due à l'apport de composés phénoliques et de flavonoïdes. En outre, dans certains cas, des effets synergiques ou antagonistes entre les antioxydants contenus dans le mélange peuvent avoir lieu, entraînant ainsi l'augmentation ou la diminution de l'activité antioxydante totale de l'extrait (Reber *et al.*, 2011). En effet, il a été mentionné dans la littérature que, des plantes ayant des concentrations similaires en composés phénoliques, peuvent varier dans leurs activités antioxydantes (Djeridane *et al.*, 2006).

La structure phénolique est un déterminant important du potentiel antioxydant. La configuration des hydroxyles du noyau B est le paramètre structural le plus significatif de l'activité antioxydante des flavonoïdes. L'exigence essentielle pour un piégeage radicalaire efficace est la configuration 3,4-orthodihydroxy dans le cycle B et le groupe 4-carbonyle dans le cycle C. La présence du groupe 3-OH ou des groupes 3- et 5-OH, donnant une structure analogue à celle des catéchols, est également bénéfique pour l'activité antioxydante des flavonoïdes (Wojdyło *et al.*, 2007). Ces éléments pourraient en partie expliquer les fortes activités antioxydantes obtenues avec nos extraits, notamment, la présence de fortes teneurs en composés phénoliques non glycosylés comme l'acide tannique, la naringine et la quercétine. En effet, selon Marfak (2003) et Sokol-Letowska *et al.* (2007), les flavonoïdes glycosylés ont une activité antioxydante inférieure à celle des flavonoïdes non glycosylés. Par exemple la rutine a une activité antioxydante dix fois

plus faible que celle de la quercétine ; ceci serait lié aux différences rencontrées dans leurs structures chimiques.

D'autres hypothèses sont avancées pour expliquer les interactions entre les antioxydants ; elles comprennent les vitesses de réaction des antioxydants, la polarité des molécules interagissant entre elles et la concentration efficace des antioxydants au niveau du site d'oxydation (Reber et *al.*, 2011).

7. Résultats de l'activité antibactérienne

7.1 Technique de diffusion en milieu gélosé

Les diamètres d'inhibitions relatifs aux activités antibactériennes obtenues à des concentrations en fraction de 10, 20 et 30mg/ml sont repris ci-dessous (tableaux 14-17). Les résultats obtenus ont indiqué l'existence de composés antibactériens dans la majorité des fractions testés (à l'exception de la Faq des baies). L'analyse des données expérimentales montre une augmentation de la grandeur des halos autour des disques formés par les microorganismes détruits au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente. Ainsi, nos résultats montrent que les extraits sont actifs à divers degrés et manifestent une activité antibactérienne en inhibant la croissance *in-vitro* des germes bactériens selon une relation dose-réponse.

L'analyse de l'activité antibactérienne des fractions des feuilles montre que la FAE est la fraction la plus inhibitrice, notamment, contre *E. faecalis*, *K. pneumonia* et *P. aeruginosa* ; les diamètres, observés à une concentration de l'ordre de 30 mg/ml, étant de $25,33 \pm 1,5$ mm, 25 ± 1 mm et $21,67 \pm 1,5$ mm respectivement pour *E. faecalis*, *K. pneumonia* et *P. aeruginosa*. Ces résultats sont moindres par rapport à ceux obtenus avec l'antibiotique *Imipénem* (tableau 14), très actif uniquement envers *E.coli*, *P. aeruginosa* et *E. faecalis* avec respectivement des zones d'inhibition de $29,67 \pm 0,6$ mm, $41,33 \pm 0,6$ mm et $43,33 \pm 1,5$ mm.

Nous constatons également que la FB montre une très bonne activité vis-à-vis de *P. aeruginosa* ($22,67 \pm 1,5$ mm) et *E. faecalis* ($22,67 \pm 0,6$ mm).

Enfin la FDCM et la Faq ont manifesté des activités antibactériennes appréciables à modérées, notamment, vis-à-vis de *K. pneumonia*.

2ème Partie : Partie expérimentale

En ce qui concerne les fractions des baies, la FAE s'est révélée la plus prometteuse en raison de sa capacité inhibitrice élevée contre *P. aeruginosa* (28,67±1,5mm), *E. faecalis* (26,67±1,5mm) et *E. coli* (20,67±1,1mm).

La FB a montré un effet antibactérien intéressant vis-à-vis de *S. typhimurium* (15,33±0,6mm) et faible envers les autres bactéries. Quant à la FDCM, son activité était principalement obtenue sur les bactéries à gram positif avec des diamètres de 14,33±0,6mm vis-à-vis de *S. aureus* et *E. faecalis*.

Tableau 14 : zone d'inhibition (mm) des contrôles positif et négatif obtenue sur les diverses souches bactériennes.

		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>K. pneumonia</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
Control(+) Control(-)	Imipenem (10µg)	29,67±0,6	41,33±0,6	-	-	-	43,33±1,5
	DMSO (5%)	-	-	-	-	-	-

Tableau 15 : zone d'inhibition (mm) des fractions de *Chamaerops humilis* obtenue à une concentration de 10 mg sur diverses souches bactériennes.

		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>K. pneumonia</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
Feuilles	FDCM	-	6±00	9,33±0,5	10±00	-	-
	FAE	9±3,46	11,33±0,6	12,1±0,6	17,33±1,1	8±1	14,67±0,6
	FB	-	11,33±1,5	-	8,67±0,6	-	11,33±0,6
	Faq	10,67±1,1	10,33±0,6	11,33±0,6	9,67±0,6	-	9,67±0,6
Baies	FDCM	7±1	6±00	-	-	7,33±0,6	11±1
	FAE	13,33±0,6	12,67±1,5	7±00	7,67±0,6	9,33±0,6	14±1
	FB	8±1	7,33±2	12±1	-	8±1	8±1
	Faq	-	-	-	-	-	-

(-) aucune zone d'inhibition de croissance observée.

FDCM, Fraction dichlorométhane ; FAE, Fraction acétate d'éthyle ; FB, Fraction butanol ; Faq, Fraction aqueuse.

Tableau 16 : zone d'inhibition (mm) des fractions de *Chamaerops humilis* obtenue à une concentration de 20 mg sur diverses souches bactériennes.

		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>K. pneumonia</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
Feuilles	FDCM	-	8,33±0,6	10±00	11,33±0,2	-	-
	FAE	13,33±0,6	18,33±0,7	15±1	20±1	14,33±0,6	16,33±0,6
	FB	11,33±0,3	11,66±0,5	-	13,33±0,6	12,66±0,6	15±1
	Faq	11,66±1	13,66±0,6	11,66±0,6	12,33±0,3	11±1	13±1
Baies	FDCM	7,66 ±0,5	7,33 ±0,5	7 ±0,5	-	9,33±1	13±00
	FAE	17,33±1	21±1	11,33±0,5	10,66±00	14,33±0,5	19,33±0,5
	FB	10,33±1	7,33±0,5	12,66±00	-	9,33±1	9,66±0,5
	Faq	-	-	-	-	-	-

Tableau 17 : zone d'inhibition (mm) des fractions de *Chamaerops humilis* obtenue à une concentration de 30 mg sur diverses souches bactériennes.

		<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.typhimurium</i>	<i>K.pneumonia</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.faecalis</i>
Feuilles	FDCM	6,67±0,6	10,67±0,6	11,33±0,6	12±0	8±00	7,33±0,6
	FAE	15,67±0,6	21,67±1,5	16,67±0,6	25±1	19,67±1,1	25,33±1,5
	FB	18,33±0,6	22,67±1,5	-	16,33±0,6	17,33±0,6	22,67±0,6
	Faq	13,67±0,6	16,67±1,1	14,33±0,6	15,67±1,5	15,33±0,6	16,67±0,6
Baies	FDCM	10,33±1,1	10±1	9,67±0,6	7±00	14,33±0,6	14,33±0,6
	FAE	20,67±1,1	28,67±1,5	14±00	15±00	16,33±0,6	26,67±1,5
	FB	13±1	7,67±0,6	15,33±0,6	8±1	10±1	10,67±0,6
	Faq	-	-	-	-	-	-

La figure 56 montre les différences entre les moyennes de zones d'inhibitions obtenues sur les souches bactériennes testées. D'après les résultats, on constate que quel que soit la nature de la fraction et de sa concentration, la souche *S. typhimurium* (gram négatif) possède la moins forte sensibilité. Cette résistance observée pour *S. typhimurium* peut être liée au fait que cette souche est connue pour acquérir facilement des résistances par mutation vis-à-vis de diverses classes d'antibiotiques. Les plasmides sont associés à la capacité de conférer une résistance antibactérienne chez les bactéries. En effet, la majorité des gènes médiateurs de résistances aux antibiotiques sont localisés sur le plasmide (Ravikumar *et al.*, 2007).

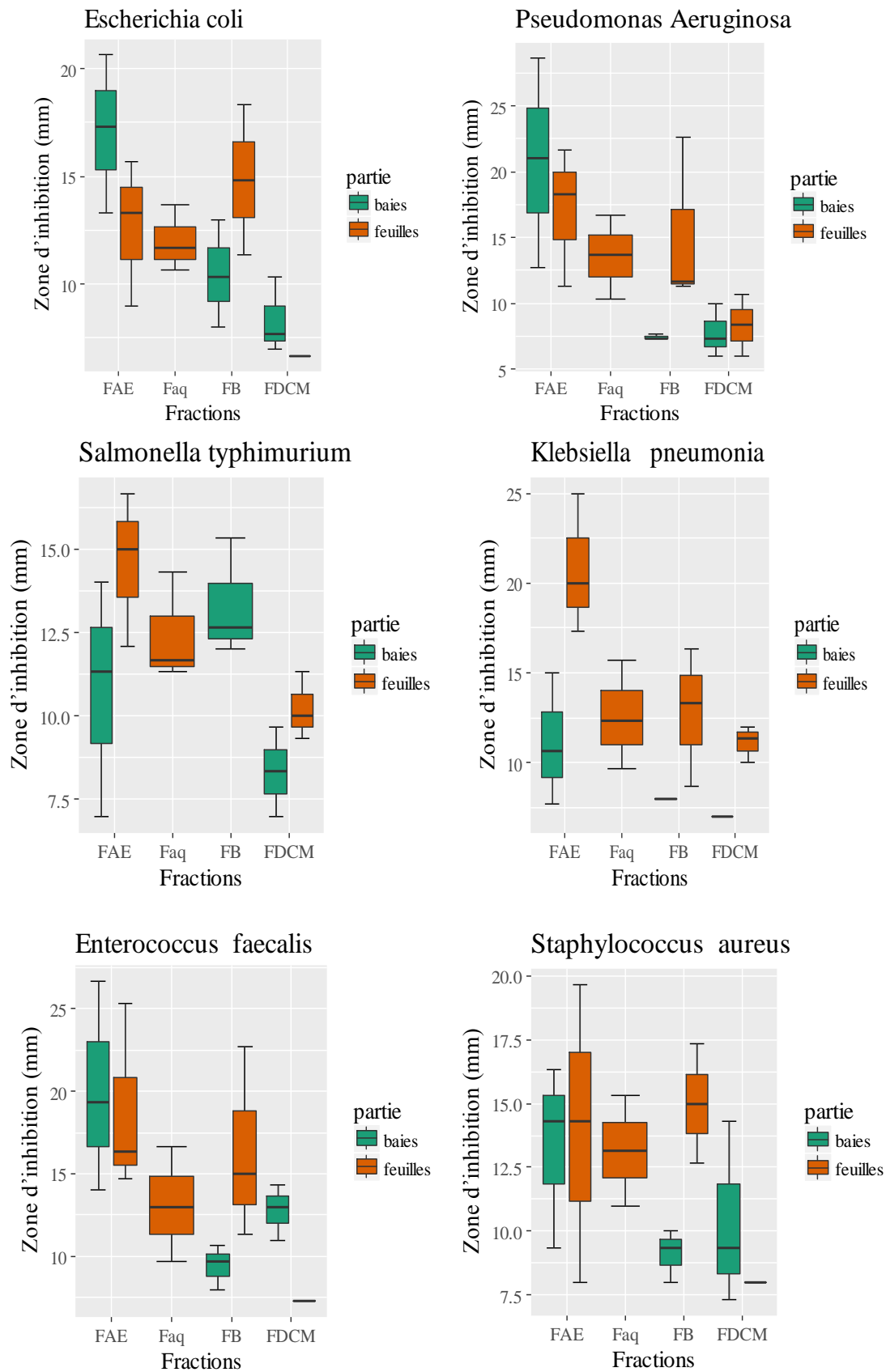


Figure 56 : Boîtes à moustaches comparant les moyennes des zones d'inhibitions des fractions obtenues pour les souches bactériennes testées

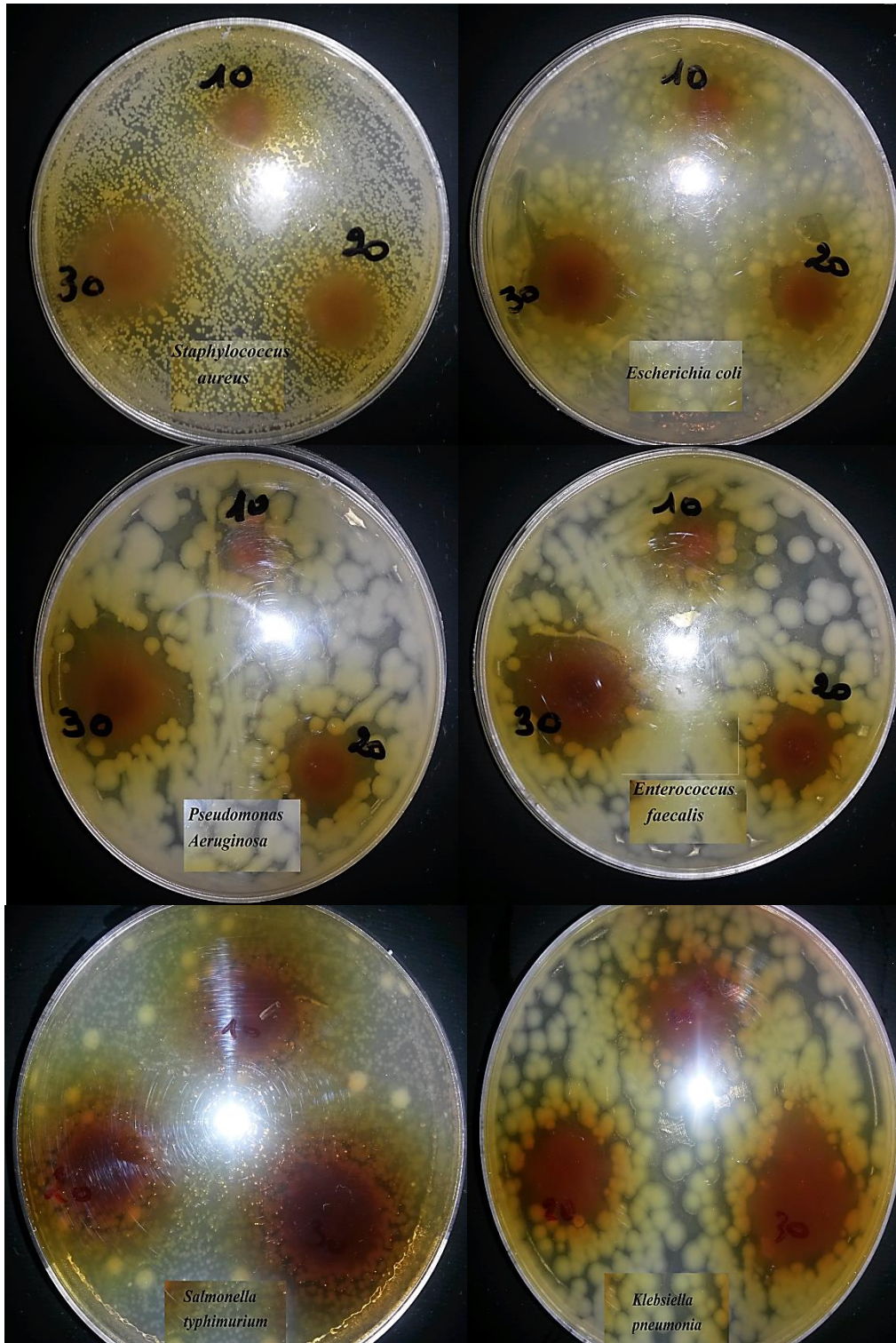


Figure 57 : Activité antibactérienne de la fraction acétate d'éthyle des feuilles de *Chamaerops humilis*

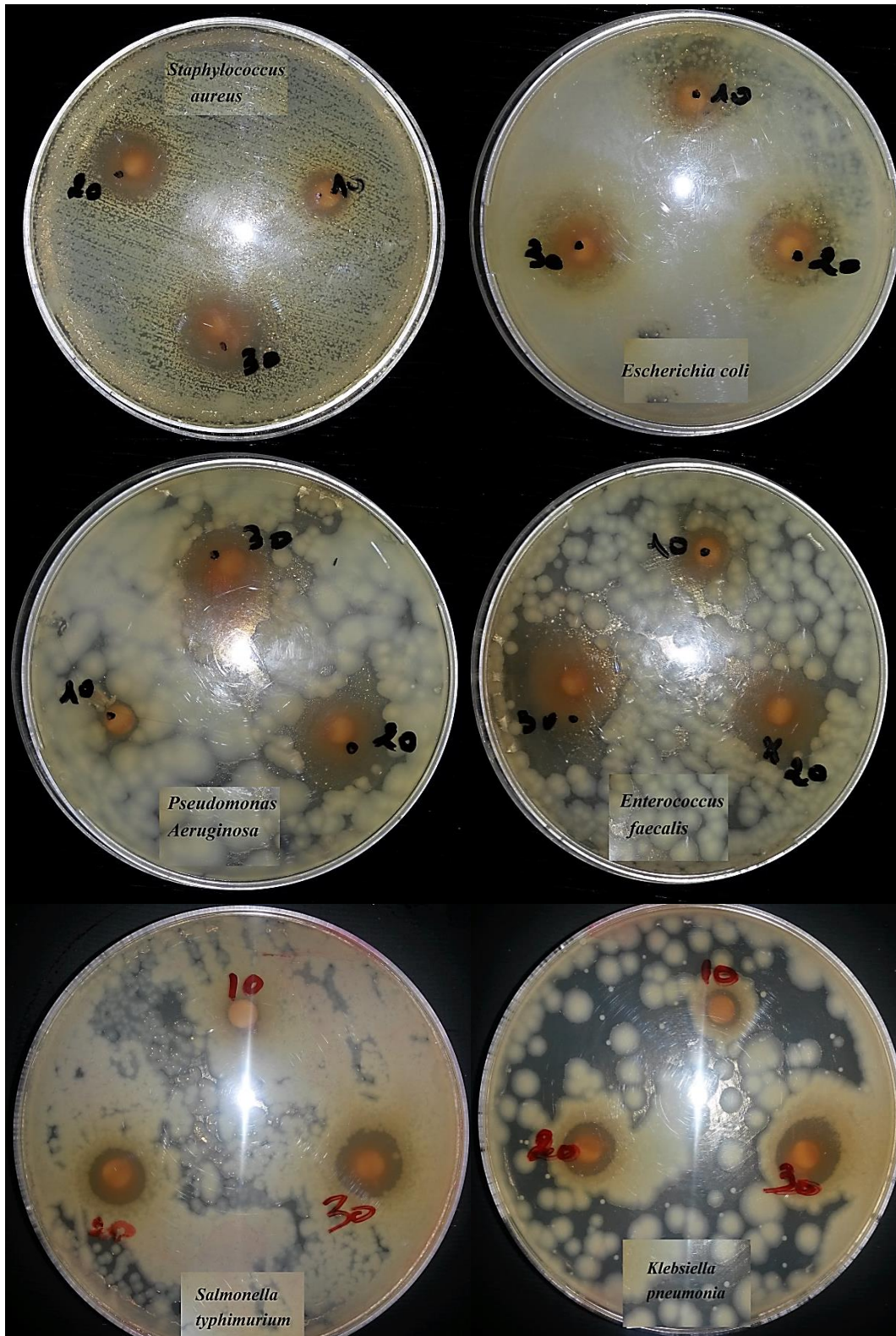


Figure 58 : Activité antibactérienne de la fraction acétate d'éthyle des baies de *Chamaerops humilis*

La figure 59 montre la distinction entre les activités antibactériennes obtenues sur les bactéries à Gram + et à Gram -, en tenant compte des fractions actives et leurs trois concentrations testées. Il semble difficile de corrélér l'activité d'un extrait à un type de bactéries, car les réponses observées varient suivant les fractions et les micro-organismes. Nous notons que pour les fractions les plus actives (fraction acétate d'éthyle), la FAE des feuilles semble plus active contre les bactéries à Gram positif, du fait que son inhibition maximale est obtenue contre *E. faecalis* (Gram+), en revanche, la FAE des baies est plus active vis-à-vis des Gram négatif, avec une inhibition maximale obtenue contre *P. aeruginosa* (Gram-).

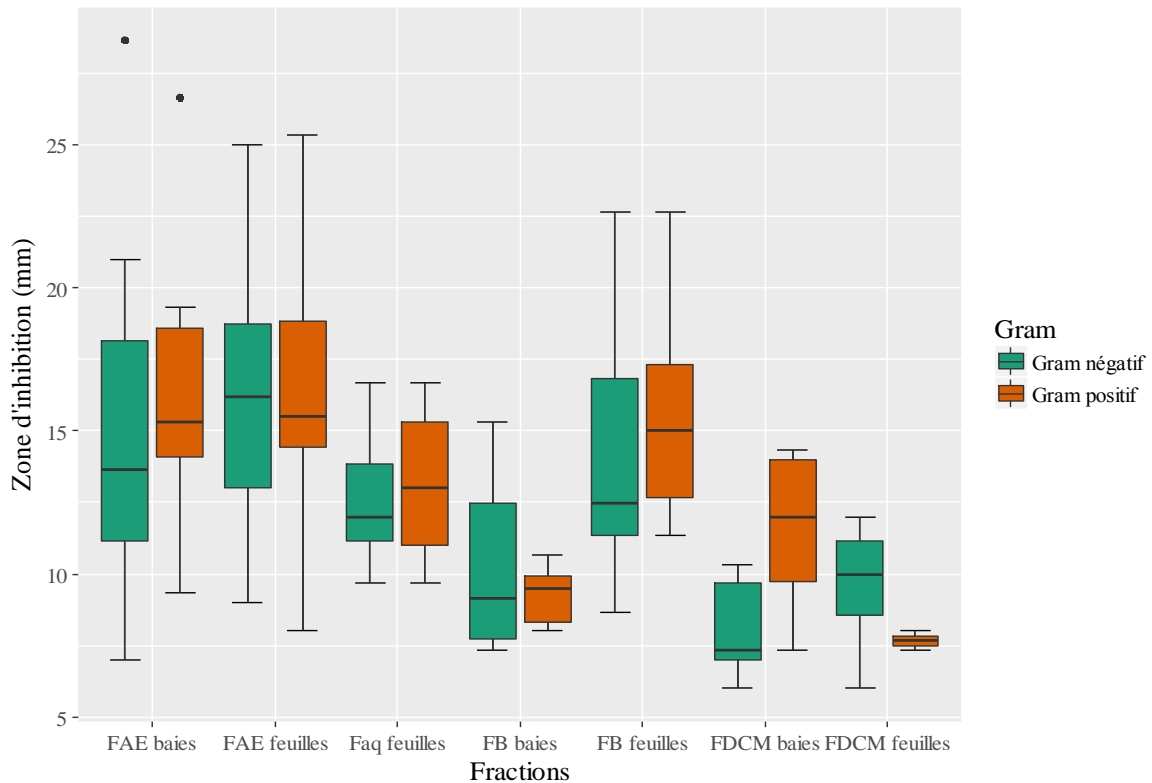


Figure 59 : Boîtes à moustaches comparant l'effet antibactérien des extraits sur les bactéries à Gram+ et à Gram- (Diffusion en milieu gélosé).

Il est généralement admis que les bactéries à Gram positif sont beaucoup plus sensibles par rapport aux bactéries à Gram négatif ; Ceci est dû aux différentes structures de la paroi cellulaire des bactéries. En effet, les bactéries à Gram positif sont constituées d'une paroi épaisse de peptidoglycane (muréine) associée à des quantités moindres d'autres polymères tels que des acides teichoïques. En revanche, les bactéries à Gram négatif sont caractérisées par une paroi de peptidoglycane beaucoup plus fine mais celle-

ci est recouverte d'une membrane externe dans laquelle peuvent s'insérer des liposaccharides et des lipoprotéines (Michel, 2011). La paroi bactérienne constitue une surface d'échange avec l'extérieur. Le peptidoglycane est poreux et laisse passer de nombreuses substances ce qui n'est pas le cas de la membrane externe des bactéries à Gram négatif qui s'oppose, notamment, à la pénétration des antibiotiques hydrophobes. Par conséquent, il en résulte une résistance plus importante des souches à Gram négatif contre l'activité de nos extraits végétaux (Abedini, 2013).

En conclusion à cette étude préliminaire, nous avons réalisé une Classification Ascendante Hiérarchique (CAH), en tenant compte des pourcentages d'inhibitions moyens ; ceci a permis de regrouper les fractions en quatre groupes distincts (figure 60) : Le premier groupe comprend les deux fractions acétate d'éthyle qui constituent le groupe le plus actif vis-à-vis des bactéries. Le deuxième groupe est constitué par la FB feuilles ; ces dernières auraient des effets pouvant être qualifiés de modérés. Dans le troisième groupe sont rassemblées la FB baies, la FDCM baies, la FDCM feuilles et la Faq feuilles ; cet ensemble possède des effets faibles. Le quatrième groupe est constitué de la Faq des baies ; cette dernière n'a démontré aucune activité contre les souches bactériennes testées.

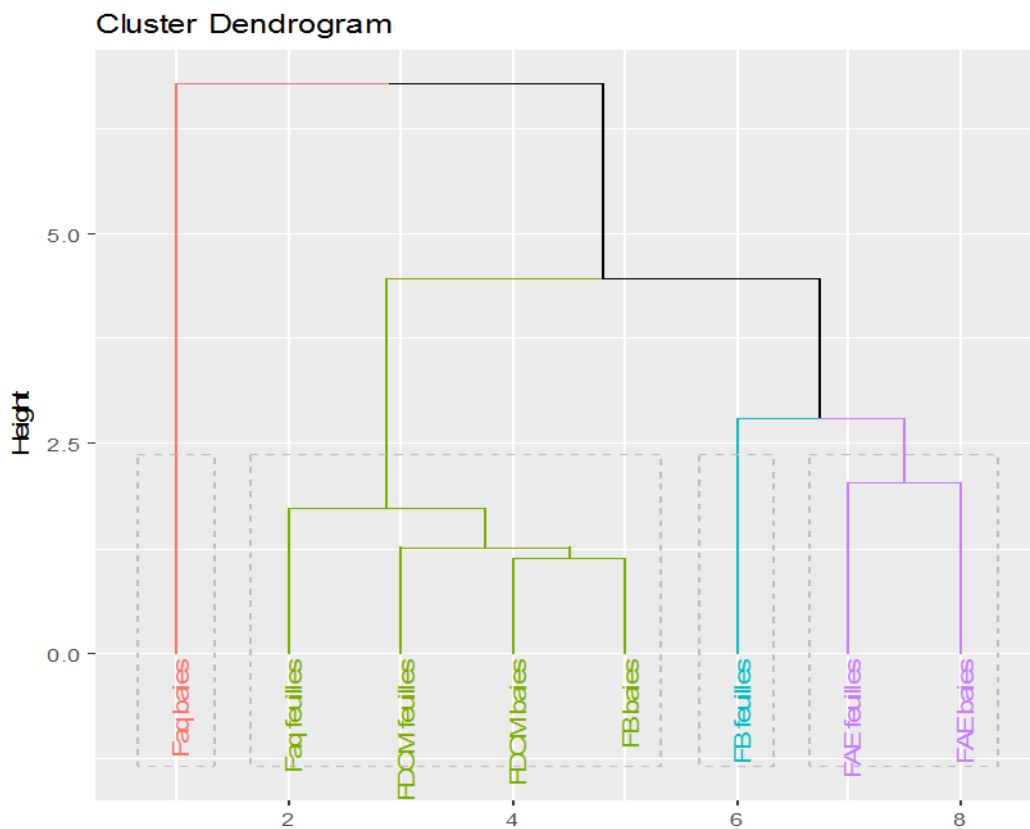


Figure 60 : Classification hiérarchiques des fractions des *Chamaerops humilis* réalisé à partir des pourcentages d'inhibitions moyens sur les différentes souches bactériennes (Diffusion en milieu gélosé).

7.2 Technique de dilution en milieu liquide (CMI)

La détermination des concentrations minimales inhibitrices des 8 fractions a été effectuée grâce à la méthode de dilution en série en milieu liquide. Les résultats consignés dans le Tableau 18, confirment, plus au moins, les résultats obtenus à l'aide de la technique de diffusion en milieu gélosé. L'activité antibactérienne était principalement concentrée dans les fractions acétate d'éthyle. Ceci tend à indiquer que la polarité des composés phénoliques semble être un facteur majeur dans l'effet antibactérien autant que la concentration ou la structure.

L'activité antibactérienne d'un composé pure est considérée comme significative lorsque la CMI est inférieur à 64 µg/ml, modérée lorsqu'elle se situe entre 64 et 500 µg/ml et faible lorsqu'elle dépasse 500 µg/ml (Yasunaka *et al.*, 2005). Cependant, le fait que nos extraits ne soient pas purifiés ; cette norme ne peut être appliquée lors de cette étude.

Tableau 18 : concentrations minimales inhibitrices (CMI) des fractions de *Chamaerops humilis*

		Concentration minimale inhibitrice (mg/ml)					
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>K. pneumonia</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
Feuilles	FDCM	2	4	16	8	16	2
	FAE	2	0,5	4	2	2	0,25
	FB	16	8	8	8	8	4
	Faq	>32	>32	>32	>32	>32	>32
Baies							
	FDCM	8	4	8	4	4	4
	FAE	4	2	0,5	1	2	1
	FB	8	8	4	4	4	4
	Faq	>32	>32	>32	>32	>32	>32

La FAE des feuilles a montré des concentrations minimales inhibitrices comprises entre 0,25 et 4 mg/ml. Les souches *P. aeruginosa* (CMI=0,5mg/ml) et *E. faecalis* (CMI=0,25mg/ml) possèdent les plus fortes sensibilités vis-à-vis de cette fraction. En ce qui concerne la FAE des baies, les meilleurs résultats ont été obtenus avec *S. typhimurium*, *K. pneumonia* et *E. faecalis* avec respectivement des CMI de 0,5 mg/ml, 1 mg/ml et 1 mg/ml.

Les FDCM et FB ont montré des activités modérées à faibles avec une gamme de CMI allant de 2 à 16 mg/ml. Enfin la Faq des feuilles qui présentait des résultats modérés, avec l'application de la technique de diffusion en milieu gélosé, notamment en exhibant des activités antibactériennes contre toutes les souches testées à 20 et 30 mg, présente une CMI >32 mg/ml.

Selon Hammer *et al.* (2009) la détermination des effets antibactériens des extraits de plantes par dilution en milieu liquide présenterait beaucoup plus d'avantages que la méthode de diffusion en milieu gélosé. Cette dernière est limitée à, seulement, la production de données quantitatives préliminaires, car le caractère hydrophobe de la plupart des huiles essentielles et des composants d'extraits végétaux empêche leur diffusion uniforme dans le milieu gélosé. Ces conclusions ont été confirmées dans la présente étude pour les fractions apolaires (FDCM). Cependant aucune explication précise n'a pu être apportée vis-à-vis de l'absence d'activité des fractions polaires (Faq des feuilles) par la méthode de dilution en milieu liquide. Ce phénomène pourrait être lié à l'expression des résultats de ce test (dilution en milieu liquide) qui se base uniquement sur une visualisation à l'œil nu. En effet les turbidités observées peuvent être attribuées à une propriété non miscible des biomolécules présentes dans cette fraction, plutôt qu'à une prolifération bactérienne.

De nombreuses plantes ont été étudiées pour d'éventuelles applications médicales et il a été démontré qu'un grand nombre de produits végétaux inhibent la croissance des bactéries pathogènes (Al Akeel *et al.*, 2014). Cowan *et al.* (1999) rapportent que plusieurs classes de polyphénols comme les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins servent de mécanismes de défense des plantes contre les micro-organismes pathogènes, les insectes et les herbivores.

L'action inhibitrice des polyphénols sur la croissance bactérienne est rapportée dans plusieurs études récentes démontrant que ces molécules sont douées d'un pouvoir antibactérien important sur les différentes souches bactériennes à gram positif et négatif (Martins *et al.*, 2013; Al Akeel *et al.*, 2015 ; Kumar *et al.*, 2017 ; Olivier *et al.*, 2017). Il a également été rapporté que ces composés étaient capables, face à une infection bactérienne, de renforcer les défenses naturelles du corps par stimulation du système immunitaire.

Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe ; Parmi les hypothèses avancées, il faut citer, l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes et la perturbation des membranes bactériennes (Hadi, 2004 ; Nakayama *et al.*, 2006). Selon Domenico *et al.* (2005), cet effet serait principalement dû à une altération des fractions lipidiques de la membrane plasmique des micro-organismes qui entraîne une perturbation de la perméabilité de la membrane et la perte des organites intracellulaires. La perturbation des membranes est un mécanisme d'action de plus en plus ciblé par les chercheurs pour le développement de nouveaux antimicrobiens du fait qu'il soit moins sujet aux phénomènes de résistance (Epanand et Epanand, 2011).

De ce fait, l'activité antibactérienne de la FAE des feuilles peut s'expliquer par un phénomène de concentration des composés phénoliques et notamment de tanins condensés dans cette fraction. A contrario, l'activité de la FAE des baies qui contient jusqu'à cinq fois moins de composés phénoliques que la FAE des feuilles ne peut être expliquée par ce phénomène. Une autre hypothèse suggérerait la présence d'autres molécules non polyphénoliques, telles que les mucilages, les composés réducteurs et les terpènes (comme le carotène), qui seraient solubilisées par cette fraction et qui agiraient aussi sur les mécanismes antibactériens.

Par ailleurs, la prédominance de l'acide tannique dans les fractions les plus actives pourrait être à l'origine des activités antibactériennes observées. L'acide tannique peut agir comme un sidérophore pour chélater le fer du milieu et le rendre indisponible pour les micro-organismes. Les micro-organismes qui se développent dans des conditions aérobies ont besoin de fer pour une variété de fonctions, y compris la réduction du précurseur ribonucléotidique de l'ADN, la formation de l'hémoglobine et d'autres fonctions essentielles (Chung *et al.*, 1998).

Chung *et al.* (1998) ont également rapporté que l'acide tannique inhibait la croissance d'une quinzaine de bactéries testées, alors que l'acide gallique et l'acide ellagique n'inhibait aucun d'entre eux. Ils ont conclu que le lien ester entre l'acide gallique et le glucose (pour former l'acide tannique) était important pour le potentiel antimicrobien de ces composés. Cependant, il est difficile d'attribuer l'activité d'un mélange complexe à un constituant unique ou particulier. Des composés majeurs ou à l'état de traces peuvent

donner naissance à l'activité antimicrobienne (Lopes-Lutz *et al.*, 2008). Différents composés bioactifs d'un mélange peuvent interagir pour produire un effet combiné semblable à la somme des effets des différents composants (additifs) ou les combinaisons de composés bioactifs peuvent produire des effets supérieurs à la somme des différents composants (synergiques) (Ginsburg et Deharo, 2011). Toutefois, l'effet antagoniste possible des composés dans l'extrait devrait également être pris en compte (Lopes-Lutz *et al.*, 2008).

Conclusion et perspectives

Notre étude s'est focalisée sur la composition qualitative et quantitative en composés phénoliques d'une espèce de palmier : *C. humilis*, utilisée dans la pharmacopée traditionnelle pour le traitement de plusieurs pathologies et en particulier les spasmes et les troubles gastro-intestinaux.

Les résultats de l'étude de cette plante médicinale, jusqu'à ce jour très peu connue scientifiquement, ont montré que les feuilles et les baies avaient un potentiel antibactérien et antioxydant intéressant.

Le fractionnement des extraits bruts par des solvants à polarités différentes et l'analyse colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible) a démontré que l'acétate d'éthyle permettait de concentrer une quantité plus importante de polyphénols, de flavonoïdes et de proanthocyanidines.

L'analyse par CLHP des extraits des feuilles et des baies a montré une disparité qualitative et quantitative entre les feuilles et les baies ; le même constat a été obtenu en comparant les fractions entre elles. Les composés phénoliques majoritairement présents sont l'acide tannique, naringine, l'acide vanillique, l'acide p-coumarique et la quercétine.

L'évaluation de l'activité anti-oxydante, effectuée à partir des différents extraits obtenus à partir des deux parties de la plante, a montré une bonne activité antioxydante des extraits acétate d'éthyle ; ceci est justifié par la présence des composés phénoliques, réputés comme d'excellents agents antioxydants. De plus la structure chimique et la polarité des antioxydants semble être déterminantes pour leur capacité à piéger les radicaux libres.

Par ailleurs, l'activité antibactérienne ciblant différentes souches bactériennes gram + et gram- a été mise en évidence, principalement, dans les fractions acétate d'éthyle. Ces deux fractions ont présenté des activités antibactériennes élevées vis-à-vis de toutes les souches testées. En particulier, une activité plus prononcée a été retrouvée envers *E. faecalis* et *S. typhimurium*. Cette activité a été corrélée à la présence de composés phénoliques mais probablement à celles d'autres biomolécules qui agissent en synergie contre les bactéries.

Les résultats obtenus sont très prometteurs et valident scientifiquement l'usage traditionnel de cette plante médicinale. Cependant d'autres études sont nécessaires pour compléter la caractérisation chimique et biologique de cette espèce.

- ✚ Il serait intéressant de poursuivre l'évaluation des activités biologiques des composés majoritaires sur d'autres souches bactériennes et d'autres lignées cellulaires et éventuellement de déterminer leur mécanisme d'action.

- ✚ Il serait opportun de réaliser des tests *in vivo* afin d'apprécier l'activité réelle de ces molécules et de comprendre leur mécanisme d'action.

- ✚ il serait intéressant d'isoler, de purifier et de caractériser les composés phénoliques par RMN (résonance magnétique nucléaire), spectrométrie de masse et d'établir les études de la relation structure-activité des molécules actives

- ✚ Enfin, il serait intéressant d'élargir le panel des activités biologiques à étudier, notamment en évaluant les activités anti-inflammatoires, anti-cancéreuses et antivirales de nos extraits.

Références bibliographiques



- Abedini A.** (2013). Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes. Thèse de doctorat. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II. Disponible sur : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01016507/document>.
- Abreu, I.A. and D.E. Cabelli** (2010). "Superoxide dismutases--a review of the metal associated mechanistic variations." *Biochim Biophys Acta* 1804: 263-274.
- Al Akeel R, Al-Sheikh Y, Mateen A, Syed R, Janardhan K, Gupta VC.** 2014. Evaluation of antibacterial activity of crude protein extracts from seeds of six different medical plants against standard bacterial strains. *Saudi Journal of Biological Sciences* 21, 147–151.
- Anstett, M.-C.** (1999). An experimental study of the interaction between the dwarf palm (*Chamaerops humilis*) and its floral visitor *Derelomus chamaeropsis* throughout the life cycle of the weevil. *Acta Oecologica*, 20, 551–558.
- Arvouet-Grand A, Vennat B, Pourrat A, Legret P.** 1994. Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. *Journal de pharmacie de Belgique* 49, 462–468.

B

- Balasundram N, Sundram K, Sammar S.** (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by- products. Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chem.* 1 .191–203.
- Bartnick, D.D., Mohler, C.M., Houlihan, M.,** 2006. Methods for the production of food grade extracts. United States Patent Application. 20060088627.
- Baudin B.** (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *MT Cardio.* 2(1) :43-52
- Belkheiri Nadji** (2010). Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes. Thèse de doctorat. Sciences de la Matière. Université Toulouse III - Paul Sabatier. Disponible sur : <http://thesesups.ups-tlse.fr/961/>
- Bengag A.** (2009).Caractérisation phytochimique et activité antioxydante de quelques cultivars de *Phoenix dactylifera* L. thèse de magistère. université d'Oran.
- Benhammou N, Bekkara FA, Panovska TK.** 2009. Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *Comptes Rendus Chimie* 12, 1259-66.<http://dx.doi.org/10.1016/j.crci.2009.02.004>
- Benmehdi H, Hasnaoui O, Benali O, Salhi F.**2012. Phytochemical investigation of leaves and fruits extracts of *Chamaerops humilis* L. *Journal of Materials and Environmental Science* 3(2), 320-237.
- Blois MS.** 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199–1200.
- Bouterfas K, Mehdadi Z, Elaoufi MM, Latreche A, Benchiha W.** 2016. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoids content variations of leaves extracts of white Horehound (*Marrubium vulgare* Linné) from three geographical origins. *Annales Pharmaceutiques Françaises.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharma.2016.07.002>

- Brigelius-Flohe, R. and A. Kipp** (2009). "Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis." *Biochim Biophys Acta* 1790: 1555-1568.
- Brito A, Areche C, Sepúlveda B, Kennelly EJ, Simirgiotis MJ.** 2014. Anthocyanin characterization, total phenolic quantification and antioxidant features of some Chilean edible berry extracts. *Molecules*. 19(8):10936-10955. doi:10.3390/molecules190810936
- Brown, J. E., Khodr, H., Hider, R. C., & Rice-Evans, C. A.** (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal*, 330 (Pt 3), 1173–1178.
- Bruneton, J.**, 1999. Pharmacognosie -Phytochimie, Plantes Médicinales, 3ème édition, (Ed.) Tec et Doc Lavoisier, p 1120.
- Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R.**, 2000. American Society of Plant Physiologists, chapitre 24, pp 1250-1318.
- Burns, J., P. T. Gardner, D. Matthews, G. G. Duthie, M. E. J. Lean et A. Crozier** (2001). "Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(12): 5797-5808.

C

- Cannes do Nascimento, N., Fett-Neto, A.G.**, 2010. Plant secondary metabolism and challenges in modifying its operation: an overview. In: Fett-Neto, A.G. (Ed.), *Plant Secondary Metabolism*.
- Celiktas OY, Kocabas EEH, Bedir E, Sukan FV, Ozek T, Baser KHC.** 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem*; 100 (2): 553-559. Doi: 10.1016/j.foodchem.2005.10.011
- Chan KW, Iqbal S, Khong NMH, Ooi DJ, Ismail M.** 2014. Antioxidant activity of phenolics-saponins rich fraction prepared from defatted kenaf seed meal. *LWT – Food Sci Technol*; 56 (1):181-186. doi:10.1016/j.lwt.2013.10.028
- Chebil, L.**, 2006. Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Chew YL, Lim YY, Omar M, Khoo KS.**(2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT-Food Sci Technol.*; 41(6) : 1067-1072. doi:10.1016/j.lwt.2007.06.013
- Chung, K.-T., Lu, Z. & Chou, M. W.** (1998). Mechanism of Growth inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food and Chemical Toxicology* 36, 1053–60
- CLSI.** 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement. CLSI document M100- S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- Coelho JP, Veiga JG, Elvas-Leitao R, Brigas AF, Dias AM, Oliveira MC.** (2017). Composition and *in vitro* antioxidants activity of *Chamaerops humilis* L. In: 2017 IEEE 5th Portuguese Meeting on Bioengineering (ENBENG). IEEE;1-4. doi:10.1109/ENBENG.2017.7889422
- Corona, G.**, 2011. Seaweed polyphenols: bioavailability and Healthy benefits. *Bioactive from Seaweed, and Innovative Ingredients in Salt Reduction*, p 5.

Counet, C., D. Callemien et S. Collin (2006). "Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid." *Food Chemistry* 98(4): 649-657.

Couvreur, T. L. P., Forest, F. & baker, W. J. 2011. Origin and global diversification patterns of tropical rain forests: inferences from a complete genus-level phylogeny of palms. *BMC Biology*, 9, doi: 10.1186/1741-7007-9-44.

Cowan M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbial agents. Clin. Microbiol. Rev.* , 12, 564-582.

D

Das, K., Tiwari, R.K.S., Shrivastava, D.K., 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 104-111.

De Granville, J. J. (1988). "Les palmiers de la Guyane française." *Revue Bois et forêts des Tropiques*, Orstom 220.

Dhingra N, Kar A, Sharma R, Bhasin S. 2017. In-vitro antioxidative potential of different fractions from *Prunus dulcis* seeds: Vis a visa ntiproliferative and antibacterial activities of active compounds. *South African Journal of Botany*. 108, 184–192. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2016.10.013>.

Dickinson, D.A. and Forman, H.J. (2002). Cellular Glutathione and Thiols Metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 64, 1019-1026. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01172-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01172-3).

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

Domenico T, Francesco C, Maria GS, Vincenza V, Mariateresa CD, Antonella S, Gabriela M et Giuseppe B. (2005). Mechanisms of antibacterial action of Three Monoterpenes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 49(6): 2474-2478.

Dransfield, J., Uhl, N. W., Asmussen, C. B., Baker, W. J., Harley, M. M. & Lewis, C. E. 2008. *Genera palmarum: the evolution and classification of palms*. Royal Botanic Gardens, Kew: Kew Publishing.

E

El Gharras, H. (2009). "Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review." *International Journal of Food Science and Technology* 44(12): 2512-2518.

Epand, R. M., et R. F. Epand. 2011. «Bacterial Membrane Lipids in the Action of Antimicrobial Agents». *Journal of Peptide Science*, vol. 17, p. 298-305.

F

Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Bouraoui NK, Trabelsi N, Boulaaba M, Abdelly C. 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*. 331, 372–379. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2008.02.008>

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

Frankel EN, Meyer AS. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J Sci Food Agric*; 80(13):1925-1941.

Fukushima, Y., T. Ohie, Y. Yonekawa, K. Yonemoto, H. Aizawa, Y. Mori, M. Watanabe, M. Takeuchi, M. Hasegawa, C. Taguchi et K. Kondo (2009). "Coffee and green tea as a large source of antioxidant polyphenols in the Japanese population." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(4): 1253-1259.

Funari, C.S., Ferro, V.O. (2006). Análise de própolis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26:171-178.

G

Gaamoussi F, Israili ZH, Lyoussi B. (2010). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of an aqueous extract of *Chamaerops humilis* leaves in obese, hyperglycemic and hyperlipidemic Meriones shawi rats. *Pak J Pharm Sci*; 23(2): 212-219.

García-Castaño JL, Terrab A, Ortiz MÁ, Stuessy TF, Talavera S. (2014). Patterns of phylogeography and vicariance of *Chamaerops humilis* L. (Palmae). *Turk J Botany*; 38(6):1132-1146. doi:10.3906/bot-1404-38

Gardès-Albert, M. and D. Jore (2005). "Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène." *Radicaux libres et stress oxydant*. Paris, Lavoisier : p 1-23.

Gardès-Albert, M., Abedinzadeh, Z., Jore, D., *L'actualité chimique*. 2003, 269-270.

Ghnimi W. (2015). Etude phytochimique des extraits de deux Euphorbiacées : *Ricinus communis* et *Jatropha curcas*. Evaluation de leur propriété anti-oxydante et de leur action inhibitrice sur l'activité de l'acétylcholinestérase. Thèse de doctorat. Université de Lorraine : 191. Disponible sur : <http://www.theses.fr/2015LORR0006>

Ginsburg, H., Deharo, E., 2011. A call for using natural compounds in the development of new antimalarial treatments—an introduction. *Malaria Journal* 10, S1.

Giovino A, Scibetta S, Saia S, Guarino C. (2014). Genetic and morphologic diversity of European fan palm (*Chamaerops humilis* L.) populations from different environments from Sicily. *Bot J Linn Soc* ; 176(1):66-81. doi:10.1111/boj.12195

González-Gallego J., Sánchez-Campos S. et Tuñón M. J. 2007. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrición hospitalaria*, 22 (3) : 287-293.

H

Hadi M. (2004). La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques : 268. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg 1

Hadj Salem J.(2009). Extraction, Identification, Caractérisation des Activités Biologiques de Flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces Molécules par Voie enzymatique. 2009:270.

Hallgas, B., T. Patonay, A. Kiss-Szikszai, Z. Dobos, F. Hollosy, D. Eros, L. Orfi, G. Kéri et M. Idei (2004). "Comparison of measured and calculated lipophilicity of substituted aurones and related compounds." *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 801(2): 229-235.

Halliwell, B., (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research*, 31(4), 261-272.

- Hammer KA, Carson CF, Riley TV.** 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86, 985-990.
- Hanifi, N.** (1991). Importance des ressources phytogénétiques et leur utilisation en Algérie. In conservation des ressources végétales. *Publication des Actes éditions*, p47 49.
- Harborne J. B. and R. J. Grayer R. J.,** (1988). "The Anthocyanins," In: Harborne Although the Chemical Structure of Anthocyanins. The flavonoids: Advances in Research since 1980, Chapman and Hall, London, pp. 1-20
- Hasnaoui, O., Adli, D.A., Sennour, R.** (2013). Antibacterial Activity of Essential Oils of *Chamaerops humilis* (Arecaceae) on Some Pathogenic Bacteria. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.*; 4(4):626-633.
- Haynes, J. & McLaughlin, J.** 2000. Edible palms and their uses. University of Florida: Institute of Food and Agriculture Sciences.
- Herrera, J.** (1989). On the reproductive biology of the dwarf palm, *Chamaerops humilis* in Southern Spain. *Principes*, 33(1), pp. 27 32.

I

- Iwashina, T.** (2000). The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, 113: 287-299.

J

- Jovanovic, S. V., Steenken, S., Simic, M. G., & Hara, Y.** (1998). Antioxidant properties of flavonoids: Reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoids radicals. In C. Rice-Evans & L. Packer (Eds.), *Flavonoids in health and disease* (pp. 137–161). New York: Marcel Dekker.

K

- Kahn, F.** (1997). "*Les palmiers de l'Eldorado*". ORSTOM éditions, Paris, 251p.
- Kalt W, Forney CF, Martin A, Prior RL.** 1999. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J Agric Food Chem* 41:4638–44.
- Karumi Y., Onyeyili P.A., Ogugbuaja V.O.** (2004). Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam Apple) leaf extract. *J. Med. Sci.* 4(3):179-182.
- Khadraoui A, Hachama K, Khodja M, Khelifa A, Mehdaoui R, Harti H, Abid S, Agnieszka Najda B, Chahboun N.** 2015 . Extraction study and the antibacterial activity of phenol and flavonoid contents in *Mentha pulegium* L. from Algeria. *Journal of Materials and Environmental Science.* 6(9), 2501-2508.
- Khelifi D, Sghaier RM, Amouri S, Laouini D, Hamdi M, Bouajila J.** (2013). Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalapensis* L. and *Peganum harmala* L. *Food Chem Toxicol*; 55: 202-208. doi:10.1016/j.fct.2013.01.004
- Kim DO, Lee KW, Lee HJ, Lee C.Y.**(2002). Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 3713-3717.
- Kim H. P., Son K. H., Chang H. W. et Kang S. S.** 2004. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*, 96 (3): 229-245.

Kim N.S., Lee D.S. 2002. Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 982: 31-47.

L

Lako, J., Trenerry, V. C., Wahlqvist, M., Wattanapenpaiboon, N., Sotheeswaran, S., & Premier, R. (2007). Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chemistry*, 101, 1727-1741.

Lenoir L. (2011). Effet protecteur des polyphénols de la verveine odorante dans un modèle d'inflammation colique chez le rat. Thèse doctorat. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne -Clermont-Ferrand I, 2011 :1-290. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00719693>.

Leopoldini M, Russo N, Toscano M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem*; 125 (2): 288-306. doi:10.1016/j.foodchem.2010.08.012

LI WJ, Cheng XL, Liu J, Wang GL, Lin RC, Du SS, Liu ZL. 2012. Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of *Liriope muscari*. *Molecules*. 17, 1797-1808.

Lobstein, A., 2010. Substances naturelles et pharmacognosie, les alcaloïdes, pp 3-25.

Lopes-Lutz D, Alviano DS, Alviano CS, Kolodziejczyk PP. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*; 69(8):1732-1738. doi:10.1016/j.phytochem.2008.02.014

Lubec, G. (1996). "The hydroxyl radical: from chemistry to human disease." *J Investig Med* 44: 324-346.

M

M'hiri N. (2015). Étude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange «Maltaise demi sanguine» et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone. Thèse doctorat. Université de Lorraine. Disponible sur : <https://www.theses.fr/2015LORR0183>.

Marfak A., 2003. Radiolyse Gamma des flavonoides. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse de doctorat, 220p. Université de Limoges. Disponible sur : <http://www.theses.fr/2003LIMO330E>

Mariod AA, Ibrahim RM, Ismail M, Ismail N. (2009) Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chem*; 116(1):306-312. doi:10.1016/j.foodchem.2009.02.051

Martins, S., Amorim, E. L. C., Sobrinho, T. J. S. P., Saraiva, A. M., Pisciotto, M. N. C., Aguilar, C. N., Mussatto, S. I. (2013). Antibacterial activity of crude methanolic extract and fractions obtained from *Larrea tridentata* leaves. *Industrial Crops and Products*, 41(1), 306–311. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.037>

Michel T. (2011). Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*). Alimentation et Nutrition. Thèse de Doctorat. Université d'Orléans.

Michel T, Destandau E, Le Floch G, Lucchesi ME, Elfakir C.(2012). Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. *Food Chem*;131(3):754-760. doi:10.1016/j.foodchem.2011.09.029

Miguel E. Jácome-Flores ME, Delibes M, Wiegand T, Fedriani JM.(2016). Spatial patterns of an endemic Mediterranean palm recolonizing old fields. *Ecol Evol.*6(23):8556-8568. doi:10.1002/ece3.2504

Miguel, M., Bouchmaaa, N., Aazza, S., Gaamoussi, F., Lyoussi, B. (2014). Antioxidant, anti-inflammatory and anti-acetylcholinesterase activities of eleven extracts of moroccan plants. *Fresenius Environmental Bulletin* 23(6):1-14.

Mojarrab M, Lagzian MS, Emami SA, Asili J, Tayarani-Najaran Z. (2013). In vitro anti-proliferative and apoptotic activity of different fractions of *Artemisia armeniaca*. *Brazilian J Pharmacogn.* 23(5):783-788.

Monache, F., Ferrari, F., Poce-Tucci, A., Marini-Bettolo, G.B. (1972). Catechins with (+)-epi-configuration in nature. *Phytochemistry* 11:2333–2335.

Morel Sylvie. (2011). Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae). Biochimie, Biologie Moléculaire. Thèse de Doctorat. Université d'Angers.

Muanda FN, Soulimani R, Diop B, Dicko A. (2011). Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana Bertoni* leaves. *LWT - Food Sci Technol.* 44(9):1865-1872. doi:10.1016/j.lwt.2010.12.002

Muanda FN.(2010). Identification des polyphénols, évaluation de leur Activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de doctorat. Université P. Verlaine-Metz , p 295.

N

Nakayama, T., K. Kaiya et S. Kumazawa. 2006. «Interaction of Plant Polyphenols with Liposomes». In *Advances in planar lipid bilayers and liposomes*, p. 107-1 33.

Nehdi, I.A., Mokbli, S., Sbihi, H., Tan, C.P., Al-Resayes, S.I. (2014). *Chamaerops humilis* L. var. *argentea* André date palm seed oil: a potential dietetic plant product. *Journal of Food Science* 79(4):534-539.

Newmann D. and Cragg G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* 70: 461-477.

O

Olivier MT, Muganza FM, Shai LJ, Gololo SS, Nemitavhanani LD. (2017). Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of ethanol extracts of *Asparagus suaveolens* aerial parts. *South African J Bot.* 108:41-46. doi:10.1016/j.sajb.2016.09.014

Oyaizu M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition* 44, 307–315.

P

Palmweb. 2017. Palmweb: Palms of the World Online. Published on the internet <http://www.palmweb.org/>.

Paris, R. et Moyses, H. (1969). Précis de matière médicale. Paris : Masson

Pinto J.R., Pernes S. (2010), Flora Guide, Université de l'Algarve.

Pratt DE. 1980. Natural antioxidants of soybean and other oil-seeds. In M. G. Simic, & M. Karel (Eds.), *Autoxidation in food and biological systems* (283–292 p). New York: Plenum Press.

Prior, R. L., X. Wu, K. Schaich (2005). "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(10): 4290-4302.

Q

QGIS Development Team (2017). QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>.

R

Ravikumar Y S, Harish BG, Vaidya VP, Krishna V, Mahadevan KM. (2007). Antibacterial Activity of Stem Bark Constituents of *Polyalthia cerasoides* (Roxb) Bedd. . *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*.1 (2), 164-167

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free. Rad. Biol. Med.* 26, 1231–1237.

Reber, J.D., Eggett, D.L., Parker, T.L., 2011. Antioxidant capacity interactions and a chemical/structural model of phenolic compounds found in strawberries. *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* 62, 445-452.

Rezaire A.(2012). Activité anti-oxydante et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). Thèse de doctorat. Université des Antilles et de la Guyane ;p, 215

S

Salvayre R, Auge N, and Nègre-Salvayre A.(2003). Rôle de l'oxydation dans la genèse et la progression de l'athérosclérose. In *L'athérosclérose : Physiopathologie, Diagnostics, Thérapeutiques.*, J.-F. Toussaint, M.-P. Jacob, L. Lagrost and J. Chapman, *Eds. Masson* : Paris, Vol. 14, pp 269-290.

Sartori-Thiel, A. (2003). "Activités anti-microbiennes d'extraits végétaux enrichis en polyphénols." *Science et Agronomie ED 380 Doctorat* : 177. Université d'Avignon

Schroeter, H., C. Boyd, J. P. E. Spencer, R. J. Williams, E. Cadenas et C. Rice-Evans (2002). "MAPK signaling in neurodegeneration: Influences of flavonoids and of nitric oxide." *Neurobiology of Aging* 23(5): 861-880.

Seeram, N. P., M. Aviram, Y. Zhang, S. M. Henning, L. Feng, M. Dreher et D. Heber (2008). "Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(4): 1415-1422.

Simic, M., T. Kundakovic et N. Kovacevic (2003). "Preliminary assay on the antioxidative activity of *Laurus nobilis* extracts." *Fitoterapia* 74(6): 613-616.

Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144–153.

Sokol-Letowska A., Oszmiansk J., wojdylo A., 2007. Antioxydant activity of the phenolic compounds of Hawthorn, pine and skullcap. *Food chemistry*, 103:853-859.

- Soulère L, Viodé C, Périé J. and Hoffmann P.** 2002. Selective Inhibition of Fe-versus Cu/Zn-Superoxide Dismutases by 2,3-Dihydroxybenzoic Acid Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 50 : 578-582, 2002.
- Stöckigt J., Sheludko Y., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha H., Stöckigt D.,** 2002. High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic-electrospray ionization mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of chromatography A* 967: 85-113.
- Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M., & Spranger, I.** (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4267–4274.

T

- Tarascou, I., J. P. Mazauric, E. Meudec, J. M. Souquet, D. Cunningham, S. Nojeim, V. Cheynier et H. Fulcrand** (2011). "Characterisation of genuine and derived cranberry proanthocyanidins by LC-ESI-MS." *Food Chemistry* **128**(3): 802-810.
- Tátraaljai D, Major L, Földes E, Pukánszky B.** (2014). Study of the effect of natural antioxidants in polyethylene: Performance of β -carotene. *Polym Degrad Stab* ;102(1) :33-40. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2014.02.012
- Techer Sophie.** (2013). Criblage d'activités biologiques de plantes endémiques ou indigènes de La Réunion - Recherche de molécules antivirales ciblant le virus du chikungunya. *Vegetal Biology*. Thèse de doctorat. Université de la Réunion. Disponible sur : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01199856/>
- Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M.,** 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry* 90, 333–340.
- Terra X., Valls J., Vitrac X., Mérrillon J.-M., Arola L., Ardèvol A., Bladé C., Fernández-Larrea J., Pujadas G., Salvadó J., Blay M.** (2007) Grape-seed procyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting NF κ B signaling pathway. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 4357-4365
- Théron, P. and D. Bonnefont-Rousselot** (2005b). "Systèmes antioxydants endogènes." *Radicaux libres et stress oxydant*. Paris, Lavoisier: p 87-111.
- Tomás-Barberán F, Espín JC.** 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J Sci Food Agric* 81:853–76.
- Tomlinson, P. B.** 2006. The uniqueness of palms. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **151**, 5-14.
- Tomlinson, P. B., Horn, J. W. & Fisher, J. B.** 2011. *The anatomy of palms (Arecaceae - Palmae)*. Oxford: Oxford University Press.
- Tsuchiya, H., Linuma, M.,** 2000. Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophora flavanone G isolated from *Sophora exigua*, *Phytomedicine*, 7, pp 161-165.

V

- Valko, M., C.J. Rhodes, J. Moncol, et al.** (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." *Chem Biol Interact* 160: 1-40.

Van Acker, S. A., van den Berg, D. J., Tromp, M. N. J. L., Griffaen, D. H., van Bennekom, W. P., van Vijgh, W. J. F., et al. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), 331–342.

Vertuani, S., Angusti, A., Manfredini, S., Curr. (2004). *Pharm. Des.*, 10, 1677-1694.

Vivek Kumar, T., Vishalakshi, M., Gangaraju, M., Das, P., Roy, P., Banerjee, A., & Dutta Gupta, S. (2017). Evaluation of antibacterial, antioxidant and nootropic activities of *Tiliacora racemosa* Colebr. Leaves : *In vitro* and *In vivo* approach. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 86,662–668.

W

Wald, E. (2009). (PUNICA GRANATUM) : Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes, 158.

Wardman, P. and L.P. Candeias (1996). "Fenton Chemistry: An Introduction." *Radiat Res* 145: 523-531.

Watson, R. R. (2014). Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation. *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation*.

Whiteman, M., U. Ketsawatsakul and B. Halliwell (2002). "A reassessment of the Williams, C.A., Harborne, J.B. (1973). Negatively charged flavones and tricin as chemosystematic markers in the Palmae. *Phytochemistry* 12:2417-2430.

Wojdyło A, Oszmiański J, Czemerys R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* 105(3):940-949. doi:10.1016/j.foodchem.2007.04.038

Wong, C.-C., Li, H.-B., Cheng, K.-W., & Chen, F. (2006). A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, 97, 705–711.

Wu P, Ma G, Li N, Deng Q, Yin Y, Huang R. (2015). Investigation of *In vitro* and *In vivo* antioxidant activities of flavonoids rich extract from the berries of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. *Food Chem.* 2015; 173:194-202. doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.023

Y

Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada-Pérez, L., López-Villafranco, E., Muñiz, E.E., Aguilar, A., Reyes-Chilpa, R., 2005. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *Journal of Ethnopharmacology* 97, 293–299.

Yu, L. L. (2001). Free radical scavenging properties of conjugated linoleic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3452–3456.

Z

Zhao Y, Du SK, Wang H, Cai M. (2014). *In vitro* antioxidant activity of extracts from common legumes. *Food Chem.* 152:462-466. doi:10.1016/j.foodchem.2013.12.006

ANNEXE 1

Solvants et réactifs

Les réactifs et solvants employés au cours de ces travaux sont détaillés dans le tableau A-1.

Tableau A-1 : Nom et provenance des réactifs et des solvants

Nom du produit	Fournisseur
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH)	Sigma-Aldrich
Acétate d'éthyle	Prolabo
Acide gallique	Sigma-Aldrich
Acide linoléique	Sigma-Aldrich
Acide trichloroacétique (TCA)	Sigma-Aldrich
Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS)	Sigma-Aldrich
Acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique (Trolox)	Sigma-Aldrich
Agar	Sigma-Aldrich
Butanol	Sigma-Aldrich
Carbonate de sodium (Na ₂ CO ₃)	Sigma-Aldrich
Catéchine	Sigma-Aldrich
Chlorure d'aluminium (AlCl ₃)	Sigma-Aldrich
Dichlorométhane	Prolabo
Diméthylsulfoxyde (DMSO)	Sigma-Aldrich
Ether de pétrole	Sigma-Aldrich
Folin-Ciocalteu	Sigma-Aldrich
Gélose Mueller-Hinton	ACNS Lab
Hydroxytoluène butylé (BHT)	Sigma-Aldrich
Méthanol	Sigma-Aldrich
Peptone caséine	Fluka
Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich
Quercétine	Sigma-Aldrich
Tween	Sigma-Aldrich
Vanilline	Sigma-Aldrich
β-Carotène	Sigma-Aldrich

ANNEXE 2

Analyses de la variance (dosages des composés phénoliques)**Tableau A-2-1** : Dosage des PTT. Moyennes de 3 répétitions \pm écart-type.

Partie de la plante	Fractions	Polyphénols Totaux (mg EAG/g fractions)
Feuilles	FDCM	56,53 \pm 4,82 ^c
	FAE	214,80 \pm 3,26 ^a
	FB	106,75 \pm 4,55 ^b
	Faq	24,29 \pm 0,30 ^e
Baies	FDCM	12,71 \pm 1,20 ^f
	FAE	37,86 \pm 0,16 ^d
	FB	9,41 \pm 0,07 ^f
	Faq	5,76 \pm 0,17 ^f

Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0,05$.

Tableau A-2-2 : Dosage des FVT. Moyennes de 3 répétitions \pm écart-type.

Partie de la plante	Fractions	Flavonoïdes Totaux (mg EQ/g fractions)
Feuilles	FDCM	54,27 \pm 0,94 ^a
	FAE	45,16 \pm 0,43 ^b
	FB	24,71 \pm 1,04 ^c
	Faq	2,36 \pm 0,19 ^e
Baies	FDCM	3,23 \pm 0,10 ^e
	FAE	4,85 \pm 0,20 ^d
	FB	1,71 \pm 0,11 ^e
	Faq	1,19 \pm 0,02 ^e

Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0,05$.

Tableau A-2-3 : Dosage des TC. Moyennes de 3 répétitions \pm écart-type.

Partie de la plante	Fractions	Tanins condensés (mg EC/g fractions)
Feuilles	FDCM	38,51 \pm 01,63 ^c
	FAE	198,10 \pm 13,32 ^a
	FB	54,79 \pm 01,19 ^b
	Faq	1,41 \pm 00,09 ^f
Baies	FDCM	9,73 \pm 2,61 ^e
	FAE	24,95 \pm 4,52 ^d
	FB	55,54 \pm 2,14 ^b
	Faq	3,70 \pm 1,63 ^f

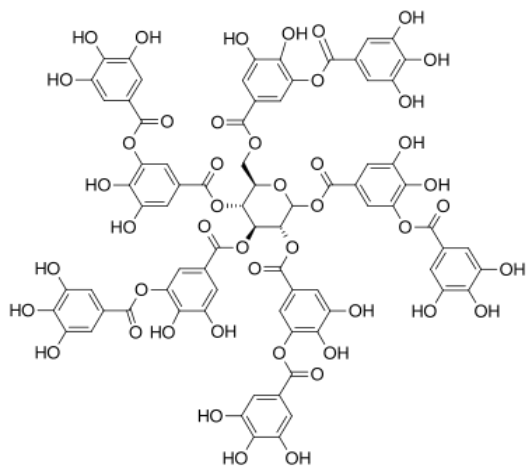
Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0,05$.

Tableau A-2-4 : Dosage des AMT. Moyennes de 3 répétitions \pm écart-type.

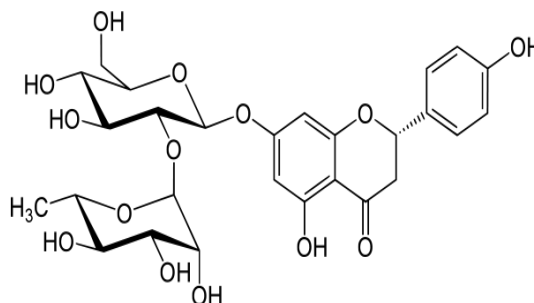
Partie de la plante	Fractions	Anthocyanes (mg cyanidine 3-O-glucoside/g)
Feuilles	FDCM	2,55 \pm 0,10 ^a
	FAE	1,35 \pm 0,08 ^b
	FB	1,05 \pm 0,08 ^b
	Faq	0,75 \pm 0,10 ^c
Baies	FDCM	0,15 \pm 0,03 ^d
	FAE	1,20 \pm 0,08 ^b
	FB	0,75 \pm 0,08 ^c
	Faq	0,1 \pm 0,05 ^d

Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à $p < 0,05$.

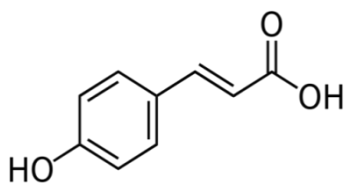
ANNEXE 3

Structures chimiques des composés phénoliques majoritairement identifiés dans, les feuilles, et baies de *C. humilis*

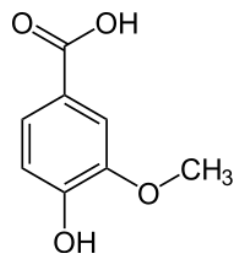
Acide tannique



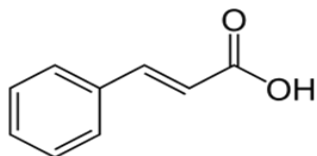
Naringine



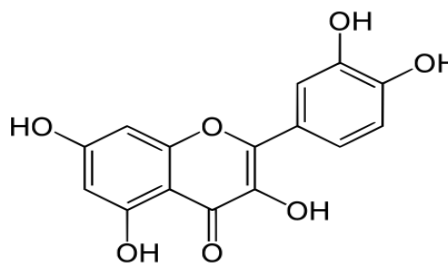
Acide p-coumarique



Acide vanillique



Acide cinnamique



Quercétine

ANNEXE 4

Traitement statistique

Les différentes expériences réalisées pendant ces travaux de thèse ont toutes été traitées statistiquement à l'aide du logiciel R (R software for Windows, Version 3.3.2). Avant l'analyse statistique, la normalité de tous les paramètres a été vérifiée (test Shapiro-Wilk). Les différences significatives entre variables ont ensuite été évaluées en effectuant une comparaison multiple de moyennes via une ANOVA à un facteur suivie du test HSD de Tukey. Les différences avec des p-values supérieures à 0.05 n'ont pas été considérées comme significatives.

Par ailleurs, ce logiciel a également été utilisé pour effectuer les tests statistiques multivariés tels que, l'ACP et la CAH ainsi que pour déterminer les Coefficients de Corrélation de Pearson.



Antioxidant, antibacterial activities and phenolic content of organic fractions obtained from *Chamaerops humilis* L. leaf and fruit

Saber Belhaoues¹, Sandra Amri², Mourad Bensouilah¹, Ratiba Seridi²

¹Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar-University of Annaba, Laboratory of Ecobiology for Marine Environment and Coastlines, El-Hadjjar, Algeria ²Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar-University of Annaba, Laboratory of Vegetal Biology, El-Hadjjar, Annaba, Algeria

³Department of Nature and Life Sciences, Faculty of Sciences, 8 May 1945 University, Guelma, Algeria

Key words: *Chamaerops humilis*, Antioxidant activity, Antibacterial activity, Polyphenols

<http://dx.doi.org/10.12692/ijb/11.1.284-297>

Article published on July 28, 2017

Abstract

The use of plant extracts are the subject of numerous studies because, in addition to their use as preservatives in foodstuffs by replacing synthetic antioxidants, they are involved in the treatment of many diseases. This study investigated the antioxidant and antibacterial activities of *Chamaerops humilis* L. (Asteraceae) leaf and fruit, collected in north east of Algeria and their respective fractions, obtained using dichloromethane (DCMF), ethyl acetate (EAF), n-butanol (BF) and water (WF). The total phenolic and total flavonoids content was determined by the Folin-Ciocalteu and the aluminum chloride (2%) reaction, respectively. Antioxidant activity was measured, using different antioxidant assays (DPPH, FRAP, BCB). The antibacterial activities of the fractions were tested on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* and *Salmonella typhimurium*. Two different methods were employed for the determination of antibacterial activities: disc diffusion method and minimum inhibitory concentrations (MICs). A significant correlation existed between concentrations of the extract and antioxidant activity since the maximum antioxidative activities were exhibited by ethyl acetate fraction [IC₅₀=0.12 mg/ml (DPPH assay)] which has the highest levels of phenolic compounds (214,8±3,26 mg GAE/g fractions). Concerning antibacterial activity, the lowest activity was founded on the (WF) from fruits against *Salmonella typhimurium* (MIC=70mg/ml) and the highest was found on the (EA) fraction from leaves against *Enterococcus faecalis* (MIC=0,25 mg/ml). These findings demonstrate the remarkable potential of this plant as new source of antioxidant ingredient with interesting antibacterial capacities.

Introduction

Secondary metabolites such as polyphenols are chemical compounds, biosynthesized by plants during normal metabolic developments to prevent biotic and abiotic stresses they can undergo (Michel *et al.*, 2011; Olivier *et al.*, 2017). In the recent years, polyphenols have received much attention, since these bioactive substances exhibit a wide range of pharmacological properties, such as anti-allergic, anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, cardioprotective and vasodilatory effects (Matkowski *et al.*, 2008).

Many authors, in fact reported that the consumption of vegetables and fruits containing antioxidant phytochemicals (notably polyphenols) is advantageous for our health, as they can protect the human body from the disorders related to excessive oxidation of cellular substrates (oxidative stress) and retard the progress of many chronic diseases (Ordonez *et al.*, 2006; Lopes Lutz *et al.*, 2008).

On the other hand, the frequent use of antibiotics has increased the rapid emergence of drug-resistant germs (Bouacha *et al.*, 2015). For this reason there is a growing interest to the development and isolation for new therapeutic alternatives from plants.

Chamaerops humilis L. (Mediterranean dwarf palm) belonging to family Arecaceae, commonly named 'doum' is an important floristic element of the western Mediterranean region because it is the only palm species naturally distributed in both Europe and Africa (Guzman *et al.*, 2017). Leaves of this species are used in traditional medicine in Algeria and Morocco for the treatment of diabetes, digestive disorders, spasm, and gastrointestinal disorders (Benmehdi *et al.*, 2012). In addition, the fruit (bay) of this dwarf palm is alleged to have anti-inflammatory, urinary antiseptic and diuretic activities (Blumenthal *et al.*, 2000; Beghalia *et al.*, 2008). Additionally, several biologically important secondary metabolites such as Steroids Flavonoids, Phenols, Saponins, reducing compounds, Gallic tannins and Terpenoids have been detected from the leaves and fruits of *Chamaerops humilis* L. (Benmehdi *et al.*, 2012).

The purpose of the present study was to determine polyphenol, and flavonoid, contents at leaves and fruits as well as their antioxidant and antibacterial activities. Nevertheless, to the best of our knowledge, no studies about the antioxidant and antibacterial activities of specific fractions from *Chamaerops humilis* L. leaves and fruits have been reported.

Materials and methods

Plant material

Chamaerops humilis leaves and fruits were collected during autumn season (October, 2014), from the mountain ranges of Edough (Annaba, northeastern of Algeria). The plant was botanically identified by the department of botany (Annaba University). The leaves and fruits were washed thoroughly to remove dirt, then cut into small pieces and shade dried at room temperature for 15 days. Thereafter, dried plant materials were powdered and used for extraction.

Extraction and fractionation

The powders of leaves and fruits (100g) of *Chamaerops humilis* were individually macerated in 80% methanol solution for 24h under stirring condition.

The raw extracts were filtered, and evaporated to dryness in a rotary vacuum evaporator (Buchi, Switzerland) at 40°C to obtain a crude methanol extract, and the residue was re-extracted twice following the same procedure. The dried methanol extract was dissolved in water and then successively exhausted with solvents of increasing polarity: dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EA), and n-butanol (B). Water fraction (WF) corresponds to aqueous residue obtained at the end of the conventional liquid-liquid extraction (Michael *et al.*, 2012). The pooled fractions were evaporated to dryness; all the fractions were weighed, and stored at -18°C for further assays.

Determination of total phenolic content

Total phenolic content was determined by spectrometry using the Folin-Ciocalteu method (Singleton and Rossi, 1965). Two hundred microliters of diluted sample were added to 1 ml of 1:10 diluted Folin-Ciocalteu reagent.

After 4 min, 800 μ l of saturated sodium carbonate (75 g/l) was added. After stirring and 2 h of incubation at room temperature in the dark, the absorbance at 765 nm was measured. Gallic acid (0–200 μ g/ml) was used for the standard calibration curve. The results were expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry weight (mg GAE/g fractions).

Estimation of flavonoids content

The flavonoids content in extracts was determined according procedures described by Arvouet-Grand *et al.* (1994), using a method based on the formation of a complex flavonoid–aluminum, having the maximum absorptivity at 430 nm. Briefly, 1 ml of diluted sample was mixed with an equal volume of aluminum trichloride (AlCl_3) in methanol. After incubation at room temperature for 15 min, the absorbance of the reaction mixture was measured at 430 nm with spectrophotometer. Quercetin (0–40 μ g/ml) was used for the standard calibration curve, and results were expressed as milligrams of quercetin equivalents per gram of dry weight (mg QE/g fractions).

Antioxidant activity

DPPH radical scavenging activity: The free radical scavenging activity of the sample was measured in vitro by DPPH (1, 1-diphenyl 2, picrylhydrazyl) (Sigma, Germany) assay, according to the method of Blois (1958) with some modifications. A methanolic solution (100 μ l) of the compound to be tested was prepared at different concentrations (100–1000 μ g/ml) and was added to 1.90 ml of DPPH solution (6×10^{-5} M in methanol).

The mixture was vigorously shaken and incubated for 30 min in obscurity, and the absorbance was measured at 515 nm against corresponding blank solution. Ascorbic acid was taken as reference. Percentage inhibition of DPPH free radical was calculated based on the control reading using the following equation:

$$\text{DPPH Scavenged (\%)} = (\text{A}_{\text{DPPH}} - \text{A}_{\text{sample}}) / \text{A}_{\text{DPPH}} \times 100.$$

Where A_{DPPH} is the absorbance of the control reaction and A_{sample} is the absorbance in the presence of the extract/standard.

The antioxidant activity of the extract was expressed as IC_{50} , defined as the concentration of the test material required to cause a 50% decrease in initial DPPH concentration. A low IC_{50} value represents a high antioxidant activity.

Determination of antioxidant activity with the beta carotene bleaching (BCB) test: Antioxidant activity of the plant extract was measured according to the procedures described by Pratt (1980). A solution of β -carotene was prepared by dissolving 0.5 mg of β -carotene in 1 ml of chloroform, 25 μ l of linoleic acid and 200 mg of Tween 40. After evaporation of the chloroform, under vacuum at 50°C by a rotary evaporator, oxygenated distilled water (100 ml) was added with vigorous shaking. Aliquots (2.5 ml) of this emulsion were transferred into different test tubes containing (350 μ l) of test samples extracts. The tubes were shaken and incubated at 50°C in a water bath. Butylhydroxytoluène (BHT) was used as positive control for comparative purposes. As soon as the emulsion was added to each tube, the zero time absorbance was measured at 490 nm using a spectrophotometer against a blank, consisting of an emulsion without β -carotene. Absorbance readings were then recorded at 20 min intervals for 120 min. A mixture prepared, without sample, served as negative control. All determinations were performed in triplicate. The percentage inhibition was calculated using the following equation:

$$\% \text{ inhibition} = (\beta\text{-carotene content after 2 h of assay} / \text{initial } \beta\text{-carotene content}) \times 100$$

Reducing power: The reducing power was determined according to the method of Oyaizu (1986). 1 ml of various concentrations of test samples extracts (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/ml) were mixed with 2.5 ml of 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) and 2.5 ml of 1% potassium ferricyanide. The mixture was incubated at 50°C for 20 min.

After 2.5 ml of 10% trichloroacetic acid (TCA) were added, the mixture was centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The upper layer (2.5 ml) was mixed with 2.5 ml of distilled water and 0.5 ml of 0.1% of ferric chloride, and the absorbance was measured at 700 nm. Ascorbic acid was used as positive reference. An increase in the absorbance of the reaction mixture indicated increased reducing and the extract concentration providing 0.5 of absorbance (IC₅₀) was calculated from the graph of absorbance.

Antibacterial activity assays

Disc diffusion method: Antimicrobial activity was tested against a panel of bacterial standard strains. All these microorganisms were obtained from American Type Culture Collection (ATCC). The disc diffusion method (NCCLS, 2000a) was applied for the determination of antibacterial activities of the fractions from *Chamaerops humilis* leaves and fruits. Briefly, all the samples/fractions were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO 5%, v/v) to obtain a concentration of 200 mg/ml. The bacterial cell suspension was prepared from 24 h culture and adjusted to an inoculation of 10⁶ colony forming unit (CFU/ml) then was spread over the surface of agar plates Mueller Hinton agar (MHA) using sterile swabs into Petri dishes. Filter papers having a diameter of 6 mm, soaked with 100 µl samples (20mg per disk) and were placed on the inoculated agar plates. DMSO 5% was used as a negative control and antibiotic (*Imipenem* 15µg) was used as positive control for comparison. Before incubation, all Petri dishes were kept in the refrigerator (4°C) for 1 h to allow the complete diffusion of the samples. Then they were incubated at 37°C for 24 h. After incubation the diameters of inhibition zones were measured in mm. Evaluation of minimum inhibitory concentration (MIC): The MIC (minimum inhibitory concentration) corresponds to the lowest concentration of tested compounds, able to inhibit any visible microbial growth (Muanda *et al.*, 2011). MIC evaluations were performed by the micro dilution assay according to the standard procedure of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2010), with some modifications.

Inoculum of bacteria strains were adjusted to approximately 10⁶ CFU (colony forming unit) in Mueller–Hinton Broth (MHB), then 0.5 ml of inoculum was added to each tube containing 0.5 ml of compounds at various concentrations from 0.625 to 70 mg /ml in DMSO 5%.

All the tubes were incubated at 37°C for 24 h and growth or no-growth was assessed by the naked eye, then MIC was determined.

Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed under R software (Version 3.3.2, for Windows). Data were reported as mean (±) standard deviation of 3 replicates. Analysis of variance (ANOVA) accompanied with Tukey test were conducted to identify the significant differences between the samples (p<0.05). Correlations between phenolic content, flavonoids content and antioxidant activity were examined using Pearson's test.

Results and discussion

Extraction and fractionation yield

Methanolic crude extract of each organ (leaf and fruit) were separated in four fractions by classic liquid–liquid extraction (LLE) using dichloromethane (DCMF), ethyl acetate (EAF), n-butanol (BF), and water (WF). The mass yields are given in Fig.1.

In general, the amount of total extractable compounds decreased with decreasing polarity of the solvent in the order of water, butanol, ethyl acetate and dichloromethane. For both organs water (WF), and butanol (BF) fractions were always exhibited the higher content (8, 53% and 6.26%, of dry leaves weight, respectively) and (10.67 % and 8.75%, of dry Fruits weight respectively). Concerning (DCMF) and (EAF) fractions, we record the lowest yields of 0.84% and 1.34%, of dry leaves weight, respectively and 3.41% and 1.12% of dry fruits weight, respectively. Our result is in agreement with other studies on other plants which have indicated a maximum average yield in aqueous fraction (Dhingra *et al.*, 2017).

Thus, the extraction yields vary according to the plant under study and the physicochemical characteristics of the solvents used, and in particular their polarity.

Total phenolic content

The Various fractions (from leaves and fruit) of *Chamaerops humilis* showed different levels of total polyphenols and total flavonoids, the concentrations obtained were summarized in Table 1.

Table 1. Total phenolic and flavonoid contents of different fractions of *Chamaerops humilis*.

Organs	Test fractions	Total phenolic contents (mg GAE/g fractions)	Total flavonoid content (mg Quercetin E/g fractions)
Leaf	DCMF	56,53±4,82 ^c	54,27±0,94 ^a
	EAF	214,80±3,26 ^a	45,16±0,43 ^b
	BF	106,75±4,55 ^b	24,71±1,04 ^c
	WF	24,29±0,30 ^e	2,36±0,19 ^e
Fruit	DCMF	12,71±1,20 ^f	3,23±0,10 ^e
	EAF	37,86±0,16 ^d	4,85±0,20 ^d
	BF	9,41±0,07 ^f	1,71±0,11 ^e
	WF	5,76±0,17 ^f	1,19±0,02 ^e

Values followed by different letters in a column are significantly different ($P < 0.05$) according to ANOVA and Tukey test. DCMF, dichloromethane fraction; EAF, ethyl acetate fraction; BF, butanolic fraction; WF, water fraction.

Phenolic contents were expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry matter. The results indicate that the total polyphenols contents vary significantly according to the solvent used for fractionation, with grades ranging from 24.29 mg to 214.8mg equivalent gallic acid/g dry matter for leaves' fractions and from 5.76 mg to 37.86 mg equivalent gallic acid/g dry matter for fruits' fractions. Thus, in both organs studied acetate ethyl

fractions (EAF) had the highest amount of phenolic followed by butanolic fractions (BF), and dichloromethane fractions (DCMF). Water fractions (WF) had the lowest phenolic contents. In addition, the phenolic contents were significantly higher in leaves ($p < 0.05$) than fruits. These findings agree with previous reports (Benhammou *et al.*, 2009) indicating that secondary metabolites distribution may fluctuate between different plant organs.

Table 2. IC₅₀ values (mg/ml) and percentage of inhibition of *Chamaerops humilis* extracts in the antioxidant activity evaluation assays.

Organs	Test fractions /standard	DPPH (IC ₅₀ mg/ml ^a)	BCB (Percentage of inhibition %)	FRAP (IC ₅₀ mg/ml ^b)
Leaf	DCMF	0,81 ^b	57,66 ^b	1,06 ^d
	EAF	0,12 ^a	66,24 ^a	0,19 ^b
	BF	0,53 ^b	68,51 ^a	0,62 ^c
	WF	1,37 ^c	56,69 ^b	0,90 ^d
Fruit	DCMF	2,67 ^d	52,05 ^c	1,60 ^f
	EAF	0,76 ^b	60,06 ^b	1,22 ^e
	BF	4,95 ^f	52,11 ^c	10,18 ^h
	WF	3,73 ^e	48,88 ^c	4,43 ^g
	Ascorbic acid	0,07 ^a	-	0,06 ^a
	BHT	-	72,38 ^a	-

^aIC₅₀ (mg/ml): effective concentration at which 50% of DPPH radicals are scavenged. ^b IC₅₀ (mg/ml): effective concentration at which the absorbance is 0,5.

Values followed by different letters in a column are significantly different ($P < 0.05$) according to ANOVA and Tukey test. DCMF, dichloromethane fraction; EAF, ethyl acetate fraction; BF, butanolic fraction; WF, water fraction.

Total flavonoid content

Flavonoids are the main group of phenolic compounds. Most Studies has shown that plant extracts rich in flavonoids are a good source of antioxidants (Djeridane *et al.*, 2006; Bouterfas *et al.*, 2016). The total flavonoid content was analyzed. Results are presented in Table 1 and they indicate

that highest amount of total flavonoids content was found in DCM fraction (54.27 ± 0.94 mg equivalent quercetin/g), while minimum was present in WF (2.36 ± 0.19 mg equivalent quercetin/g) in case of leaves. Concerning fruit, all fractions exhibit poor contents of flavonoids ranging from (1.19 ± 0.02 to 4.85 ± 0.2 mg equivalent quercetin/g).

Table 3. Antibacterial activity of fractions from leaf and fruit tested at 20mg/ml, and expressed as growth inhibition zone (mm).

Organs	Sample ^a	Tested micro-organisms ^b /inhibition zone (mm) ^c .					
		Ec	Pa	St	Kp	Sa	Ef
Leaf	DCMF	-	8,33 ± 0,57 ^f	10 ± 00 ^b	11,33 ± 0,23 ^b	-	-
	EAF	13,33 ± 0,57 ^c	18,33 ± 0,66 ^c	15 ± 10 ^a	20 ± 10 ^a	14,33 ± 0,5 ^a	16,33 ± 0,57 ^c
	BF	11,33 ± 0,33 ^c	11,66 ± 0,57 ^e	-	13,33 ± 0,57 ^b	12,66 ± 0,5 ^a	15 ± 10 ^c
	WF	11,66 ± 1,15 ^e	13,66 ± 0,57 ^d	11,66 ± 0,57 ^b	12,33 ± 0,57 ^b	11 ± 10 ^b	13 ± 10 ^d
Fruit	DCMF	7,66 ± 0,57 ^d	7,33 ± 0,57 ^f	7 ± 0,57 ^c	-	9,33 ± 1,52 ^b	13 ± 00 ^d
	EAF	17,33 ± 1,15 ^b	21 ± 10 ^b	11,33 ± 0,57 ^b	10,66 ± 00 ^b	14,33 ± 0,5 ^a	19,33 ± 0,57 ^b
	BF	10,33 ± 1,52 ^c	7,33 ± 0,57 ^f	12,66 ± 00 ^b	-	9,33 ± 1,15 ^b	9,66 ± 0,57 ^e
	WF	-	-	-	-	-	-
	Imipenem	29,66 ± 0,66 ^a	41,33 ± 10 ^a	-	-	-	41,33 ± 0,3 ^a

(–) no growth inhibition zone observed. Values followed by different letters in a column are significantly different ($P < 0.05$) according to ANOVA and Tukey tests.

^aThe tested samples were DCMF: dichloromethane fraction; EAF: ethyl acetate fraction; BF: butanolic fraction; WF: water fraction; Imipenem: antibiotic

^bTested microorganisms: Ec: *Escherichia coli*; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; St: *Salmonella typhimurium*; Kp: *Klebsiella pneumonia*; Sa: *Staphylococcus aureus*; Ef: *Enterococcus faecalis*.

^cIncluding the diameter of the disk (6 mm).

Compared to other extracts of plants reported in literature, the extract obtained, in this study, from *Chamaerops humilis* (Especially for leaves) was more rich in polyphenols and flavonoids than those in some Asian plants such as *Prunus dulcis* (Dhingra *et al.*, 2017) and *Nigella sativa* (Mariod *et al.*, 2009). Indeed, Djeridane *et al.* (2007) who evaluated several Algerian medicinal plants found that this abundance is characteristic of the Asteraceae family in North Africa. The authors suggested that those characteristics may be related to the hard climate conditions of Asteraceae usual habitat (hot temperature, high solar exposure, drought, salinity), which stimulate the biosynthesis of secondary metabolites such as polyphenols.

In addition, the EA fraction exhibited the highest polyphenols contents as reported by other authors who studied North African plants (Salem *et al.*, 2011; Khadraoui *et al.*, 2015).

Antioxidant activity

To investigate the antioxidant activities of *Chamaerops humilis* organs we used three different biochemical in vitro assays: the DPPH radical scavenging, the reducing power, and the inhibition by β -carotene-linoleate system (BCB), which are based on different mechanisms of action.

DPPH: DPPH has been widely used in the determination of the antioxidant activity because it is fast, easy and reliable and does not require a special reaction and device (Aksoy *et al.*, 2013).

The method is based on the reduction of alcoholic DPPH solutions in the presence of a hydrogen donating antioxidant. The radical scavenging activity of fractions (DCMF, EAF, BF, WF) of leaves and fruits of *Chamaerops humilis* are expressed in terms of IC₅₀, and shown in Table 2.

The IC₅₀ of all fractions from leaves and fruits ranged from 0.12mg/ml to 3.7mg/ml and 0.76mg/ml to 4.95mg/ml, respectively. EA fractions showed the highest activity in both leaves and fruits, 0.12 mg/ml and 0.76 mg/ml, respectively. However, DPPH free radical scavenging of all fractions tested was

significantly less ($p < 0,05$) than that of ascorbic acid, a synthetic antioxidant (0.07 mg/ml) except ethyl acetate leaves' fraction ($p > 0,05$). Furthermore leaves showed lower IC₅₀ value than fruits ($p < 0, 05$). These findings may be due to the presence of higher amount of total phenolic and flavonoids in leaves as compared to fruits. These results are in accordance with those of many studies which reported a correlation between the polyphenols and flavonoids contents of extracts and radical scavenging activity; they also observed a higher activity for the ethyl acetate fraction (Benhamou *et al.*, 2009; Salem *et al.*, 2011).

Table 4. Minimum inhibitory concentration (MIC, in mg/ml) of fractions obtained from *Chamaerops humilis* leaves and fruits on different bacterial strains.

Organs	Sample ^a	Tested microorganisms ^b / MIC(mg/ml)					
		Ec	Pa	St	Kp	Sa	Ef
Leaf	DCMF	2	4	20	10	20	2
	EAF	2	0,5	4	2	2	0,25
	BF	20	10	10	10	10	4
	WF	40	40	50	60	40	50
Fruit	DCMF	10	4	10	4	4	4
	EAF	4	2	0,5	1	2	1
	BF	10	10	4	4	4	4
	WF	50	50	70	40	40	50

^aThe tested samples were DCMF: dichloromethane fraction; EAF: ethyl acetate fraction; BF: butanolic fraction; WF: water fraction; Imipenem: antibiotic

^bTested microorganisms: Ec: *Escherichia coli*; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; St: *Salmonella typhimurium*; Kp: *Klebsiella pneumonia*; Sa: *Staphylococcus aureus*; Ef: *Enterococcus faecalis*.

Benhamou *et al.* (2009) showed that the acetate ethyl fraction of *Atriplex halimus* (Amaranthaceae family), exhibited a stronger antioxidant activity compared to butanolic fraction with IC₅₀ values 1.73mg/ml ($R_2 = 0.98$) and 2.04 ($R_2 = 0.99$) mg/ml, respectively. Also, Dhingra *et al.* (2017) observed a significant positive correlation between the total phenolic contents of *Prunus dulcis* and DPPH scavenging with $R_2 = 0.931$. In this study we found a significant correlation between the antioxidant activity and phenolic content with coefficient of determination ($R_2 > 0, 91, p < 0, 05$) for all samples tested.

Beta carotene bleaching (BCB) test: The BCB method is based on the loss of the orange color of β -carotene due to its reaction with radicals which are formed by linoleic acid oxidation in an emulsion. However, the presence of antioxidant constituents could neutralize the linoleate free radical and hence prevent the bleaching of β -carotene (Chew *et al.*, 2008).

The results obtained in this assay indicated that all fractions of both organs studied (leaves and fruits) had a higher antioxidant capacity and a higher activity compared with the negative control ($P < 0, 05$) (without addition of extract) Fig. 2 and 3.

However, except ethyl acetate and butanolic fraction from leaves, all compounds showed a significantly lower ($p < 0,05$) activity than that of BHT, a synthetic antioxidant (positive control) (Table 2). The results revealed also that the antioxidant activity of fractions from leaves had better antioxidant properties than those of fruits. This finding is in agreement with the DPPH assay. Thus, the comparison of the degradation rate of β -carotene between the fractions allowed us to establish this order:

BHT (72,38%) > BF (68,51%) > EAF (66,24%) > DCMF (57,66%) > WF (56,69%) for leaves and BHT

(72,38%) > EAF (60,06%) > BF (52,11%) > DCMF (52,05%) > WF (48,88%) for fruits. Overall, EAF and BF fractions revealed better antioxidant properties than did either DCMF or WF. These results are in agreement with the high content of polyphenols and flavonoids found in these fractions. Similar results were found on other plants by Chan *et al.* (2014) authors who found a positive correlation between the capacity to inhibit bleaching of β -carotene and the high amount of polyphenols.

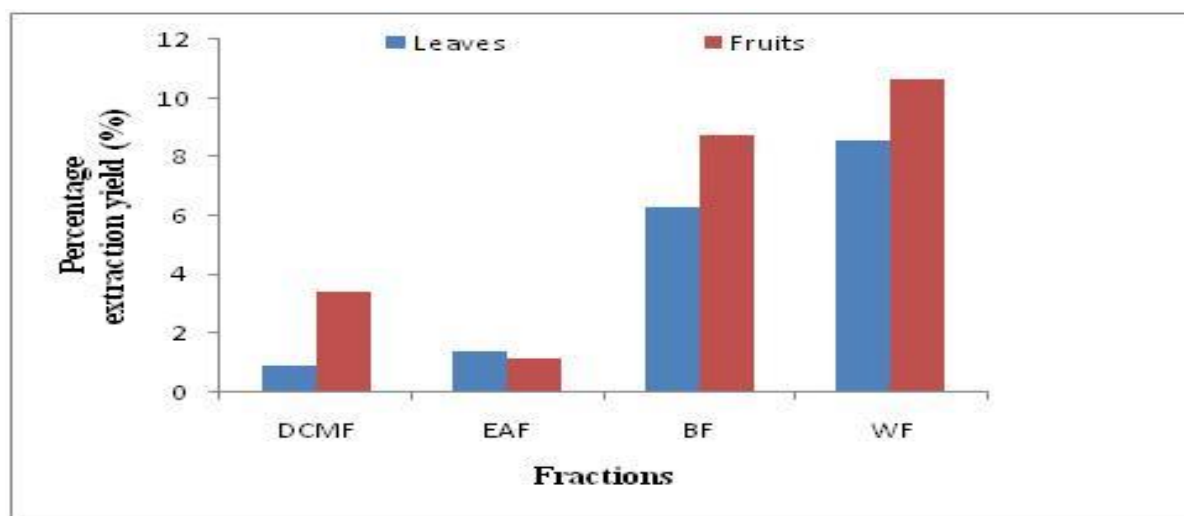


Fig. 1. Mass yields of fractions obtained from the methanolic extract of *Chamaerops humilis* leaf, and fruit. DCMF, dichloromethane fraction; EAF, ethyl acetate fraction; BF, butanolic fraction; WF, water fraction.

Frap assay: The reducing power assay consists of evaluating the ability of plant fractions to reduce Fe_{3+} ions to Fe_{2+} by electron donation (Olivier *et al.*, 2017).

The absorbance obtained for all the extracts and ascorbic acid are shown in Fig. 4 and 5. And their IC₅₀ values are represented in Table 2.

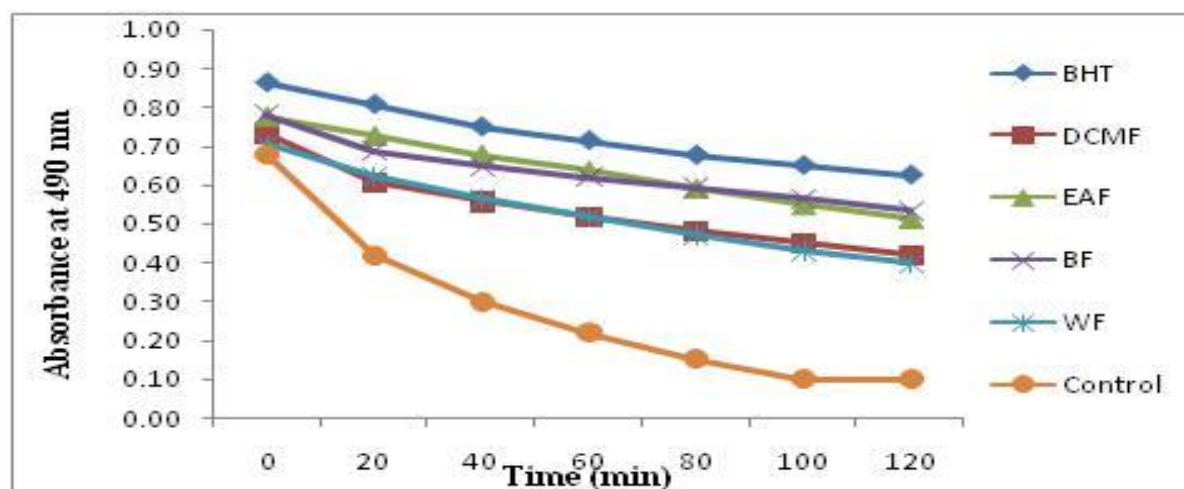


Fig. 2. Effect of *Chamaerops humilis* leaves' fractions and BHT (Butylhydroxytoluène) standard on oxidation of β -carotene/linoleic acid.

DCMF, dichloromethane fraction; EAF, ethyl acetate fraction; BF, butanolic fraction; WF, water fraction.

The IC₅₀ of all fractions from leaves and fruits ranged from 0.19 mg/ml to 0.9 mg/ml and 1.22mg/ml to 10.18mg/ml, respectively. EA fractions showed the highest activity. However, this effect was not as great as the effect of ascorbic acid ($p < 0.05$).

In this assay, we noted the correlation coefficient between phenolics (total polyphenol and flavonoids)

and values of the reducing power activity was highly significant ($R_2 > 0, 86$) for all compounds, indicating that polyphenols may play an important role in the reducing power. Oliver *et al.* (2017) reported the IC₅₀ for hexane, chloroform and butanolic fractions of *Asparagus suaveolens* at 2.5mg, 2.5mg and 1.87 mg respectively. Our extract (especially leaves' fractions) demonstrated a stronger reducing power.

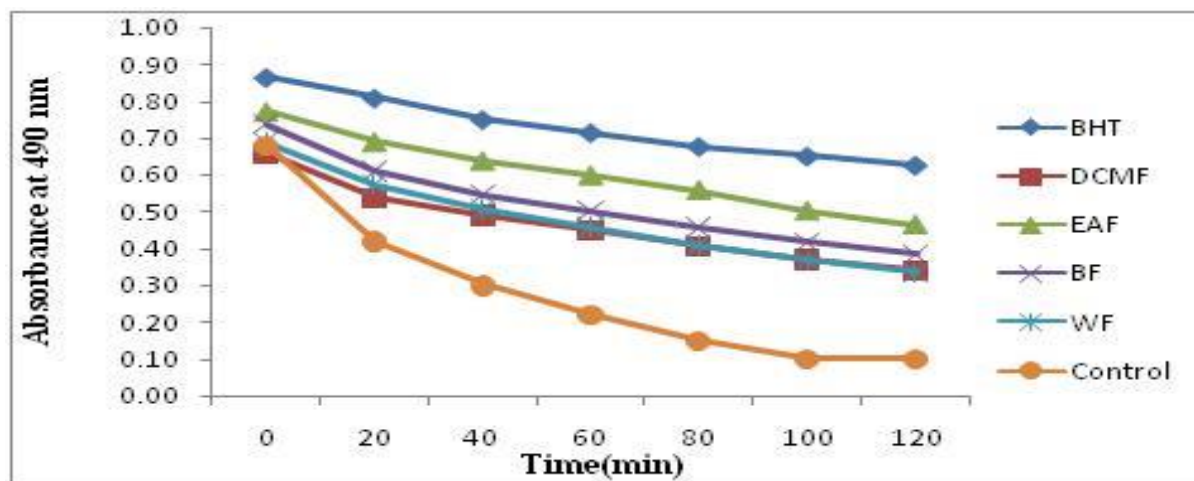


Fig. 3. Effect of *Chamaerops humilis* fruits' fractions and BHT (Butylhydroxytoluène) standard on oxidation of β -carotene/linoleic acid.

DCMF, dichloromethane fraction; EAF, ethyl acetate fraction; BF, butanolic fraction; WF, water fraction.

Butanolic and water fractions from fruits were less active than the other fractions as well as the standards (ascorbic acid). This suggests that these fractions are not electron donors, and cannot reduce Fe_{3+} ions to Fe_{2+} . Therefore, the antioxidant activity is not only dependent on the concentration, but also on the structure and the nature of the antioxidants

(Falleh *et al.*, 2008). Based on these results, it may be concluded that the antioxidant effect of polyphenols and flavonoids is not only dose dependent but could also be structure-dependent. Indeed, many authors established that the antioxidant activity is positively correlated with polyphenols structure (Li *et al.*, 2012; Bouterfas *et al.*, 2016).

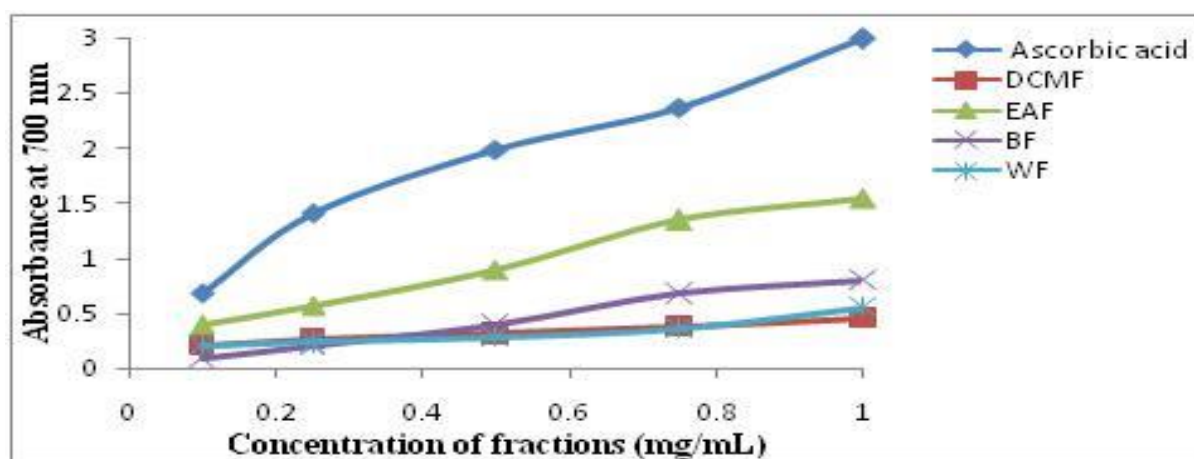


Fig. 4. Reducing power of *Chamaerops humilis* leaves' fractions.

DCMF, dichloromethane fraction; EAF, ethyl acetate fraction; BF, butanolic fraction; WF, water fraction

Antibacterial activities

Disc diffusion method: The agar disc diffusion technique is frequently used to screen plant extracts for antimicrobial activity (Lopes-Lutz *et al.*, 2008). As can be seen the antibacterial activity of *Chamaerops humilis* extracts was found against both some Gram + and Gram – bacterial species with varying degrees of inhibition ($p < 0,05$) (Table 3).

All the samples from leaves and fruits presented an inhibitory activity except the WF from fruits. For the fractions from leaves, it is evident that the ethyl acetate fraction exhibits maximum antibacterial potency against all the bacteria tested. The maximum zone of inhibition of EA fraction was 20 mm and

18mm recorded against *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. *Escherichia coli* were found to be less sensitive with 13mm zone of inhibition. Butanolic and water fractions displayed moderate activity, while the DCM fraction showed very little zone of inhibition compared to the other fractions. The results indicated also that DMSO 5%, used as negative control, did not produce any inhibition zone on its own. In contrast, *Imipenem*, used as positive control produced, 29mm, 41mm, and 43mm inhibition zones with *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* respectively, and it did not show any activity on the other bacterial strains.

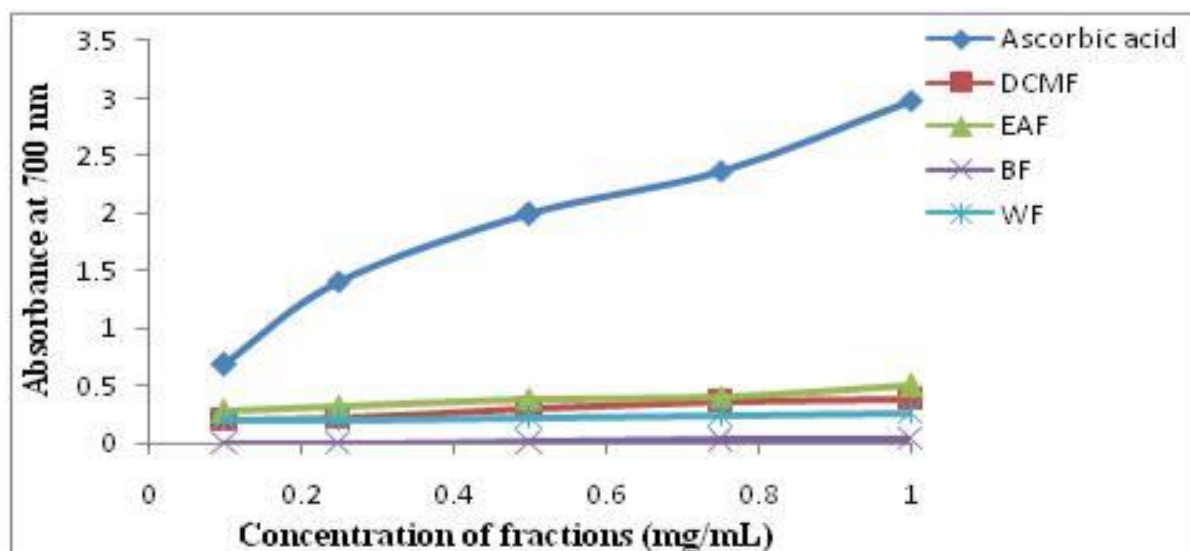


Fig. 5. Reducing power of *Chamaerops humilis* fruits 'fractions DCMF, dichloromethane fraction; EAF, ethyl acetate fraction; BF, butanolic fraction; WF, water fraction.

In general, the Gram-negative bacteria showed less sensitivity to plant extract. This may be due to their extra lipopolysaccharide and protein cell wall that provides a permeability barrier to the antibacterial (Tiwari *et al.*, 2014). However, this result was not observed in our study since the extracts had an effect almost similar and sometimes even higher upon gram – than gram+. These results suggest that the presence of phytochemicals have a broad spectrum antibacterial activity.

Regarding to the antibacterial activity of fractions from fruits, the most interesting results were found, for the EA fraction.

Indeed this fraction was the most efficient, particularly for *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* recording a maximum of 17mm, 21mm, and 19 mm zone of inhibition, respectively. Furthermore, this fraction showed the most relevant antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* compared to the ethyl acetate fraction from leaves which has the highest levels of phenolic compounds (Table 1).

This suggests that antibacterial activity of EA fraction from fruits may be attributed to other classes of secondary metabolites.

In fact, according to many reports (Al Akeel *et al.*, 2014; Sharifirad *et al.*, 2014; Olivier *et al.*, 2017) the presence of alkaloids, terpenoids, glycosides steroids and proteins may be responsible for the antibacterial properties of plant extracts. Moreover, other authors (Lopes-Lutz *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2013) reported also, the difficulty to attribute the activity of a complex mixture to a single constituent and that the efficiency of plants extracts might be explained by synergistic or additive effects of several phytochemicals.

Minimum inhibitory concentration (MIC): The real extend of antibacterial activity is evaluated by determining MIC values (Martins *et al.*, 2013). The results of MIC against bacterial strains are summarized in Table 4.

Both ethyl acetate from leaves and fruits showed the highest activity and were found to be in the range of 0.25 to 4mg/ml, and from 0.5 to 4mg/ml respectively, while DCMF and BF fractions showed a moderate activity. On the other hand, WF exhibited very low antibacterial activities with MIC > 40 mg for all the tested bacteria. Overall, the results obtained in these assays revealed that *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* were the most sensitive bacteria to EA fraction from leaves with a MIC value of 0.5mg/ml and 0.25mg/ml, respectively, while *Salmonella typhimurium* exhibited the highest resistance (MIC=4mg/ml). *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumonia* showed a better sensitivity against EA fraction from fruits with a MIC value of 1mg/ml, 1mg/ml, and 0.5mg/ml respectively, while *Escherichia coli* exhibited the highest resistance (MIC=4mg/ml). No relevant results were obtained for the others fractions.

As can be seen, different performances of fractions tested were observed between agar diffusion and MIC assays, especially for DCM fraction which exhibited a moderate activity with MIC and a weak activity with agar diffusion. This difference could be attributed to the polarity.

Hammer *et al.* (1999) reported that agar disc diffusion was a limited technique as the hydrophobic nature of most essential oils and plant extracts prevents the uniform diffusion of these substances through the agar medium. In fact, DCMF is an apolar fraction, and contents a hydrophobic compound like aglycone and long carbon chain ones which prevents the good diffusion of this extract in the agar. Concerning our results it is obvious that antibacterial activity of DCMF is influenced by the polarity of agar.

As previously reported (Ravikumar *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2013), the EA fractions exhibited potential activity against the reference strains of bacteria. This finding is in agreement with our study. However, comparing our results to those obtained with other plants in the literature is problematic since the choice of test microorganisms and the method used to assess antimicrobial activity varies between publications (Hammer *et al.* 1999).

Conclusion

The results of the present study demonstrated that phytochemicals from *Chamaerops humilis* leaves and fruits had antioxidant and antibacterial properties. Thus, these compounds can be a potential resource of natural antioxidants to be used in functional foods and health, and a treatment of infectious diseases caused by some pathogenic bacteria. Furthermore, the ethyl acetate fraction was found to possess better antioxidant and antibacterial potentials among the entire fraction evaluated.

However, further investigations are required to know the active substance responsible for the antioxidant and antibacterial potency of *Chamaerops humilis* and its mode of action.

Acknowledgements

This work was carried out with funds allocated by the General Directorate for Scientific Research and Technological Développement (DGRSDT). Aspecial thanks to Pr. Mamache B. For translating the manuscript.

References

- Aksoy L, Kolay E, Agilonu Y, Aslan Z, Kargoglu M.** 2013. Free radical scavenging activity, total phenolic content, total antioxidant status, and total oxidant status of endemic *Thermopsis turcica*. Saudi Journal of Biological Sciences **20**, 235–239. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.02.003>
- Al Akeel R, Al-Sheikh Y, Mateen A, Syed R, Janardhan K, Gupta VC.** 2014. Evaluation of antibacterial activity of crude protein extracts from seeds of six different medical plants against standard bacterial strains. Saudi Journal of Biological Sciences **21**, 147–151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.08.006>
- Al-Fatimi M, Wurster M, Schröder G, Lindequist U.** 2007. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. Journal of Ethnopharmacology **111**, 657–666. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2007.01.018>
- Arvouet-Grand A, Vennat B, Pourrat A, Legret P.** 1994. Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. Journal de pharmacie de Belgique **49**, 462–468.
- Beghalia M, Ghalem S, Allali H, Belouatek A, Marouf A.** 2008. Inhibition of calcium oxalate monohydrate crystal growth using Algerian medicinal plants. Journal of Medicinal Plants Research **2**, 66–70.
- Benhammou N, Bekkara FA, Panovska TK.** 2009. Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. Comptes Rendus Chimie **12**, 1259–66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crci.2009.02.004>
- Benmehdi H, Hasnaoui O, Benali O, Salhi F.** 2012. Phytochemical investigation of leaves and fruits extracts of *Chamaerops humilis* L. Journal of Materials and Environmental Science **3(2)**, 320–237.
- Blois MS.** 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature **181**, 1199–1200.
- Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J.** 2000. Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs. Austin, Texas, American Botanical Council; Boston, Integrative Medicine Communications, p.640.
- Bouacha M, Berredjem H, Berredjem M, Bouzerna N.** 2015. *In-vitro* Antibacterial Activity of two Novel Sulfonamide Derivatives against Urinary Strains of *Escherichia coli*. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. **6(1)**, Page No. 770.
- Bouterfas K, Mehdadi Z, Elaoufi MM, Latreche A, Benchiha W.** 2016. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoids content variations of leaves extracts of white Horehound (*Marrubium vulgare* Linné) from three geographical origins. Annales Pharmaceutiques Françaises. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharma.2016.07.002>
- Chan KW, Iqbal S, Khong NMH, Ooi DJ, Ismail M.** 2014. Antioxidant activity of phenolics and saponins rich fraction prepared from defatted kenaf seed meal. LWT - Food Science and Technology **56**, 181–186. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.028>
- Chew YL, Lim YY, Omar M, Khoo KS.** 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. LWT- Food Science and Technology **41**, 1067–1072. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2007.06.013>
- CLSI.** 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement. CLSI document M100- S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- Dhingra N, Kar A, Sharma R, Bhasin S.** 2017. In-vitro antioxidative potential of different fractions from *Prunus dulcis* seeds: Vis a visa ntiproliferative and antibacterial activities of active compounds. South African Journal of Botany. **108**, 184–192. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2016.10.013>

- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N.** 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. **97**, 654–660.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>
- Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Bouraoui NK, Trabelsi N, Boulaaba M, Abdelly C.** 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*. **331**, 372–379.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.crvi.2008.02.008>
- Guzmán B, Fedriani JM, I Delibes M, Vargas P.** 2017. The colonization history of the Mediterranean dwarf palm (*Chamaerops humilis* L., Palmae). *Tree Genetics & Genomes*. **13**:24.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11295-017-1108-1>
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV.** 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* **86**, 985–990.
- Khadraoui A, Hachama K, Khodja M, Khelifa A, Mehdaoui R, Harti H, Abid S, Agnieszka Najda B, Chahboun N.** 2015. Extraction study and the antibacterial activity of phenol and flavonoid contents in *Mentha pulegium* L. from Algeria. *Journal of Materials and Environmental Science*. **6(9)**, 2501–2508.
- Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, Milos M.** 2004. Use of different methods for testing antioxidant activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*. **85**, 633–640.
- Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, Jiang Y.** 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry* **102**, 771–776.
- LI WJ, Cheng XL, Liu J, Wang GL, Lin RC, Du SS, Liu ZL.** 2012. Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of *Liriope muscari*. *Molecules*. **17**, 1797–1808.
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules17021797>
- Lopes-Lutz D, Alviano DS, Alviano CS, Kolodziejczyk PP.** 2008. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*. **69**, 1732–1738.
- Martins S, Amorim ELC, PeixotoSobrinho TJS.** 2013. Antibacterial activity of crude methanolic extract and fractions obtained from *Larrea tridentata* leaves. *Industrial Crops and Products*. **41**, 306–311.
- Matkowski A, Tasarz P, Szypuła E.** 2008. Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. *Journal of Medicinal Plants Research*. **11**, 321–330.
- Michel T, Destandau E, Le Floch G, Lucchesi ME, Elfakir C.** 2011. Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. *Food Chemistry*. **131**, 754–760.
- Muanda FN, Soulimani R, Diop B, Dicko A.** 2011. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *LWT- Food Science and Technology* **44**, 1865–1872.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.12.002>
- NCCLS.** (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2000. Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests. Approved Standard, M2-A7.
- Olivier MT, Muganza FM, Shai LJ, Gololo SS, Nematavhanani LD.** 2017. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of ethanol extracts of *Asparagus suaveolens* aerial parts. *South African Journal of Botany* **108**, 41–46.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2016.09.014>
- Ordonez AAL, Gomez JD, Vattuone MA, Isla MI.** 2006. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chemistry* **97(3)**, 452–458.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.024>

Oyaizu M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. Japanese Journal of Nutrition **44**, 307–315.

Pratt DE. 1980. Natural antioxidants of soybean and other oil-seeds. In M. G. Simic, & M. Karel (Eds.), Autoxidation in food and biological systems (283– 292 p). New York: Plenum Press.

Ravikumar YS, Harish BG, Krishna V, Vaidya VP, Mahadevan KM. 2007. Antibacterial activity of stem bark constituents of *Polyalthia cerasoides* (Roxb.)Bedd. International journal of biomedical and pharmaceutical sciences **1(2)**, 164-167.

Sacchetti G, Maietti S, Mussoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, Bruni R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. Food Chemistry **91**, 621–632. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.031>

Salem JH, Chevalot I, Harscoat-Schiavo C,

Paris C, Fick M, Humeau C. 2010. Biological activities of flavonoids from *Nitraria retusa* (Forssk.) Asch and their acylated derivatives. Food Chemistry **124**, 486-494, 2011.

Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture **16**, 144–153.

Tiwari U, Jadon M, Nigam D. 2014. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of methanolic leaf extract of *Callistemon viminalis*. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Business Management **2**, 01-



V^{ème} Congrès International de
Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le comité d'organisation du V^{ème} congrès international de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources (AT-BVBR), tenu à Tabarka - Tunisie, du 22 au 25 mars 2017, atteste que :

Belhaoues Saber

a participé activement aux journées et a présenté la communication par affiche intitulée :

Étude de l'activité antioxydante et antibactérienne de l'extrait hydro alcoolique des feuilles de chamaerops humilis de la région d'Annaba (Algérie)

BELHAOUES SABER¹, AMRI SANDRA¹, SERIDIRA TIBA² & BENSOUILAH MOURAD¹

Le Comité d'organisation



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE FARHAT ABBAS-SETIF 1
FACULTE DE MEDICINE –DEPARTEMENT DE PHARMACIE
TEL : 036 62 05 42
Email : dep_pharm@yahoo.com



1^{er} Séminaire International de Pharmacie de Sétif (SIPS2016)/Sétif 11-12 mai 2016

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le président du comité d'organisation du 1^{er} Séminaire International de Pharmacie de Sétif (SIPS2016) atteste que :

M^{me} M^f : **Belhaoues Saber**

a participé à cette manifestation avec une communication affichée intitulée

Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits du palmier nain (*Chamaerops humilis*) de la région d'Annaba

Co-auteurs : R. Seridi, M. Bensouilah

Président du Comité Scientifique

Pr. F. DJABI

Président du Comité d'Organisation

Dr. A. FLILISSA

الأستاذة: جابي فريدة
رئيس المجلس العلمي

Dr. Fulissa Abdelmacer
Maître de Conférence
Département de Pharmacie
- Faculté de Médecine -



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
 UNIVERSITÉ MOHAMED CHERIF MESSAADIA - SOUK-AHRAS
 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

1^{ER} SÉMINAIRE INTERNATIONAL SUR LA
**BIODIVERSITÉ ET GESTION
 DES RESSOURCES NATURELLES**
 Passé - Présent - Futur DU 19 AU 21 AVRIL 2016

**ATTESTATION
 DE PARTICIPATION**

Mr Saber BELHAOUES




A présenté une communication
Affiche
 Intitulée

**Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante
 des extraits de deux plantes (Chamaerops humilis et Anthemis
 arvensis) de la région d'Annaba (Algérie)**

Laboratoire d'écobiologie des milieux marins et littoraux
 (EMMAL), Université Badji Mokhtar-Annaba

Cette attestation est délivrée pour valoir ce que de droit

Présidente du séminaire
 Dr. Hana SOUALAH ALILA

République Algérienne Démocratique et Populaire
 Direction de l'Environnement de la Wilaya de Skikda
 &
 Association Nationale Algérienne d'Ornithologie ANAO

Deuxième Colloque National sur la Biodiversité en Algérie
 23 & 24 mai 2017

Attestation De Communication

Madame la Présidente du "Deuxième Colloque National sur La Biodiversité en Algérie" (CNBA2) et Monsieur le Président du Comité Scientifique, Co-Organisé par la Direction de l'Environnement de la Wilaya de Skikda et "L'Association Nationale Algérienne d'Ornithologie" (ANAO), tenu les 23 & 24 Mai 2017 au Palais de la Culture et des Arts de Skikda, attestent que :

Mr. Saber BELHAOUES

Co-Auteurs : Sandra AMRI, Ratiba SERIDI, Mourad BENSOUILAH
 A (ont) présenté une communication : Affichée (Poster)
 Intitulée : BIODIVERSITE ET ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES MOLECULES BIOACTIVES DE CHAMAEROPS HUMILIS (FEUILLES ET BAIES).

Le Président du Comité Scientifique

Le Président du Colloque

Dr. SI BACHIR Abdelkrim
 Professeur en Biologie
 Université de Baïna, Algérie

CNBA 2
 23 mai 2017

مديرة البيئة والنباتية
 سوسية سولالاح



