

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

BADJI MOKHTAR ANNABA UNIVERSITY

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR ANNABA



جامعة باجي مختار- عنابة

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

Année : 2019

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT en Sciences

Etude phytochimique et substances bioactives de la plante médicinale dans la région d'El Oued

Option : **Chimie Organique**

Par : **TABET AMINA**

devant le jury composé de :

Pr. Fadhel ISMAIL	Président	Professeur	U.B.M. Annaba
Pr. Abbas BOUKHARI	Directeur de thèse	Professeur	U.B.M. Annaba
Pr. Chahra BIDJOU-HAIOUR	Examinatrice	Professeur	U.B.M. Annaba
Pr. Amel BENDJEDDOU	Examinatrice	Professeur	U. Souk-Ahras
Dr. Sabrina BOUGUessa	Examinatrice	MCA	U.L.T. Tébessa
Dr. Ali KALLA	Examinateur	MCA	U.L.T. Tébessa

Remerciements

Je tiens premièrement à me prosterner devant Allah le tout puissant tout en le remerciant de m'avoir donné le courage et la patience afin de terminer ce travail.

À l'issue de la rédaction de cette recherche, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien de quelques personnes.

*En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, monsieur le Professeur **Boukhari Abbes** pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour sa grande disponibilité et ses encouragements tout au long de la préparation de cette thèse. Je veux, à cet effet, lui adresser tous mes sincères remerciements pour la confiance accordée ainsi que la grande liberté d'idées et de travail qu'il m'a donné.*

*J'aimerais également remercier Monsieur le Professeur **Fadel Ismail** de l'Université d'Annaba pour avoir accepté de présider mon jury de thèse.*

*Je tiens à remercier Madame le Professeur **Bidjou Haiour**, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury. Qu'elle trouve ici mes sincères impressions de gratitude et de respect.*

*J'adresse également mes remerciements à Madame le Professeur **BENDJEDDOU Amel** de l'Université de Souk Ahras pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner et évaluer mon travail.*

*J'adresse aussi mes remerciements à Madame **Bouguessa Sabrina**, maître de conférence à l'Université de Tébessa, qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance, pour m'avoir fait l'honneur d'être examinateur et de participer au jury de ce travail.*

*Mes remerciements vont aussi à Monsieur **Ali Kalla**, maître de conférence à l'Université de Tébessa, lui qui a consacré son temps pour juger et critiquer ce travail. Je suis particulièrement reconnaissante et honorée par sa participation au jury de cette thèse.*

*Un merci particulier à Monsieur Pr. **LANEZ Touhami**, directeur de laboratoire de valorisation et technologie des ressources sahariennes (VTRS) et rédacteur en chef du "journal of fundamental and applied sciences", de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire à l'université d'El Oued.*

*Mes remerciements vont aussi à l'égard de Monsieur Dr. **Youcef HALIS**, Professeur Associé au Centre de Recherche Scientifique et Technique pour les Zones Arides (CRSTRA), Station Biophysique, Touggourt, Algérie, pour m'avoir donnée les coordonnées géographiques de notre station d'étude.*

*Je n'oublie pas le technicien Monsieur **ALI Tliba** pour son aide matérielle.*

Mes remerciements vont également à tous mes collègues du laboratoire de synthèse organique, modélisation et optimisation des processus chimiques (LOMOP).

Un grand merci à mon mari Salah pour sa sympathie chaleureuse, son appui inestimable et le sourire dans les moments difficiles et à ma fille Manissa et mon fils Mohamed Chahine pour la joie qu'ils nous procurent... encore, merci.

Dédicace

Tout d'abord et avant toute chose, je rend grâce à Allah le tout puissant pour m'avoir donné le courage, la santé, et m'a accordé Son soutien durant les périodes les plus difficiles.

A mes très chers parents Mohamed et Fathia, que j'admire beaucoup, qui m'ont toujours aidés dans Ma vie et qui n'ont cessé de m'encourager et de me soutenir tout au long de Mes études, que dieu les garde en bonne santé.

A mon très cher mari Salah, en signe d'amour et de gratitude pour m'avoir supporté, soutenu et surtout compris en permanence, pour ses sacrifices, ses encouragements, sa fidélité et sa gentillesse. Sans lui, je ne saurais pu progresser et en arriver à l'achèvement de ce travail.

A mes yeux Manissa et Mohamed Chahine qui m'ont porté bonheur.

A la mémoire de ma sœur que dieu repose son âme en paix

A mes chers frères et soeurs, ainsi qu'à leurs petites familles.

A tous ceux qui m'aiment.

Résumé

Les substances naturelles issues de la biomasse des végétaux ont des intérêts multiples qui sont mis à profit aussi bien dans la biotechnologie que dans l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Parmi ces composés, on retrouve une grande partie des métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapie. On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions. Les études des métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures *in vitro* et *in vivo* de tissus végétaux. C'est le cas notamment des composés phénoliques qui sont très étudiés. Ils sont aussi largement utilisés comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydant et anti-radicalaires. Dans ce contexte, le présent travail a été réalisé pour évaluer l'extrait méthanoïque des feuilles de *Tamarix gallica* et de *Tamarix articulata* en vue de l'effet pharmacologique. Dans cette étude, nous avons évalué la composition phytochimique, les propriétés antioxydantes et antibactériennes en mesurant l'inhibition de la production d'oxyde nitrique de l'extrait de feuilles des deux variétés. D'après les résultats, les extraits ont des valeurs très importantes pour les polyphénols, les flavonoïdes et une activité antioxydante élevée contre DPPH, FRAP, ABTS et β -carotène. Les deux extraits révèlent également une activité antimicrobienne considérable.

Les résultats nous suggèrent que les feuilles des deux variétés sélectionnées de *Tamaricaceae* L peuvent être considérées comme une bonne source d'antioxydants naturels et de médicaments antimicrobiens.

Mots-clés: Tamaricaceae L, feuilles, Polyphénols, activité antioxydant, activité antibactérien.

Abstract

Natural substances extracted from the vegetal biomass have multiple benefits exploited in industrial biotechnology of food, cosmetics and pharmaceuticals as well. Amongst these compounds we find a large proportion of secondary metabolites which are illustrated especially in therapy. We have been for a long time using in traditional medicine herbal components, without knowing the way they react, secondary metabolites studies were the subject of many researches based on in-vitro and in-vivo cultures of plant tissues. This is in particular the case of phenolic compounds which are the subject of our study, compounds widely used in therapeutics as vasculoprotectives, anti-inflammatory, enzyme inhibitors, antioxidant and anti-free-radicals. In this context, the present work is conducted to evaluate the methanolic extract from the leaves of *Tamarix gallica* and *Tamarix articulata* in point of view pharmacology effect. In this study we have evaluated the phytochemical composition, antioxidant and antibacterial properties determined by measuring the inhibition of nitric oxide production of leaves extract of the two varieties. According to the results, the extracts have very important values for polyphenols, flavanoids, and high antioxidant activity against DPPH, FRAP, ABTS and β -carotène. Also the two extracts reveal a considerable antimicrobial potency activity. The results suggest that the leaves of the two selected varieties of Tamaricaceae L can be considered as a good source of natural antioxidant and antimicrobial drugs.

Keywords: Tamaricaceae L, leaves, Polyphenols, antioxidant, antimicrobial.

المخلص

الكتلة الحيوية النباتية تملك فوائد متعددة تستغل في التكنولوجيا الحيوية خاصة في الصناعات الغذائية , مستحضرات التجميل والمواد الصيدلانية .تستعمل جزء كبير من هذه المركبات الثانوية خاصة في العلاج و منذ فترة طويلة نستعمل أدوية تقليدية من أصل نباتي دون معرفة نتيجة تأثيرها .الدراسات القائمة على المركبات الثانوية موضوع العديد من البحوث التي تركز على المزارع المخبرية والأنسجة النباتية الحية .كما هو الحال وبالأخص بالنسبة للمركبات الفينولية التي هي موضوع دراستنا المستخدمة على نطاق واسع في العلاجات مثل الوقاية الوعائية ,مضادات الالتهاب ,مثبطات الانزيمات ,مضادات الأكسدة ومضادات الجذور الحرة .في هذا السياق يركز عملنا على دراسة مستخلص اوراق تاماريكس غالیکا وأوراق تاماريكس مفصلية من الناحية الطبية. و قد قمنا بتقييم التركيب الكيميائي النباتي ، ومضادات الأكسدة وخصائص مضادة للجراثيم التي تم تحديدها عن طريق قياس تثبيط إنتاج أكسيد النيتريك و ذلك باستخراج اوراق من كلا صنف. وفقا للنتائج ، فإن المستخلصات لها قيم مهمة جدا لفينول ، الفلافونويد ونشاط مضاد للأكسدة عالي DPPH ، FRAP ، ABTS و β - كاروتين. كلا المستخلصان يكشفان عن نشاط مضاد للميكروبات.و تشير النتائج إلى أن أوراق النوعين المختارين من Tamaricaceae L قد تعتبر مصدرا جيدا لمضادات الأكسدة الطبيعية والعقاقير المضادة للميكروبات.

الكلمات الرئيسية: Tamaricaceae L ، أوراق ، بوليفينول ، مضادات الأكسدة ، مضادات الميكروب

Table des matières

<i>Remerciements</i>	
<i>Dédicace</i>	
<i>Résumé</i>	
<i>Abstract</i>	
<i>المخلص</i>	
<i>Table des matières</i>	
<i>Liste des figures</i>	
<i>Liste des schémas</i>	
<i>Liste des tableaux</i>	
<i>Abréviations</i>	
<i>INTRODUCTION GENERALE</i>	1
<i>Partie I Étude bibliographique</i>	4
<i>Chapitre I Radicaux libres, stress oxydatif et antioxydants</i>	05
<i>I. Radicaux libres</i>	6
<i>I.1. Paradoxe de l'oxygène</i>	6
<i>I.2. Les radicaux libres ou les espèces réactives oxygénées</i>	6
<i>I.2.1. La réactivité d'ERO</i>	7
<i>I.2.2 Principales sources d'espèces réactives de l'oxygène</i>	8
<i>I.3. Intérêts biologiques des radicaux libres dans la physiologie cellulaire</i>	9
<i>I.3.1. La phagocytose</i>	9
<i>I.3.2. La signalisation cellulaire</i>	9
<i>II. Le stress oxydant</i>	10
<i>III. Les antioxydants</i>	10
<i>III.1. Définition</i>	11

<i>III.2. Systèmes de défense.....</i>	<i>11</i>
<i>III.2.1. Le Système antioxydant enzymatique</i>	<i>12</i>
<i>III.2.1.1-Les superoxydes dismutases.....</i>	<i>13</i>
<i>III.2.1.2. Catalase.....</i>	<i>13</i>
<i>III.2.1.3. Glutathions peroxydase (GPX)</i>	<i>14</i>
<i>III.2.2. Le système antioxydant endogène non enzymatique</i>	<i>15</i>
<i>III.2.2.1. Glutathion.....</i>	<i>15</i>
<i>III.2.2.2. L'acide urique</i>	<i>15</i>
<i>III.2.2.3. Bilirubine.....</i>	<i>15</i>
<i>III.2.2.4. Acide lipoïque.....</i>	<i>16</i>
<i>III.2.2.5. Coenzyme Q10.....</i>	<i>16</i>
<i>III.2.3.Le système antioxydant exogène</i>	<i>16</i>
<i>III.2.3.1.Vitamine E.....</i>	<i>17</i>
<i>III.2.3.2.Vitamine C.....</i>	<i>17</i>
<i>III.2.3.3.β carotène</i>	<i>17</i>
<i>III.2.3.4. Sélénium</i>	<i>18</i>
<i>III.2.3.5. Les composés phénoliques</i>	<i>18</i>
<i>a. Biosynthèse des polyphénols</i>	<i>19</i>
<i>a₁. La voie de Shikimate</i>	<i>19</i>
<i>a₂. La voie de l'acétate malonate</i>	<i>20</i>
<i>B. Classification des polyphénols.....</i>	<i>20</i>
<i>b₁. Les non flavonoïdes.....</i>	<i>20</i>
<i>b₂.Les flavonoïdes C₆-C₃-C₆.....</i>	<i>23</i>
<i>b₃. Les tanins</i>	<i>27</i>
<i>C. Propriétés biologiques et intérêt des polyphénols.....</i>	<i>28</i>
<i>1.Chez</i>	<i>les</i>
	<i>végétaux</i>
<i>.....</i>	<i>28</i>

2. Chez l'être humain	28
3. Activité antioxydante	29
a. Piégeage des radicaux libres	29
b. Chélation des ions métalliques	30
c. Inhibition enzymatique	31
4. Méthode de mesure de l'activité antioxydante	31
a. Capacité de piégeage du radical DPPH	32
b. Méthode de FRAP	32
c. Méthode d'ABTS	33
d. Activité réductrice sur le ferricyanure de potassium	33
e. Capacité de piégeage du radical anion superoxyde	33
f. Méthode de Trolox	33
5. Activité anti bactérienne.....	34
6. Activité anti inflammatoire.....	34
7. Activité anti tumorale	34
8. Activité anti cardiovasculaire	35
CHAPITRE 2.....	37
Présentation des plantes étudiées	37
I. La famille Tamaricaceae	38
I.1. Généralités.....	38

<i>I.2. Caractères généraux de la famille Tamaricaceae</i>	38
<i>I.3. Position systématique</i>	38
<i>I. 3.1. Classification classique des Tamaricacées selon Cronquist 1988</i>	38
<i>I.3.2. Classification des Tamaricaceae selon APG 2003</i>	39
<i>I.4 Utilisations traditionnelles des Tamaricaceae</i>	39
<i>I.5. Etude pharmacologique des Tamaricaceae</i>	39
<i>I.6. Etude phytochimique et principaux métabolites secondaires isolés à partir de la famille des Tamaricaceae</i>	40
<i>I.6.1. les flavonoïdes</i>	40
<i>I.6.2. Les coumarines</i>	49
<i>I.6.3. Les huiles essentielles</i>	49
<i>I.6.4. Divers</i>	49
<i>I.7. Etude du genre Tamarix L</i>	59
<i>I.7.1. Caractères généraux du genre Tamarix L</i>	60
<i>I.7.2 L'espèce Tamarix gallica L</i>	61
<i>I.7.2.1 Nom vernaculaire</i>	61
<i>I.7.2.2 Classification</i>	62
<i>I.7.3.3 Description botanique du Tamarix gallica</i>	63
<i>I.7.3. L'espèce Tamarix articulata L</i>	63
<i>I.7.3.1 Nom vernaculaire</i>	64
<i>I.7.3.2. Classification</i>	64
<i>I.7.3.3 Description botanique du Tamarix articulata L</i>	64
<i>Partie expérimentale</i>	66
<i>Chapitre I</i>	67
<i>Matériels et Méthodes</i>	67
<i>I. MATERIELS</i>	68
<i>I.1. Matériel végétal</i>	68

<i>I.1.1. Choix des plantes</i>	68
<i>I.1.2. Identification botanique</i>	68
<i>I.1.3. Récolte de la plante</i>	68
<i>I.2. Réactifs chimiques et appareillage</i>	68
<i>I.3. Souches bactériennes</i>	69
<i>II. Méthodes</i>	70
<i>II.1. Objectifs et méthodologie</i>	70
<i>II.2. Préparation des extraits</i>	71
<i>II.2.1. Préparation du filtrat hydrométhanolique</i>	71
<i>II.2.2. Fractionnement de la phase aqueuse</i>	71
<i>II.2.3. Calcul de rendement</i>	72
<i>II.3. Méthodes de caractérisation quantitative des polyphénols</i>	72
<i>II.3.1. Dosage des polyphénols totaux</i>	73
<i>II.3.2. Dosage des flavonoïdes</i>	73
<i>II.3.3. Courbes d'étalonnages des dosages des PPT et FVT</i>	74
<i>II.3.3.1. Courbe d'étalonnage pour le dosage de polyphénols totaux (PPT)</i>	74
<i>II.3.3.2. Courbe d'étalonnage pour le dosage de flavonoïdes totaux (FVT)</i>	75
<i>II.3.4. Chromatographie liquide de haute performance (HPLC)</i>	75
<i>II.3.4.1. Appareillage</i>	76
<i>II.3.4.2. Analyse des composés phénoliques par HPLC</i>	77
<i>II.5. Evaluation de l'activité antioxydante</i>	78
<i>II.5.1. Pouvoir antioxydant total</i>	78
<i>II.5.2. Test DPPH</i>	78
<i>II.5.3. Pouvoir réducteur (FRAP, Ferric Reducing Antioxydant Power)</i>	79
<i>II.5.4. Test ABTS</i>	80
<i>II.4.5. Test de blanchiment de β-carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique</i>	81
<i>II.6. Evaluation de l'activité antibactérienne</i>	82

<i>II.6.1. Test de diffusion en milieu gélosé.....</i>	<i>82</i>
<i>II.6.2. Détermination de la CMI et de la CMB</i>	<i>83</i>
<i>II.7. Analyse statistique</i>	<i>83</i>
<i>Résultats et Discussions</i>	<i>84</i>
<i>I. Rendements des extraits bruts.....</i>	<i>85</i>
<i>II. Compositions phytochimiques</i>	<i>85</i>
<i>II.1. Teneurs en phénols totaux</i>	<i>85</i>
<i>II.2. Teneurs des flavonoïdes.....</i>	<i>87</i>
<i>II.3. Résultats des chromatogrammes d'étalons.....</i>	<i>88</i>
<i>II.4. Résultats des courbes d'étalonnages des polyphénols standards</i>	<i>92</i>
<i>II. 5. Chromatogrammes HPLC des extraits méthanoïques des plantes étudiées.....</i>	<i>96</i>
<i>III. Résultats de dosage des activités antioxydantes in vitro.....</i>	<i>98</i>
<i>III.1. Résultats de l'évaluation d'activité antioxydante totale</i>	<i>99</i>
<i>III.2. Résultats de l'évaluation d'activité antioxydante DPPH.....</i>	<i>99</i>
<i>III.3. Pouvoir réducteur du fer (Test FRAP: Ferric Reducing Antioxydant Power).....</i>	<i>100</i>
<i>III.4. Résultats d'inhibition de radical ABTS</i>	<i>102</i>
<i>III.5. Résultats de l'évaluation d'activité antioxydante de test β-carotène.....</i>	<i>103</i>
<i>VI. Evaluation de l'activité antibactérienne</i>	<i>104</i>
<i>VI. 1. Activité antibactérienne des extraits bruts par la méthode des disques.....</i>	<i>104</i>
<i>VI.2. Détermination de la CMI et la CMB</i>	<i>105</i>
<i>CONCLUSION GENERALE.....</i>	<i>106</i>
<i>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</i>	<i>107</i>
<i>Références bibliographiques</i>	<i>خطأ! الإشارة المرجعية غير معروفة.</i>
<i>Publication</i>	<i>110</i>

Liste des figures

Figure 01. Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie	07
Figure 02. Déséquilibre Antioxydant /Oxydant.....	10
Figure 03. les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.....	12
Figure 04: Action de l'antioxydant au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène..	12
Figure 05. Cycle oxydo-réducteur du glutathion.....	14
Figure 06. Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate.....	20
Figure 07. Structures des squelettes de base des flavonoïdes	27
Figure 08. Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B).....	28
Figure 09. Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques.....	29
Figure 10. Les caractéristiques structurales des flavonoïdes avec une activité de piégeage des radicaux libres élevée	30
Figure 11. Structures des flavonoïdes isolés à partir des Tamarix L.....	48
Figure 12. Structures des coumarines isolées à partir des Tamarix L	49
Figure13. Structures des acides galliques et ses dérivés isolés à partir du Tamarix L.....	53
Figure 14. Structures des acides ellagiques et ses dérivés isolés à partir du Tamarix L.....	54
Figure15. Structures des acides cinnamiques et ses dérivés isolés à partir du Tamarix L.....	54
Figure 16. Structures des lignanes isolés à partir du Tamarix L.....	55
Figure 17. Structures de lactones phénoliques isolées à partir du Tamarix L.....	55
Figure 18. Structures des alkyls phénoliques isolés à partir du Tamarix L.....	56
Figure 19. Structures des composés aliphatiques isolés à partir du Tamarix L.....	57
Figure 20. Structures des tritèrènes isolés à partir du Tamarix L.....	59
Figure 21. Schéma illustrant la démarche expérimentale suivie dans cette étude.....	70
Figure 22. les étapes de préparation des différentes phases de la plante.....	72
Figure 23. Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux.....	74
Figure 24. Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux.....	75
Figure 25. Structure chimique du radical DPPH [•] et de sa forme réduite.....	79
Figure 26. Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe Fe(III)-T.PTZ et un antioxydant (AH).....	80
Figure 27. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux	86
Figure 28. Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes.....	87

Figure 29. Profil du chromatogramme du mélange des étalons	88
Figure 30. Chromatogramme d'acide ascorbique (solution standards).....	89
Figure 31. Chromatogramme d'acide gallique (solution standards).....	89
Figure 32. Chromatogramme d'acide chloreghénique (solution standards).....	90
Figure 33. Chromatogramme d'acide caféique (solution standards).....	90
Figure 34. Chromatogramme de vanilline (solution standards).....	91
Figure 35. Chromatogramme de la rutine (solution standards).....	91
Figure 36. Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique.....	92
Figure 37. Courbe d'étalonnage d'acide gallique.....	92
Figure 38. Courbe d'étalonnage d'acide chloreghénique.....	93
Figure 39. Courbe d'étalonnage d'acide caféique.....	93
Figure 40. Courbe d'étalonnage de vanilline.....	94
Figure 41. Courbe d'étalonnage de rutine.....	94
Figure 42. Le chromatogramme HPLC des extraits méthanoliques des feuilles de <i>Tamarix gallica</i> à 268 nm.....	96
Figure 43. Chromatogramme HPLC de l'extrait méthanoïque de feuilles de <i>Tamarix articulata</i> à 268 nm.....	97
Figure 44. Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• des extraits testés.....	100
Figure 45. Courbe d'étalonnage de FeSO ₄ de test FRAP.....	101
Figure 46. Activité de réduction ferrique de test FRAP des extraits des feuilles de plantes étudiés et le standards Quercétine.....	101
Figure 47. Effet des extraits des feuilles des variétés méthanoïques des plantes étudiées sur l'inhibition de radical ABTS.....	102

Liste des schémas

<i>Schéma 01: Aire d'origine de la répartition du genre Tamarix L.....</i>	<i>60</i>
<i>Schéma 02. La forme des fleurs chez les Tamarix L.....</i>	<i>61</i>
<i>Schéma 03. La forme des grains de certaines espèces du genre Tamarix L.....</i>	<i>61</i>
<i>Schéma 04. Tamarix gallica</i>	<i>62</i>
<i>Schéma 05. Description botanique du Tamarix gallica.....</i>	<i>63</i>
<i>Schéma 06. Tamarix articulata.....</i>	<i>63</i>
<i>Schéma 07. Description botanique du Tamarix articulata.....</i>	<i>65</i>
<i>Schéma 08: l'effet antibactérien des extraits méthanoïques.....</i>	<i>105</i>

Liste des tableaux

Tableau 01. Classification des Tamaricaceae selon Cronquist (1988).....	38
Tableau 02. Classification des Tamaricaceae selon APG 2003.....	39
Tableau 03. Les différents flavonoïdes isolés à partir du genre Tamarix L.....	42
Tableau 04. Les composants majoritaires d'huile essentielle du Tamarix boveana.....	49
Tableau 05. Divers métabolites secondaires isolés à partir du genre Tamarix L.....	51
Tableau 06. Les différentes espèces du genre Tamarix L en Algérie.....	60
Tableau 07. La classification de Tamarix gallica L.....	62
Tableau 08. La classification de Tamarix articulata.....	64
Tableau 09. Propriétés de quelques solvants utiles en chromatographie phase liquide.....	77
Tableau 10. Rendements des extraits bruts obtenus.....	85
Tableau 11. Résultats de Teneur en phénols et teneur en flavonoïdes des extraits de feuilles de Tamarix articulata et Tamarix gallica.....	86
Tableau 12. Le temps de rétention, le coefficient de corrélation et l'équation des courbes d'étalonnage des étalons.....	95
Tableau 13. Quantification des composés phénoliques individuels identifiés de l'extrait de Tamarix gallica à 268 nm en utilisant le système HPLC.....	96
Tableau 14. Quantification des composés phénoliques individuels identifiés de l'extrait de Tamarix articulata à 268 nm en utilisant le système HPLC.....	98
Tableau 15. Activité de piégeage de radical DPPH (IC50 en µg / ml) et l'activité antioxydante totale (mg GAE / g DW) des extraits méthanoïques des feuilles de Tamarix gallica et Tamarix articulata.....	99
Tableau 16. Les activités antioxydantes des extraits méthanoïques des plantes étudiées pour le dosage FRAP et le dosage ABTS.....	102

Tableau 17. Activités de blanchiment du β -carotène des extraits de feuilles de *Tamarix gallica* et de *Tamarix articulata*. L'activité antioxydante était exprimée en% de valeurs IC_{50} d'inhibition ($\mu\text{g} / \text{ml}$).....103

Tableau18. Diamètre de la zone d'inhibition des extraits méthanoïques des plantes étudiées en fonction de concentration (100 et 200 mg/ml).104

Tableau 19. Valeurs des concentrations minimales inhibitrices et concentrations minimales bactéricides.....105

Abréviations

ABTS : acide 2,2'-azinobis 3-ethylbenzo-triazoline-6-sulphonate

ADN : acide désoxiribonucléique

AE : efficacité antiradicalaire

ATP : Adénosine triphosphate

BHA : butylhydroxyanisole

BHT : butylhydroxytoluène

CAT : capacité antioxydante totale (*Total antioxidant capacity*)

C4H : cinnamate 4-hydroxylase.

ClO⁻ : hypochlorite

DMPD : N, N- diméthyl- α -phenylenediamine

DO : densité optique

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

EAA : équivalents d'acide ascorbique

EAG : équivalent d'acide gallique

EC : équivalent de catéchine

EC50 (IC50) : concentration inhibitrice à 50 %

EC-SOD : superoxyde dismutase extracellulaire

EDTA : acide éthylène diamine tétracétique

ERO : espèces réactives de l'oxygène

FRAP : Capacités réductrices ferriques d'antioxydants (*Ferric reducing/antioxidant power*)

HOCl : acide hypochloreux

GSH : glutathion réduit

GSH-Px : glutathion peroxydes

GSSG : glutathion oxydé

GST : glutathion-S-transférase

LDL : lipoprotéines à basse densité (*low density lipoproteins*)

MDA : malonaldéhyde

min : minute

MS : matière sèche

NADPH : nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate (sous sa forme réduite)

ONOOH : nitroperoxyde

ORAC : Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

PAL : phénylalanine ammonia-lyase

ROOH : peroxydes organiques

TEAC : capacité antioxydante équivalente de Trolox (*trolox-equivalent antioxidant capacity*)

TEC50 : temps nécessaire pour aboutir la concentration EC50

TOSC : Capacité du piégeage des oxy-radicaux totaux (*Total Oxyradical Scavenging Capacity*)

Trolox : un analogue de vitamine E (Acide 6-hydroxy-2, 5, 7, amidinopropane)

UV : ultraviolet

XO : xanthi

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Depuis toujours, les hommes ont utilisé leur environnement et en particulier les plantes qui forment des ressources riches en produits naturels utilisés depuis des siècles pour soigner diverses maladies [1]. Il est estimé qu'environ 60% à 75% de la population mondiale et 80% de la population Africaine ont recouru à la médecine traditionnelle pour répondre à leurs besoins pour lesquelles la majeure partie des thérapies implique l'exploitation de leurs principes actifs [2, 3, 4]. Cela s'explique aussi par le fait que' elles produisent une large gamme de composés phytochimiques qui sont utilisés par la plante comme un produit chimique de défense contre les prédateurs.

Selon des statistiques récentes, on estime que deux tiers des médicaments actuels ont une origine naturelle [5] et sont obtenus par héli-synthèse, à partir d'un pharmacophore ou par modification des produits naturels, composés issus des biotechnologies, des vaccins, composés d'origine végétale, microbiologique ou animale. Seul un tiers des médicaments commercialisés possède donc une origine purement synthétique [6], par contre, environ 60% des médicaments anticancéreux et 75% de composés pour les maladies infectieuses sont des produits naturels ou leurs dérivés [7,8]. De plus, sur les 300 000 espèces végétales recensées, on estime que seules 15% d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique, dont 6% pour leurs activités biologiques [9]. Ce qui implique que les plantes sont des réservoirs de molécules bioactives encore peu explorées. Les substances naturelles et les plantes en particulier représentent une immense source de composés phénoliques (acide phénolique, flavonoïdes, flavonols, tannin condensé...). L'extraction des bruts, naturels de ces composés et l'isolation à partir d'espèces de plantes utilisées en médecine traditionnelle peut être à l'origine de ressources prolifiques de nouveaux médicaments [10].

Aujourd'hui, les agents antioxydants de source naturelle ont suscité un intérêt particulier car ils peuvent protéger le corps humain contre les maladies causées par les radicaux libres, sans effets secondaires [11]. Pour cette raison, la recherche de molécules bioactives d'origine naturelle a constitué d'ailleurs un des axes prioritaires ces dernières années. La recherche de molécules bioactives à partir des plantes peut s'effectuer selon plusieurs stratégies : une approche ethnopharmacologique qui consiste à utiliser le savoir des médecines traditionnelles, une approche chimiotaxonomique qui s'intéresse à des taxons connus pour renfermer des métabolites secondaires particuliers (composés phénoliques), ou encore un criblage systématique des espèces et toute combinaison des précédentes.

Une des particularités des polyphénols réside dans leur incroyable diversité, puisque l'on dénombre à l'heure actuelle plus de 8000 composés phénoliques, dont 5000 pour la sous classe des flavonoïdes. Leurs effets positifs qu'ils exercent sur l'organisme humain en leur qualité d'antioxydants ont commencé à être reconnus, notamment dans le domaine de la médecine préventive. En effet, les polyphénols possèdent non seulement des propriétés anticancéreuses et antiscélératiques mais aussi la faculté de combattre les caries et les diarrhées. Ils peuvent également participer à la bonne conservation de certains aliments transformés, comme l'huile d'olive, en limitant l'oxydation des lipides qu'ils contiennent.

Vu l'importance que présente le genre *Tamarix* L (10 espèces) dans les régions du Sud-est d'Algérie, notre travail de thèse qui s'inscrit dans ce contexte général a pour objectif d'étudier la composition phytochimique et la quantification de composition des polyphénols par HPLC des extraits des feuilles des deux variétés *Tamarix gallica* (tarfa) et *Tamarix articulata* ou *aphylla* (tarfa verte). Le second objectif est d'évaluer l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extrait méthanoïque des feuilles de *Tamarix gallica* et *Tamarix articulata*.

Les polyphénols qui sont le sujet d'étude sont extraits à partir des feuilles des deux variétés *Tamarix* L de la région d'EL Oued.

Ce manuscrit est divisé en deux parties :

- La première partie présente deux chapitres:
 - l'étude des radicaux libres et la présentation des composés phénoliques qui permettront de décrire les métabolites secondaires principaux et leurs activités biologiques font l'objet du premier chapitre.
 - Le deuxième chapitre est consacré au rappel des principales données bibliographiques et à la présentation botanique de la famille des *Tamaricacées* ainsi que les deux variétés qui sont étudiées.
- La deuxième partie couvre :
 - l'ensemble des travaux personnels expérimentaux, les principales méthodes, les matériels, les produits chimiques et les réactifs utilisés.
 - les résultats acquis lors du travail de thèse, qui sont en l'occurrence les résultats de la préparation de l'extrait des feuilles de deux variétés sélectionnées, l'analyse phytochimique et en deuxième lieu la quantification des composés phénoliques déterminés par HPLC. Les résultats de l'étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extrait des feuilles des variétés sélectionnées prendront place dans ce chapitre.

On terminera ce travail de thèse par une conclusion générale donnant un récapitulatif sur les principaux résultats obtenus durant ce travail ainsi que les perspectives qui feront l'objet de travaux ultérieurs et une liste complète des références bibliographiques.

Partie I

Étude bibliographique

Chapitre I

Radicaux libres, stress oxydatif et antioxydants

I. Radicaux libres :

I.1. Paradoxe de l'oxygène :

L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies, cependant, l'oxygène peut être également une source d'agression pour ces organismes. En effet des dérivés hautement réactifs de l'oxygène peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons U.V et des radiations ionisantes. Les conséquences au niveau de l'organisme se font ressentir sur l'ADN, les lipides et les protéines [12].

I.2. Les radicaux libres ou les espèces réactives oxygénées:

Un radical est une molécule caractérisée par la présence d'un électron libre (célibataire) sur ses orbitales électroniques externes qui leur confère une très grande instabilité. Elles ont la possibilité de réagir avec de nombreux composés dans des processus le plus souvent non spécifiques, donc leur durée de vie en solution est très courte [13]. Aussi, l'oxygène est un radical libre peu réactif, présent le plus souvent sous forme de dioxygène. Dans les conditions physiologiques, 2% à 5% de l'oxygène utilisés par les mitochondries sont partiellement réduits par des électrons qui s'échappent des transporteurs de la chaîne respiratoire en formant ainsi des dérivés plus réactifs appelés espèces réactives oxygénées (ERO) [14]. Ces molécules sont une famille d'entités chimiques regroupant les radicaux libres oxygénés (espèces chimiques possédant un électron célibataire non apparié) comme l'anion du superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), du radical hydroxyle (HO^{\bullet}), le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) ... et les dérivés de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène (ne possédant pas d'électron célibataire). Ce ne sont pas des radicaux libres mais elles sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux (anion peroxyde O_2^{-2} , peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), peroxydinitrite $ONOO^-$ [15-16].

La figure 01 montre l'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie.

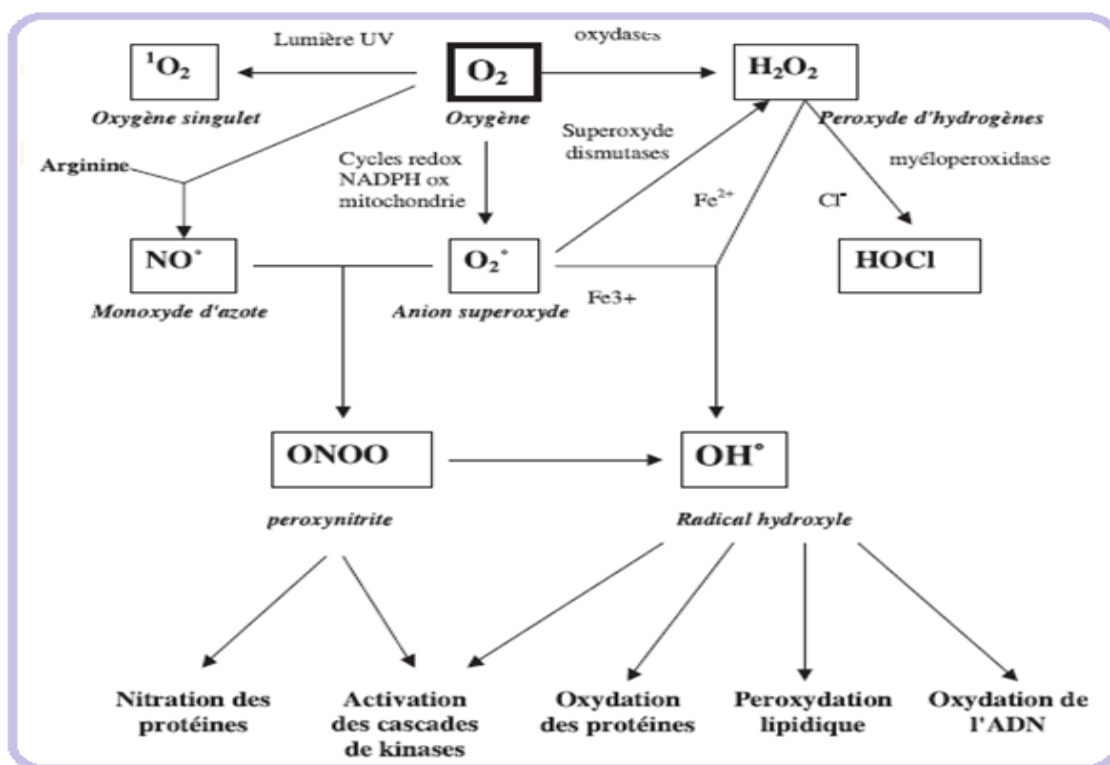


Figure 01. Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie [16].

Parmi tous les différents dérivés réactifs de l'oxygène susceptibles de se former dans les cellules, on peut distinguer deux ensembles, l'un des composés directement dérivés de la molécule de dioxygène, qui joue un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons ERO primaires, l'autre, dit ERO secondaires, issus de la réaction des ERO primaires avec des entités biochimiques cellulaires (lipides, protéines, glucides, etc...) [16,17].

I.2.1. La réactivité d'ERO :

La réactivité des espèces chimiques oxygénées est très variable selon la nature du radical. En effet, l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sont très sélectifs dans leurs réactions avec les molécules biologiques et ne vont par exemple, interagir qu'avec quelques enzymes [18]. Au contraire, des radicaux comme les peroxydes (ROO^{\bullet}) ou surtout le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) sont extrêmement réactifs avec la plupart des molécules des tissus vivants [16].

Ainsi on peut trouver l'anion radicalaire superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) ou le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) qui ne sont pas très réactifs, mais constituent des précurseurs pour d'autres espèces plus réactives [16].

I.2.2 Principales sources d'espèces réactives de l'oxygène :

➤ Sources exogènes d'ERO :

La production exogène des ERO résultent de l'exposition aux rayons ionisants (exposition importante au soleil, radioactivité artificielle ou naturelle), aux métaux de transition ou à l'oxygène en quantité excessive, la pollution, la prise de certains médicaments (par exemple le paracétamol), le contact avec certains pesticides et solvants, la consommation du tabac et d'alcool, la pratique du sport intensif et tout processus susceptible de surcharger les réactions de détoxification hépatique, notamment une perte de poids importante [19, 20-24].

➤ Sources endogènes d'ERO :

Le métabolisme aérobie de chaque organisme permet de produire des ERO d'une manière endogène, comme des sous-produits des chaînes de transport des électrons de la respiration cellulaire dans les mitochondries [24]. Elles sont aussi produites dans différentes réactions enzymatiques.

De nombreux systèmes enzymatiques identifiés dans les cellules sont également capables de générer des DRO dans les corps humain [25], comme par exemple :

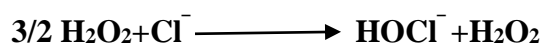
- Les NADPH oxydases qui sont des enzymes présentes dans la paroi vasculaire et qui génèrent ($O_2^{\bullet-}$) en utilisant NADH ou NADPH comme substrat.
- Lors du métabolisme de l'acide arachidonique, où ce dernier peut être oxydé soit par les cyclooxygénases, soit par les lipooxygénases (métallo-enzymes à fer), pour former entre autres des hydroperoxydes qui sont des précurseurs de leucotriènes, puissants médiateurs de l'inflammation.

De plus, dans l'organisme, l'oxygène est réduit à 95 % dans les mitochondries ("centrale énergétique de la cellule") par voie enzymatique en molécule non toxique comme H_2O . Cependant, il peut subir une réduction monoélectronique et former une espèce beaucoup plus réactive comme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). Cet anion n'est pas le radical le plus délétère, cependant, il peut donner naissance comme indiqué précédemment à des espèces beaucoup plus réactives comme le radical hydroxyle OH^{\bullet} . Ces ERO mitochondriales pourraient intervenir dans l'oxydation des LDL [26].

I.3. Intérêts biologiques des radicaux libres dans la physiologie cellulaire

I.3.1. La phagocytose

Les radicaux libres jouent un rôle essentiel dans le bon déroulement de la réaction immunitaire. La phagocytose des bactéries et des parasites par les macrophages ou les polynucléaires s'accompagne d'une production d'espèces réactives de l'oxygène si brutale et intense qu'elle est connue sous le nom « Bouffée respiratoire » puisqu'elle s'accompagne d'une augmentation transitoire de la consommation d'oxygène. Au sein de phagosome, l'activation de la NADPH oxydase, l'action des superoxydes dismutases (SOD) et la NO synthase (NOS) aboutissent à un mélange très corrosif de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $HO\cdot$, $ONOOH$. L'eau oxygénée (H_2O_2), en présence de chlore et sous l'effet de la myeloperoxydase, donnera naissance à l'acide hypochlorique $HOCl$, c'est l'oxydant microbicide le plus puissant [27].



I.3.2. La signalisation cellulaire :

En dehors de leurs actions délétères, les ERO peuvent agir en tant que molécules de signal et intervenir dans la communication intracellulaire et intercellulaire. Ils participent à l'expression de certains gènes et à leur régulation. Cela leur confère un rôle important dans les phénomènes de croissance et de mort cellulaire.

Les mécanismes de communication cellulaire faisant intervenir les radicaux libres ne sont pas encore élucidés. En résumé :

- Les radicaux libres joueraient un rôle dans la régulation de l'expression des gènes. La présence de radicaux libres dans le milieu extracellulaire est à l'origine de l'activation de certains facteurs de transcription par des mécanismes encore mal compris. Il en résulte ensuite l'expression des gènes correspondants [28].
- Les radicaux libres peuvent intervenir dans la prolifération, la différenciation, l'adhésion et la migration [29].
- Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires [26].

- Les radicaux libres jouent un rôle dans la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certaines neurones et notamment celles de la mémoire [26].

II. Le stress oxydant :

Les EOR et ERN sont connues pour jouer un double rôle dans les systèmes biologiques, puisqu'ils peuvent être à la fois nocifs mais aussi bénéfiques, voire indispensables pour les organismes vivants [30] :

- Bénéfiques, lorsqu'ils sont impliqués dans des rôles physiologiques au niveau des réponses cellulaires telles que la lutte contre des agents infectieux et leur fonction dans les systèmes de signalisation cellulaire,
- Nocifs, lorsqu'il y a un déséquilibre entre la balance des ERO et ERN et les systèmes de défense, avec comme conséquence l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (ADN, protéines, lipides) en lien avec l'apparition de nombreuses maladies graves (cancer, artériosclérose, arthrite, maladies neurodégénératives): c'est le stress oxydatif [31].

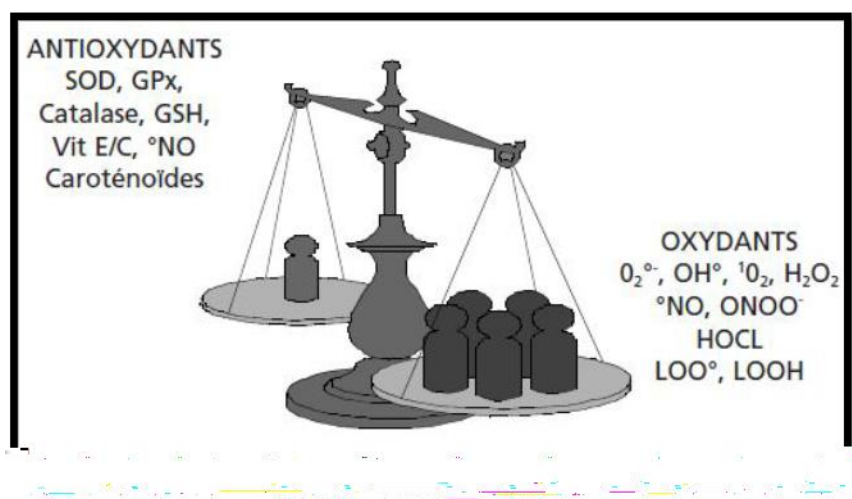


Figure 02: Déséquilibre Antioxydant /Oxydant [32].

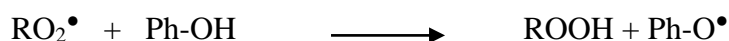
III. Les antioxydants :

Dans des conditions normales, le métabolisme aérobie chez les mammifères génère des substances réactives de l'oxygène, qui sont très dommageables pour les cellules de l'organisme. Cependant, en guise de protection, les cellules possèdent des mécanismes de défense endogènes enzymatiques et non-enzymatiques qui, de manière générale, suffisent à neutraliser et à dégrader les radicaux libres toxiques pour les tissus résultant du métabolisme aérobie et que l'on appelle antioxydant [33-36].

III.1. Définition :

Selon les références bibliographiques [37-39], un antioxydant est n'importe quelle substance, qui, lorsqu'elle est présente en concentrations faibles, comparées à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de façon significative ou empêche, l'oxydation de ce substrat.

On appelle **antioxydants primaires**, les composés donneurs d'atome d'hydrogène conduisant à un radical libre stable, c'est-à-dire beaucoup moins réactif que les radicaux libres porteurs de chaînes. Ce sont le plus souvent des phénols encombrés ou des amines aromatiques secondaires. On les appelle aussi antioxydants par rupture de chaîne ou désactivateurs de radicaux libres. En présence d'un phénol Ph -OH, par exemple, on peut présenter le processus, comme suit [40] :



Comme on l'a vu auparavant, l'hydroxyle est le radical le plus réactif et le plus dangereux dans l'organisme. La neutralisation de produits des réactions radicalaires de HO[•] est considéré comme une réaction importante et serait à la base de l'effet des antioxydants contenus dans l'alimentation sur l'incidence de certaines maladies [41-42].

Les peroxydes sont des produits primaires de l'oxydation. Les décomposeurs de peroxydes (sans formation de produits radicalaires) désactivent ces derniers ; on les appelle parfois **antioxydants secondaires** parce qu'ils suppriment les peroxydes qui sont des amorceurs secondaires de l'oxydation. Ce sont, par exemple, des sulfites, des phosphates ou des thioesters [39].

III.2. Systèmes de défense :

Afin d'empêcher la formation des radicaux libres et de limiter l'oxydation qui provoque les dommages oxydants dans les cellules, l'organisme est équipé de plusieurs systèmes de défense, à savoir : enzymatiques et non enzymatique (moléculaires naturels et synthétiques) (**Figure 03**).

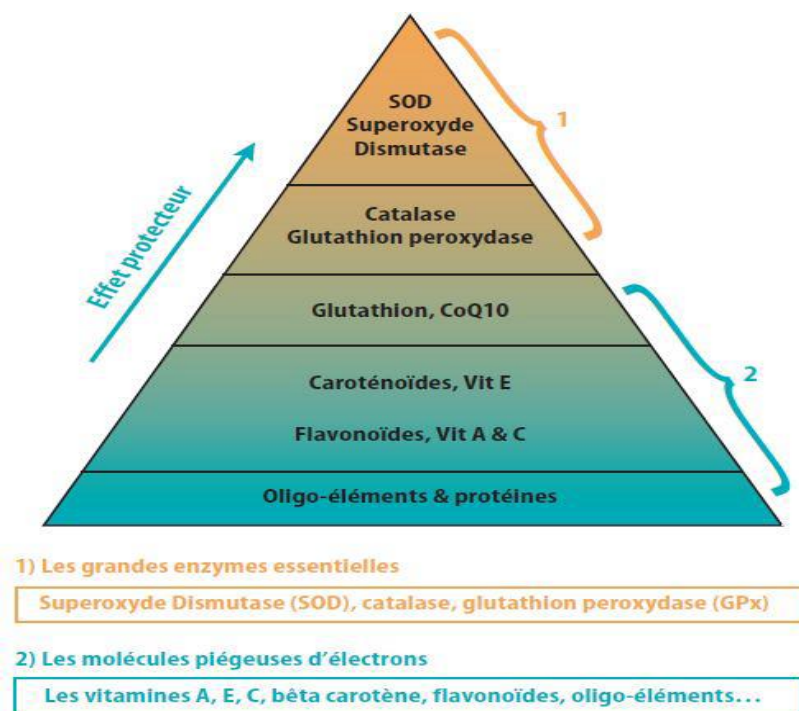


Figure 03 : les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques [49].

III.2.1. Le Système antioxydant enzymatique

Les protéines enzymatiques antioxydantes constituent la première barrière de cette défense antioxydante, qui est constituée de trois métalloenzymes essentielles: les superoxydes dismutases, la catalase et les glutathions peroxydases.

Leurs activités et leurs localisations dans la cellule sont complémentaires et assurent l'élimination des anions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène dans tous les compartiments intracellulaires.

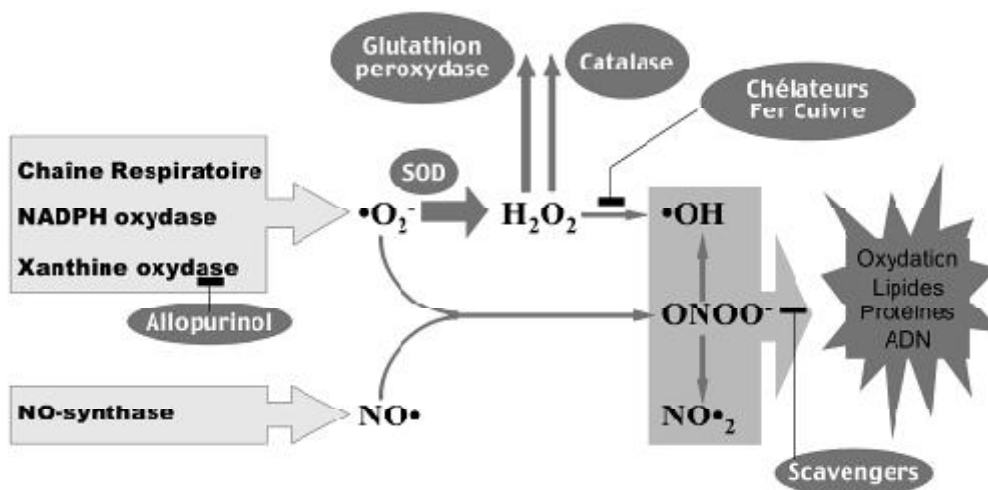


Figure 04: Action de l'antioxydant au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène [50].

III.2.1.1-Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases ou SOD (EC 1.15.1.1) sont des antioxydants enzymatiques ubiquitaires. Ces métalloprotéines représentent l'une des premières lignes de défense contre le stress oxydant en assurant l'élimination de l'anion superoxyde par une réaction de dismutation en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire [51].

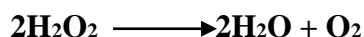
Ces enzymes accélèrent la vitesse de cette réaction spontanée rendant très rapide la disparition du superoxyde mais en générant le peroxyde d'hydrogène. Celui-ci est un composé oxydant diffusible et dangereux à distance [52] mais il peut être ultérieurement catabolisé par la catalase et les glutathion peroxydases.

Chez l'homme, trois isoformes de l'enzyme SOD qui diffèrent par leur structure et leur localisation cellulaire ont été caractérisées de façon biochimique et moléculaire. La Cu/Zn-SOD ou la SOD1 cytosolique, et la ECSOD ou la SOD3 extracellulaire, utilisent le cuivre et le zinc comme cofacteurs nécessaires à l'activité enzymatique, lorsque la SOD2, mitochondriale, utilise le manganèse [53].

III.2.1.2. Catalase

La catalase (EC1.11.1.6) est une enzyme responsable de la détoxification du peroxyde d'hydrogène produit dans la condition physiologique [54]. Elle est localisée principalement dans les peroxysomes, mais aussi dans les mitochondries et le cytoplasme [55].

La réaction catalysée par cette enzyme est une dismutation du peroxyde d'hydrogène :



La Catalase est formée de quatre sous-unités, chaque sous-unité comporte un groupement ferriprotoporphyrine dans son site actif avec un atome de Fer à l'état Fe^{3+} et une molécule de NADPH. La fixation du NADPH par la catalase lui confère une protection contre l'attaque de l' H_2O_2 [39].

La catalase et la glutathion peroxydase ont des rôles protecteurs similaires et leur contribution relative est assez variable. La catalase est surtout active lorsque le niveau de stress oxydatif est élevé ou que la quantité de glutathion peroxydase est limitée, elle joue un rôle significatif en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier [57].

III.2.1.3. Glutathions peroxydase (GPx)

Le glutathion peroxydase (EC 1.11.1.19) est une des enzymes tétramérique à sélénium qui peut réduire le peroxyde d'hydrogène en eau, en utilisant les capacités réductrices du couple.

Glutathion /glutathion disulfide (GSH/GSSG) [57,58].

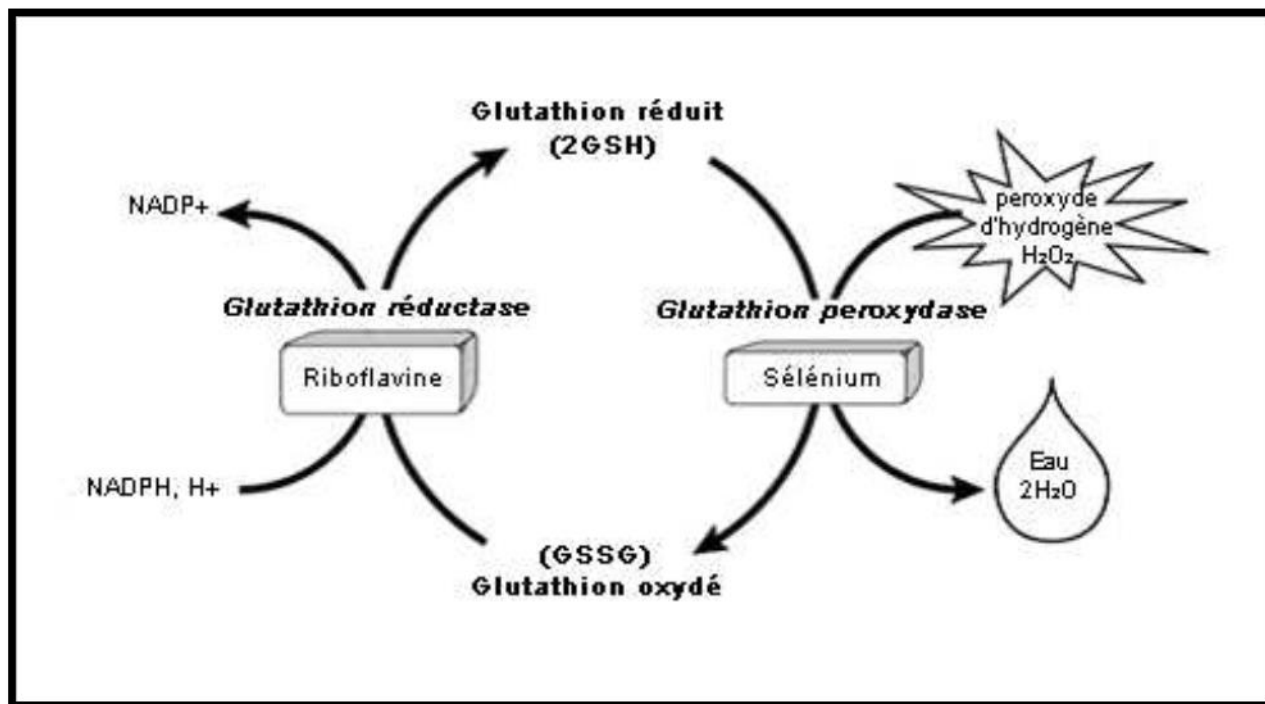


Figure 05 : Cycle oxydo-réducteur du glutathion [59].

Elles permettent également de limiter la propagation des réactions radicalaires en chaîne, en réduisant les peroxydes instables en acide gras hydroxylés. Ce système ne fonctionne que si le GSSG formé est continuellement réduit en GSH, ce qui est assuré par la glutathion réductase en présence de NADPH, ce dernier pouvant être lui-même régénéré par l'intermédiaire d'un couplage métabolique avec la voie des pentoses phosphatés [60].

Chez les Eucaryotes, on distingue cinq isoenzymes de la GPx qui sont présentes dans les liquides extracellulaires et dans les cellules au niveau du cytosol et des mitochondries: La GPx 1 cytoplasmique et mitochondriale, la GPx2 gastro-intestinale, la GPx3 plasmique, la GPx 4 ou PHGPx localisée à l'interface de la membrane interne du cytoplasme et la GPx5 épидidymaire. La plus abondante est la GPx 1 et elle est exprimée dans la plupart des cellules [28].

A l'activité de Séléno-dépendante, il faut ajouter les GSH-S-transférases, protéine sans sélénium. Ces enzymes constituent une classe formée d'un très grand nombre d'isoenzymes.

Les glutathions transférases possèdent aussi une activité peroxydasique vis-à-vis des peroxydes organiques mais pas vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène [61].

III.2.2. Le système antioxydant endogène non enzymatique

Ce groupe de systèmes antioxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, l'acide lipoïque et le coenzyme Q.

III.2.2.1. Glutathion

Le GSH est un tripeptide (Lγglutamy-l-cystéinyl-glycine) impliqué dans de nombreux processus au niveau intracellulaire. Son rôle dans la détoxification de xénobiotique [62] et dans la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre l'oxydation a été bien établi [63].

Dans des conditions physiologiques, le glutathion sous forme réduite (GSH) représente la très grande majorité du glutathion total (90 à 98%). Lors d'un stress oxydant, le GSH est oxydé avec la formation de pont disulfure, GSSG, et/ou de pont disulfure mixte, GSSR (R étant fixé à un autre thiol radicalaire) [63]. Le glutathion agit également comme Co-substrat d'enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase, la glutathion réductase et la transférase [64]. Il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydant telles que la vitamine C ou la vitamine E [65].

III.2.2.2. L'acide urique

Le tissu humain ne possède pas l'enzyme nécessaire à la dégradation de l'acide urique en allantoïne, c'est-à-dire en l'urate oxydase. En conséquence, l'acide urique s'accumule comme produit final de catabolisme des purines, et est présent en quantité importante dans le plasma humain avant d'être éliminé par voie rénale. La perte de cette enzyme au cours de l'évolution pourrait avoir des effets bénéfiques puisqu'il a été démontré que l'acide urique possédait des propriétés antioxydantes [66]. A un pH physiologique l'acide urique est majoritairement ionisé sous forme d'urate, un piègeur puissant de radicaux ($\cdot\text{OH}$, $\text{ROO}\cdot$, $\text{NOO}\cdot$...) [51].

III.2.2.3. Bilirubine

La bilirubine est un produit terminal de la dégradation de l'hème et résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine par les cellules réticuloendothéliales. Ce composé liposoluble est capable de piéger les radicaux peroxyde, l'oxygène singulet et le radical hydroxyle, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques

radicales [67]. La bilirubine est oxydée par certaines espèces recyclées par la biliverdine réductase [68].

III.2.2.4. Acide lipoïque

C'est un antioxydant puissant qui peut régénérer d'autres antioxydants, telles que les vitamines C et E [70]. Il est capable de piéger le HO[•], ROO[•], HOCl[•] et O₂ [70], de chélate des métaux lourds, réduit la glycation et interviendrait dans la réparation de l'ADN. Il existe sous forme oxydée et sous forme réduite. Produit en petite quantité par le foie, il se trouve également dans certains aliments (la levure, la viande de bœuf, l'épinard, le brocoli...) [71].

III.2.2.5. Coenzyme Q10

La coenzyme Q10 appelée ubiquinone en raison de son ubiquité dans les cellules, est un dérivé benzoquinolique avec une longue chaîne latérale isoprénique [51]. Elle est hautement soluble dans les lipides, et se retrouve dans la quasi-totalité de la membrane cellulaire, ainsi que les lipoprotéines [72]. La CoQ10 synthétisée par l'organisme à partir du mévalonate qui est également impliqués dans la formation du cholestérol [73]. Cet antioxydant se trouve aussi dans des aliments comme les noix, le foie, les sardines, des grains complets et certains légumes.

L'action biochimique primaire de la CoQ10 est une coenzyme pour de nombreuses N enzymes dans la chaîne de transport d'électrons, une série d'oxydoréductions de réaction impliquée dans la respiration cellulaire, où la présence de la coenzyme Q dans la membrane mitochondriale interne est nécessaire pour la conversion de l'énergie provenant des glucides et des lipides dans la synthèse d'ATP [72]. La CoQ10 contribue également à prolonger l'effet antioxydant de la vitamine E. Tous les processus physiologiques qui exigent une dépense énergétique requièrent la CoQ10 [74].

III.2.3. Le système antioxydant exogène

L'organisme possède une seconde ligne de défense « les piègeurs de radicaux libres » qui sont des composés apportés, pour la plupart, par l'alimentation et dont le rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des ERO, limitant ainsi toute atteinte de l'intégrité cellulaire [76].

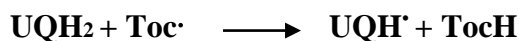
III.2.3.1. Vitamine E

La vitamine E fait partie de la famille des tocophérols, cette famille comprend quatre substances (α , β , γ , δ), l' α -tocophérol est la forme la plus active [76]. Cette vitamine est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble dans le plasma.

Le Tocophérol est capable d'une part, de piéger chimiquement l'oxygène singulet en s'oxydant en quinone, et d'autre part, de réagir avec le radical hydroxyle HO \cdot . Mais son principal rôle biologique est de réagir avec les radicaux peroxydes ROO \cdot pour former un radical tocophéryle [28].



Le tocophérol peut être régénéré par la vitamine C, le GSH et l'ubiquinone [77]. La régénération par l'ubiquinone s'effectue selon la réaction suivante.



III.2.3.2. Vitamine C

La vitamine C, appelée aussi acide L-ascorbique, est un antioxydant hydrosoluble, qui se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire. Elle peut piéger directement l'anion superoxyde O $^{2\cdot}$, le radical hydroxyle HO \cdot , l'oxygène singulet et réduire le peroxyde d'hydrogène en eau via l'ascorbate peroxydase [78]. En plus, elle permet la régénération de la forme non radicalaire de la vitamine E. La vitamine C a notamment un rôle antioxydant au niveau des tissus oculaires, en particulier la rétine [79]. Elle peut recycler l' α -tocophérol pour aider à prévenir l'oxydation des lipides [80]. L'acide ascorbique peut agir en tant qu'antioxydant seulement en absence de métaux de transitions sous forme libre [78].

De nombreux avantages pour la santé ont été attribués à l'acide ascorbique à savoir antioxydant, anti-athérogène et anticancérogène.

III.2.3.3. β carotène

Le β -carotène appartient à la grande famille des caroténoïdes, constituée de plus de 600 pigments identifiés dans de nombreux fruits et légumes, qui possèdent des propriétés anti oxydantes. Le β -carotène est notamment capable de piéger les radicaux hydroxydes HO \cdot et peroxydes ROO \cdot et ainsi d'inhiber les chaînes de peroxydations lipidiques. Il neutralise également l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$. En outre le β -carotène, tout comme l' α -carotène et β -

cryptoxanthine, sont des caroténoïdes précurseurs de la vitamine A(ou rétinol) chez l'homme, de sorte que le β -carotène est une provitamine A [62].

III.2.3.4. Sélénium

Le Sélénium est un élément minéral essentiel qui se trouve à l'état de traces dans l'organisme. Il se présente sous diverses formes chimiques dans l'alimentation. Il est activement métabolisé puis incorporé de manière originale [73]. Le sélénium agit comme un cofacteur enzymatique de la glutathion peroxydase. Dans l'alimentation, le sélénium organique se trouve essentiellement lié à un acide aminé, la cystéine. Le sélénium organique est mieux absorbé, il subit une métabolisation hépatique qui conduit à des intermédiaires nécessaires à la synthèse de dérivés physiologiquement actifs comme la GPx. Les aliments riches en sélénium sont notamment, les noix de Brésil, les brocolis, l'ail...etc [51].

III.2.3.5. Les composés phénoliques

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement [81]. A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolées et identifiées. Selon leurs caractéristiques structurales, elles se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun, à savoir, la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH). Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 g/mol [82].

Les polyphénols sont divisés en plusieurs catégories : anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénols et xanthones où les flavonoïdes représentent le groupe le plus commun et largement distribué [81].

Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs et les feuilles de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons (vin rouge, thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs. Les fruits et légumes contribuent environ pour la moitié à notre apport en polyphénols, les boissons, telles que les jus de fruits et surtout le café, le thé ou le vin, constituent le reste [83].

Les recherches des dix à quinze dernières années ont démontré que les composés phénoliques ne sont nullement des produits inertes du métabolisme. Ils subissent dans les

tissus végétaux d'importantes variations quantitatives et qualitatives et interviennent dans des processus vitaux les plus divers. Le mode de leur action et sa signification physiologique ne sont pas encore toujours clairs. Un rôle important est attribué aux phénols dans la résistance des plantes aux maladies, comme c'est le cas de la résistance du cotonnier à la maladie de flétrissement et à la verticilliose. Le phénomène d'accumulation des substances phénoliques dans les tissus végétaux infectés ou dans les zones qui leur sont proches est également observé à la suite de blessures causées par des facteurs mécaniques et dans le cas de carence en certains éléments minéraux comme l'azote et le soufre. Des travaux plus anciens [84, 85] ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation organogène, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation. Les polyphénols sont aussi connus pour leurs effets protecteurs contre le rayonnement UV, l'effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs et pour leurs propriétés antifongiques et antibactériennes [86]. Ils interviennent dans la qualité alimentaire des fruits en déterminant la saveur. Nous pouvons dire que les flavanones sont responsables de l'amertume des *Cistus* et peuvent donner naissance par transformation chimique à des dihydrochalcones à saveur sucrée [87], les anthocyanes, composés de couleur rouge à violet, participent à la coloration des fruits mûrs et les tannins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs.

A partir des années quatre-vingt, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt des polyphénols, en particulier les flavonoïdes dont les propriétés antioxydantes sont très marquées.

a. Biosynthèse des polyphénols

Les composés phénoliques sont principalement synthétisés à partir des hydrates de carbone via la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate malonate.

a1. La voie de Shikimate

C'est la voie principale de biosynthèse des composés aromatiques [88] dans les plantes et les micro-organismes, y compris les acides aminés aromatiques, tels que la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Ce sont des métabolites primaires qui servent de précurseurs pour de nombreux produits naturels (secondaires) tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques, les coumarines, les alcaloïdes... (**Figure 06**).

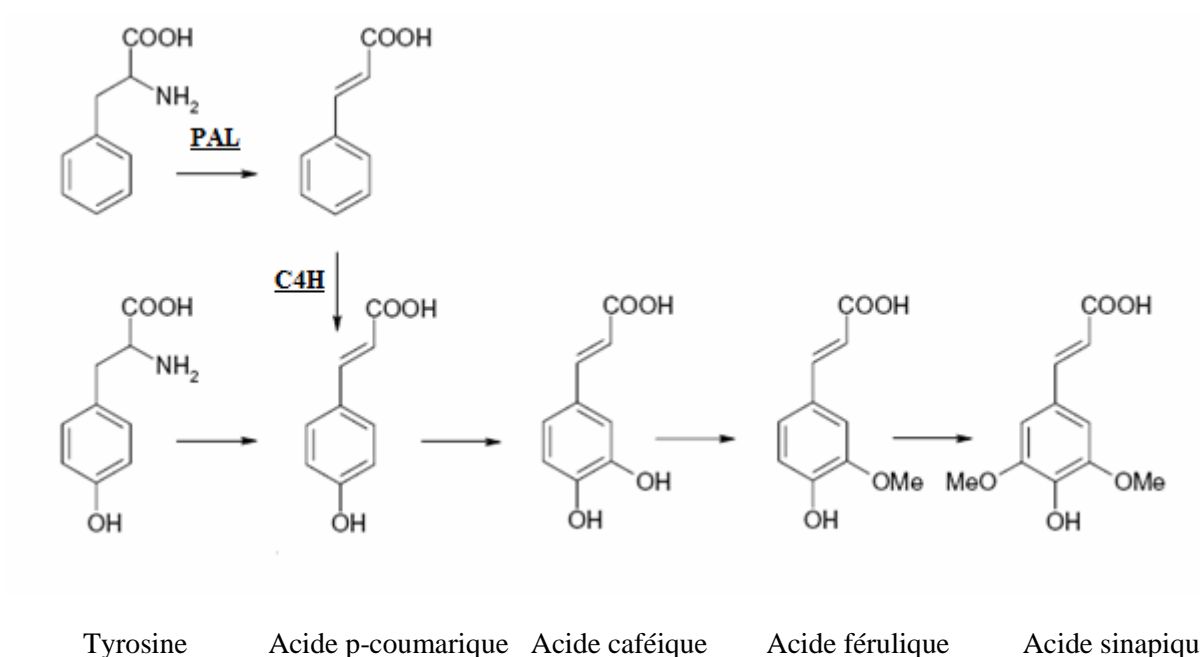


Figure 06 : Biosynthèse des composés phénoliques les plus largement distribués par la voie de shikimate [89]. **PAL** : 3 phénylalanine ammonia-lyase ; **C4H** : cinnamate 4-hydroxylase.

a2. La voie de l'acétate malonate

Ce mode de formation plus secondaire consiste à la cyclisation des chaînes poly cétoniques, elles-mêmes obtenues par condensation de groupement acétate. La condensation des groupements acétates ne se fait qu'après carboxylation de l'acétyl CoA en malonylCoA.

Chez les flavonoïdes, les anthocyanes, le cycle benzénique latéral (A) provient de l'enchaînement de trois acétyl-COA [90].

B. Classification des polyphénols

Les polyphénols peuvent se regrouper en deux grands groupes :

Les non flavonoïdes dont les principaux composés sont les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les lignines et les coumarines [91], les flavonoïdes, dont on caractérise principalement les flavones, flavanones, flavonols, isoflavonones, anthocyanines, proanthocyanidines et flavanols [92] (Figure 07).

b1. Les non flavonoïdes

➤ Acides phénoliques (C₆-C₁ ou C₆-C₃)

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts que sont les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques.

➤ Acides hydroxybenzoïques C₆-C₁

Les acides hydroxybenzoïques sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C₆-C₁. Ils sont particulièrement représentés chez les Gymnospermes et les Angiospermes d'où ils sont souvent libérés après hydrolyse alcaline du matériel végétal.

Les acides hydroxybenzoïques existent fréquemment sous forme d'esters ou de glycosides, [93]. Les principaux acides hydroxybenzoïques retrouvés dans les végétaux sont les acides *p*-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique et syringique [94].

Le thé, les pommes de terre ainsi que certains fruits, sont des sources importantes des acides hydroxybenzoïques. Les baies, ainsi que les fraises, peuvent en contenir plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme de fruit frais, principalement sous formes d'acides galliques et *p*-hydroxybenzoïques. Par ailleurs, les céréales comme le blé et l'avoine contiennent de l'acide vanillique, de l'acide salicylique et de l'acide *p*-hydroxybenzoïque. Certains condiments (herbes et épices) peuvent également contenir des acides hydroxybenzoïques [94].

➤ Acides hydroxycinnamiques C₆-C₃

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base, C₆-C₃ dérive de celle de l'acide cinnamique. Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires sont un des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules. De plus, l'existence d'une double liaison dans la chaîne latérale conduit à deux séries isomères (*cis* ou *Z* et *trans* ou *E*) dont les propriétés biologiques peuvent être différentes. Les formes *trans* sont cependant naturellement prépondérantes et il est possible que les formes *cis* ne correspondent qu'à des artefacts d'extraction [93].

Les acides hydroxycinnamiques sont retrouvés dans toutes les parties des fruits et des légumes, quoique les concentrations les plus élevées soient observées dans la partie externe du fruit mûr. Les laitues, les carottes, les myrtilles, les patates douces (entières, cuites, et crues), les pommes de terre, les pêches, le jus d'orange, les pommes, les tomates et le raisin sont les sources les plus riches en acides hydroxycinnamiques [95]. L'acide chlorogénique (ou acide 5-Ocaféoylquinique) est la forme combinée de l'acide caféique. Il est retrouvé en forte concentration dans le café [96].

➤ Stilbènes C₆-C₂-C₆

Les stilbènes présentent une structure en C₆-C₂-C₆, avec un cycle A portant deux fonctions hydroxyles en position méta et un cycle B portant des fonctions hydroxyles en méta, ortho et para. Les deux noyaux aromatiques sont reliés entre eux par une double liaison, formant ainsi un système conjugué. Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la délocalisation des électrons π sur la totalité de la molécule. Les stilbènes se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine [97]. Ils sont généralement isolés des plantes sous formes hydroxylés, méthylés, esterifiés, glycosylés ou même prenylés. Leur solubilité est négligeable dans l'eau et accrue dans la plupart des solvants organiques [98].

Ces composés sont présents dans de nombreuses familles de plantes supérieures mais les principales sources alimentaires sont le raisin (les graines, la peau, et les tiges) et le vin [99].

Le resvératrol ou le 3, 5,4'-trihydroxystilbène est un polyphénol non flavonoïde et appartient à la classe des stilbènes. Il est surtout présent dans la pellicule du grain de raisin, Seul son isomère *trans* est actif. Le resvératrol possède de nombreuses propriétés biologiques; alors que son pouvoir anticancéreux a suscité un grand intérêt [100].

➤ Lignines (C₆-C₃)_n

La lignine est un polymère fortement ramifié, formé par trois alcools phénoliques simples. Les alcools sont oxydés en radicaux libres par une enzyme ubiquiste chez les plantes ; la peroxydase. Les radicaux libres réagissent ensuite spontanément et au hasard pour former la lignine [101]. Elle est localisée dans les parois cellulaires et plus spécialement dans les parois secondaires des éléments conducteurs, contribuant à la résistance mécanique et à la rigidité des tiges lignifiées. Malgré son abondance (elle n'est dépassée que par celle de la cellulose), sa structure n'est pas bien comprise. La lignine est un très grand polymère, insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques, il est donc impossible de l'extraire sans lui faire subir d'importantes dégradations. De plus les trois monomères de bases peuvent s'assembler de multiples façon formant une structure tridimensionnelle très ramifiée [101].

➤ Lignanes (C₆-C₃)₂

Les lignanes répondent à une représentation structurale de type (C₆-C₃)₂. L'unité (C₆ - C₃) est considérée comme un propylbenzène. Ils sont des composés phénoliques bioactifs, non-nutritifs, non caloriques. On les trouve en plus forte concentration dans le lin et les graines de sésame et en faibles concentrations dans les fruits et les légumes [102]. Ils ont été

définis comme étant les dimères des phénylpropanoïdes où deux unités de phénylpropane C₆-C₃ sont liées par leur carbone 8 [103]. Ils proviennent de la condensation initiale de deux molécules phénoliques de type monolignol comme l'alcool coniférylique [104]. Ce sont des substances phénoliques apparentées aux lignines, qui n'ont guère de valeur alimentaire humaine. Ils sont présents dans la plante sous forme de glucosides [105].

➤ Coumarines C₆-C₃

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Ils ont été isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarouna odorata* [106]. Ce sont des composés phénoliques cyclisés qui dérivent des acides *t*-cinnamiques et *p*-comariques pour la majorité d'entre eux. Cependant, leur voie de biosynthèse peut varier d'une espèce à l'autre. En effet, la scopolétine de tabac dérive de l'acide férulique, tandis que des expériences d'apport de précurseurs marqués semblent montrer que ce n'est pas le cas chez le tournesol.

Les coumarines ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration mais aussi suivant l'espèce. Dans la cellule, les coumarines sont principalement présentes sous forme glycosylée. Cette glycosylation serait une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques des coumarines sur la cellule et la croissance. Elles sont considérées comme des phytoalexines. Celles-ci sont des molécules de faible masse moléculaire provenant de voies métaboliques variées comme celle des phénylpropanoïdes ou des sesquiterpènes [90].

b₂ .Les flavonoïdes C₆-C₃-C₆

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux [107]. Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base (C₆-C₃-C₆), ils contiennent quinze atomes de carbone dans leur structure de base avec deux cycles aromatiques A et B à six atomes de carbones (liés avec une unité de trois atomes de carbone qui peut ou non être une partie d'un troisième cycle C) [108].

Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés dans les plantes, et la liste ne cesse de croître. Cela est dû du fait de l'apparition de nombreux modèles de substitution ; les substituants primaires (groupe hydroxyle) peuvent eux-mêmes être substitués (glycosylés ou acylés) donnant parfois des structures très complexes [109]. Les principales classes de flavonoïdes

sont : les flavonols les flavones, les flavanones, les flavan-3-ols, les isoflavones et les anthocyanes [110]. Ils varient dans leurs caractéristiques structurales par la diversité fonctionnelle autour de l'oxygénation de l'hétérocycle.

➤ **Flavonols**

Les flavonols sont caractérisés par la présence d'une double liaison en position 2-3 et d'un groupement hydroxyle en C3. Elles sont les flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétal, leur couleur varie du blanc au jaune, elles sont essentiellement représentées par la quercétine, le kaempférol et la myricétine. Les flavonols qui s'accumulent dans les tissus végétaux sont presque toujours sous la forme conjuguée glycosylée [111].

➤ **Flavones**

Les flavones sont structurellement très similaires aux flavonols et ne diffèrent que par l'absence d'hydroxylation en position 3 sur le cycle C. Elles sont principalement représentées dans l'alimentation par l'apigénine et la lutéoline. Contrairement aux flavonols, elles sont moins répandues dans les fruits et les légumes. Par conséquent, leur apport alimentaire est très faible [111].

➤ **Flavanones**

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2, 3 et par la présence d'un centre d'acymétrie en position 2. Chez les flavanones naturelles, le carbone 2 est normalement de configuration S. Elles existent sous forme libre ou sous forme glycosylée [112]. La principale source des flavanones reste les agrumes qui sont caractérisés par l'accumulation des montants élevés de leurs composés. Les agrumes incluent les oranges amères, les citrons, les pamplemousses, les mandarines, les clémentines et les oranges douces. Parmi les formes libres des flavanones, on cite la naringénine qui est retrouvée dans la pamplemousse et l'orange amère. Le plus souvent, les flavanones existent sous forme glycosylée en position 7, comme L'hésperidine, qui est retrouvée dans le citron, l'orange douce et la mandarine, et les néohesperidosides responsables du goût amer de la pamplemousse et de l'orange [113].

➤ **Flavan-3-ols ou flavanols**

Ces molécules sont toujours hydroxylées en C3 et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C4. Elles sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés

proanthocyanidols ou tannins condensés. Les flavan-3-ols sont très abondants dans les fruits comme les abricots, les cerises, les raisins,... etc [111].

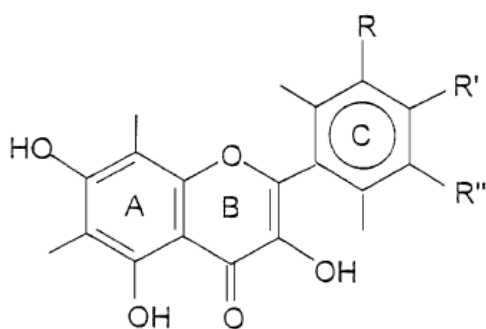
Les flavanols sont largement répandus dans les fruits et légumes, mais la source la plus riche de flavanols au sein de l'alimentation humaine est certainement le thé. Ce dernier contient principalement de la (-)-épicatéchine, de la (-)-épigallocatechin-3-*O*-gallate et de la (-) épigallocatechine [114].

➤ Isoflavones

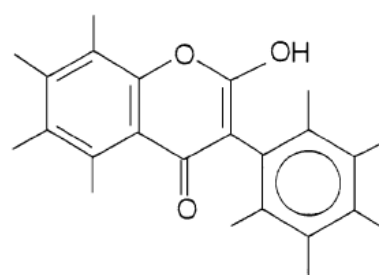
Les isoflavones sont considérées comme des dérivés des flavones. Elles représentent une sous-classe importante et très distinctive des flavonoïdes [115]. Contrairement à la plupart des autres flavonoïdes, les isoflavones sont caractérisées par la présence d'un cycle B fixé à C3 plutôt qu'à la position C2. Elles ont une distribution très limitée dans le règne végétal [118].

➤ Anthocyanes

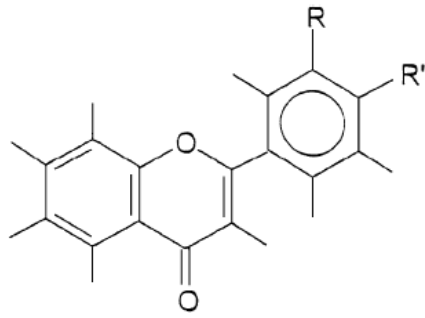
Les anthocyanes (en grec Anthos signifiant fleur, et kyanos signifiant bleu) sont des pigments hydrosolubles présents dans la plupart des espèces. Ces pigments sont des dérivés du cation 2-phénylbenzopyrylium plus communément appelé cation flavylum. Ils sont accumulés dans les vacuoles cellulaires [116] et sont responsable des couleurs rouges, violettes et bleues dans les fruits, les légumes, les fleurs et les graines, mais aussi jouent un rôle important dans la physiologie végétale comme attracteurs des insectes et dans la dispersion des graines [117].



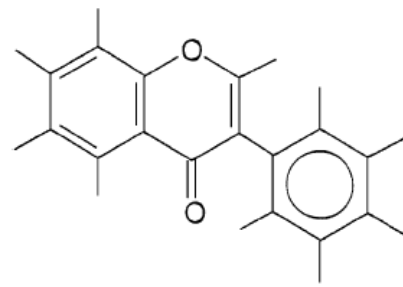
Flavonoles



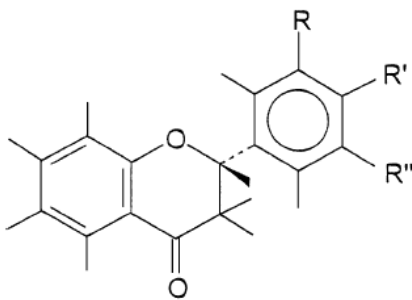
isoflavonoles



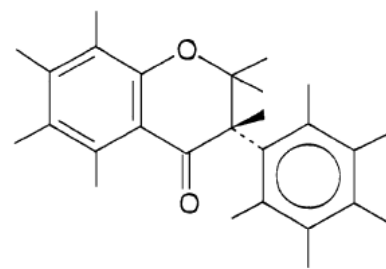
Flavones



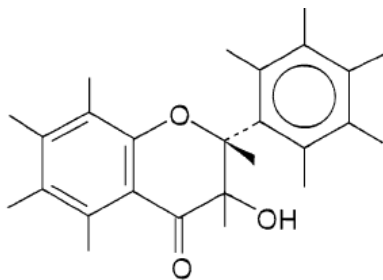
isoflavones



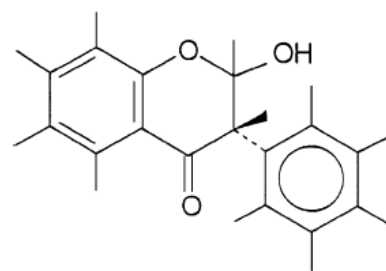
Flavanones



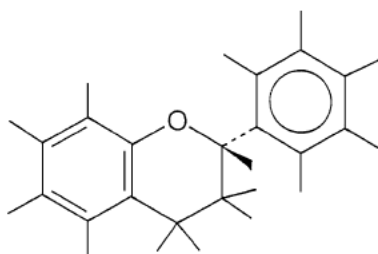
isoflavanones



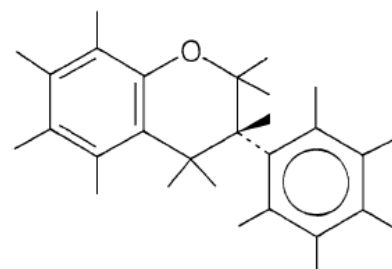
Flavanols



isoflavanols



Flavanes



isoflavanes

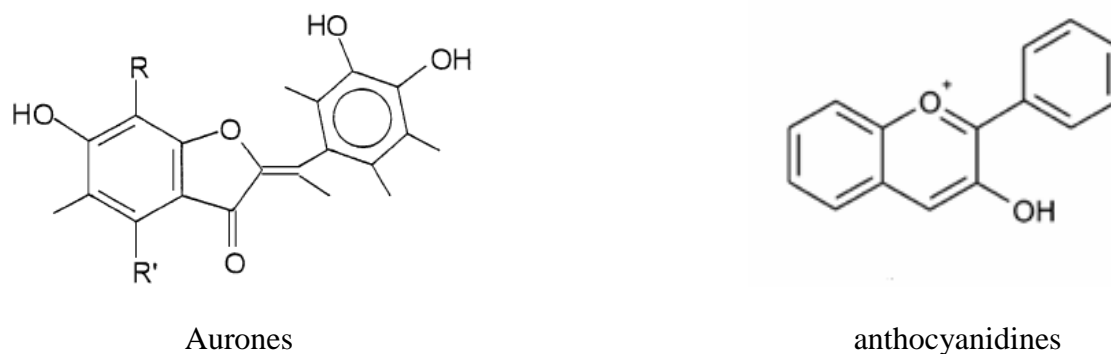


Figure 07: Structures des squelettes de base des flavonoïdes [119].

b₃. Les tanins

Le terme tanin provient d'une pratique ancienne qui utilisait des extraits de plantes pour «tanner» les peaux d'animaux, autrement dit pour transformer une peau en cuir. Ces extraits contiennent des dérivés phénoliques qui se lient aux protéines et donc les dénaturent [120].

Les tanins sont des composés polyphénoliques, hydrosolubles, de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 [121]. Ce sont des molécules fortement hydroxylées et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'elles sont associées aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Elles peuvent être liées à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux [122]. Chez les végétaux supérieurs, il existe deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique :

➤ Les tanins condensés

Les tanins condensés (Tannins vrais ou tannoïdes) résultent de la condensation de molécules élémentaires de type flavane 3 ol (catéchines) ou flavane 3-4 diols (leucoanthocyanidines).

Les liaisons formées sont de type carbone-carbone ce qui rend ces molécules difficilement hydrolysables. Les tannins condensés sont également appelés proanthocyanidines ; en effet leurs oxydation en milieu alcool-acide à chaud entraîne la formation de pigments anthocyanique tels que la cyanidine et la delphinidine. Ce type de molécules est doté de propriétés remarquables chez les plantes qui en sont pourvues [123].

Les tanins condensés sont présents dans les vacuoles d'un réseau de cellules spécialisées, situées sous l'épiderme des feuilles et des tiges de certaines légumineuses tempérées

(sainfoin, lotier corniculé ou pédonculé) et tropicales herbacées (*Lespedeza sericea*, *desmodium intortum*) et arbustives, ainsi que dans les feuilles d'arbustes fourragers ...etc [124].

➤ Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables, ou acide tannique, sont des polymères de l'acide gallique ou de son produit de condensation, l'acide ellagique. Ils ont un poids moléculaire plus faible (de 500 à 3000) et précipitent beaucoup moins les protéines que les tanins condensés (**Figure 08**) [124].

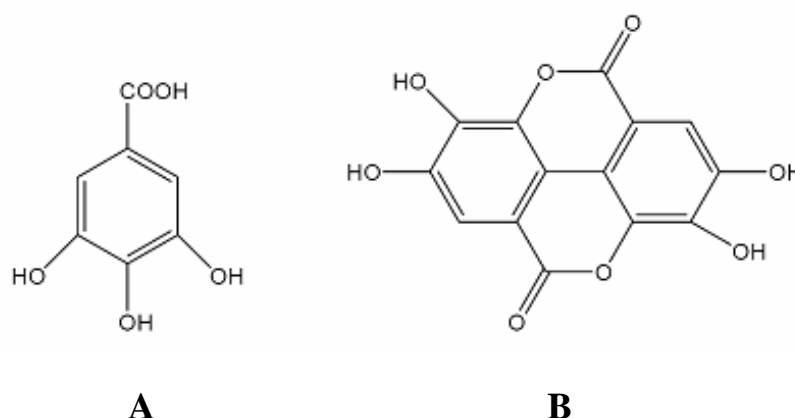


Figure 08: Structure chimique des acides galliques (A) et ellagiques (B)

C. Propriétés biologiques et intérêt des polyphénols

Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment grâce à leurs propriétés et leurs effets bénéfiques sur la santé des êtres humains ou chez les végétaux.

1. Chez les végétaux

Les composés phénoliques sont des pigments responsables des teintes automnales des feuilles et des couleurs des fleurs et fruits (jaune, orange, rouge) [125].

Ils jouent un rôle important dans l'interaction de la plante avec son environnement, en particulier contre les radiations UV, le stress oxydatif et les attaques microbiennes [126].

Ils sont impliqués aussi dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits [127].

2. Chez l'être humain

La consommation d'aliments riches en polyphénols réduit le développement de nombreuses pathologies, telles que le cancer, l'ischémie cardiaque, l'athérosclérose et l'hypertension. Cela peut-être expliqué par le fait que ces composés ont la capacité de

modifier de nombreux facteurs impliqués dans la genèse de ces maladies [128]. Ces composés montrent des activités anticancéreuses, antivirales, antibactériennes [129], Antiallergique, antiathérogène, antioxydantes, anti-inflammatoires, antithrombotiques, cardioprotecteur et les effets vasodilatateurs [130].

Leurs propriétés sont liées au fait qu'ils peuvent moduler l'activité de nombreuses protéines intracellulaires (les protéines kinases, les phospholipases, l'adénylate cyclase, les ATPases, les cyclo-oxygénases (COX), les NOS ou le cytochrome P450) et qu'ils peuvent aussi agir sur différents types cellulaires [128].

3. Activité antioxydante

Les antioxydants sont classés selon leur mode d'action : éliminateurs de radicaux libres, chélateurs d'ions métalliques, piègeurs d'oxygène dans des systèmes fermés. Les polyphénols naturellement présents dans les aliments ou formés au cours des procédés de transformation sont considérés comme éliminateurs des radicaux libres [131].

a. Piégeage des radicaux libres

Les composés phénoliques ont des propriétés antioxydantes en raison de leur capacité à piéger les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène, le processus est radicalaire [132]. Ils interfèrent avec l'oxydation des lipides et d'autres molécules par la donation rapide d'un atome d'hydrogène aux radicaux libres selon un mécanisme proposé dès 1976 par Sherwin : l'antioxydant cède formellement un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de proton, pour donner un radical intermédiaire. Il est stabilisé par ses structures mésomères conjuguées [132].

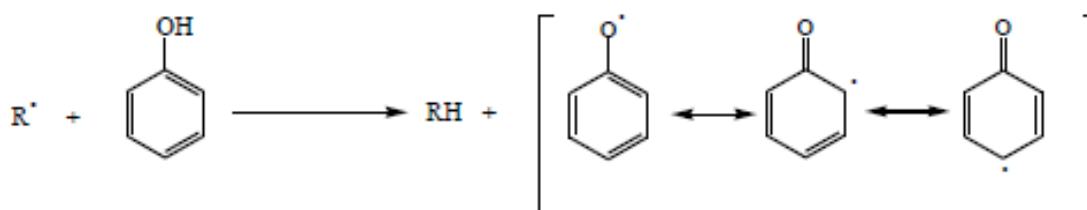


Figure 09: Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques.

Les radicaux intermédiaires phénoxy (PO^\bullet) sont relativement stables en raison de la résonance et donc une nouvelle réaction en chaîne n'est pas facile à initier [133]. Par ailleurs, ils peuvent agir avec d'autres radicaux libres selon la réaction:



Les composés phénoliques possèdent une structure chimique idéale pour le piégeage des radicaux libres, parce qu'ils possèdent :

- Des groupes phénoliques hydroxyles qui sont susceptibles de donner un atome d'hydrogène ou un électron au radical libre.
- Un système aromatique stabilisé par la résonance [133].

Les flavonoïdes en général et les flavan-3-ols en particulier, sont de bons piégeurs de radicaux libres [134]. Du fait de la présence de 3',4'-dihydroxy et celle du groupe *o*-dihydroxy (structure des catéchol) sur le noyau aromatique B; ceux-ci possèdent la propriété de donneurs d'électrons. En outre, la présence du 3-OH du cycle C est également bénéfique pour l'activité antioxydante des flavonoïdes. La présence de la double liaison C2-C3 conjuguée avec le groupe 4-céto est responsable de la délocalisation des électrons du noyau B, ce qui améliore encore l'activité antiradicalaire [135].

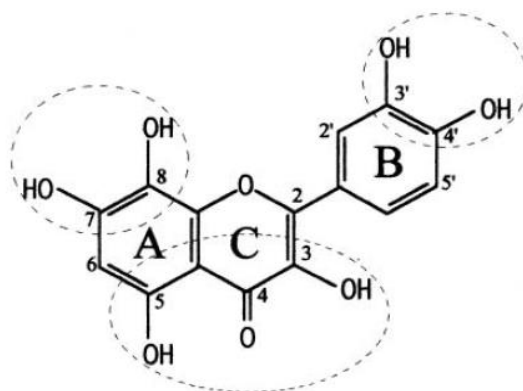


Figure 10: Les caractéristiques structurales des flavonoïdes avec une activité de piégeage des radicaux libres élevée [135].

b. Chélation des ions métalliques

Les ions métalliques sont nécessaires pour le fonctionnement des processus biochimiques et physiologiques cellulaires, mais dans certains cas et lorsque leur mécanisme d'action n'est pas bien contrôlé, ces mêmes ions peuvent être à l'origine d'une peroxydation lipidique, un stress oxydatif, ou une blessure de tissus, à titre d'exemple Cu^{2+} est un stimulateur de la peroxydation des LDL [136]. La formation du radical oxygène se fait soit par coordination avec le Fe^{2+} et le renforcement de l'auto-oxydation de Fe^{2+} soit par la formation de complexe inactif avec le Cu^{2+} , Fe^{2+} ou le Cu^+ relativement avec faible interaction [137, 138].



La chélation des ions métalliques par les flavonoïdes nécessite trois sites principaux :

- Noyau catéchol sur le cycle B
- Les groupe 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C
- Le groupe 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C [139, 140]. A titre d'exemple ; la quercétine et la myricétine répondent à tous ces critères nécessaires pour avoir une activité antiradicalaire efficace et importante [83].

c. Inhibition enzymatique

En raison de la présence de multiples fonctionnalités phénol, ils interagissent avec les protéines si fortement, que la précipitation des complexes protéines-polyphénols se produit fréquemment, ce qui est la base de leur utilisation dans le processus de tannage du cuir [141]. Les phénomènes d'interaction polyphénols-protéines ont été largement étudiés *in vitro*, particulièrement dans le cas des flavonoïdes [142]. Afin de préciser le mécanisme d'action de l'activité inhibitrice des flavonoïdes, des études ont été réalisées sur l'effet de la quercétine sur l'oxydation de l'acide linoléique par une lipoxygénase. Les auteurs de ces études ont constaté que le mécanisme d'inhibition des lipoxygénases par la quercétine ne serait pas dû à une complexation ou à une oxydation du Fe^{2+} , mais plutôt à une inhibition irréversible résultant de liaisons covalentes entre l'enzyme et les dérivés oxydés de la quercétine (quinone ou radical phénoxy) [143].

4. Méthode de mesure de l'activité antioxydante :

Grâce à la propriété essentielle de l'antioxydant, plusieurs méthodes ont été mises au point pour évaluer l'efficacité des antioxydants à piéger les radicaux libres et d'empêcher les réactions radicalaires. La majorité de ces méthodes se base sur des phénomènes chimiques, des processus physiques et des instrumentations spécifiques. La plupart des procédés analytiques exigent un prétraitement avant la mesure. Toutes ces méthodes couvrent les antioxydants primaires et secondaires.

En principe, si un composé montre une faible activité antioxydante *in vitro*, il est très rare qu'il présente une activité meilleure *in vivo* [144] aussi les mécanismes d'oxydation et de prévention *in vivo* sont différents à cause de la perméabilité cellulaire et du processus de transport [145].

a. Capacité de piégeage du radical DPPH :

Une autre méthode très utilisée pour évaluer l'activité antioxydante d'un composé consiste à étudier sa réaction avec le DPPH, un radical libre très stable à l'état cristallin et en solution, de coloration violette qui reste stable plusieurs jours, présentant une absorption caractéristique λ [40]. L'activité antiradicalaire est basée sur la réduction de l'absorbance à 517 nm lorsqu'un radical libre stable de 2,2-diphényl-picrylhydrazyl (DPPH[•]) est réduit [146].

Il s'agit d'une réaction de transfert d'atome d'hydrogène et dans laquelle les antioxydants donneurs de proton, tels que les polyphénols, sont capables de réduire ce radical (DPPH[•] → DPPH₂), ce qui entraîne une diminution de son absorbance :



La capacité antioxydante de molécules ou d'extraits est ainsi déterminée en évaluant le pourcentage d'inhibition de l'absorbance du radical DPPH à 523 nm [147]:

$$\text{DPPH_scavenging effect \%} = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

$A_{\text{contrôle}}$: Absorbance sans antioxydant.

A_{test} : Absorbance avec antioxydant.

Cette méthode est un des tests les plus simples à mettre en oeuvre.

b. Méthode de FRAP :

La méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) est basée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe³⁺) en ion ferreux (Fe²⁺). Cette méthode évalue le pouvoir réducteur des composés [148]. La concentration des composés réducteurs (antioxydants) dans l'extrait est exprimée en mmol Equivalent Standard /g d'extrait sec selon la formule :

$$C (\%) = c.C/M.C_i$$

C : Concentration en composés réducteurs en mmol Equivalent Standard /g d'extrait sec.

c : Concentration de l'échantillon lue.

D : Facteur de dilution de la solution mère d'extrait.

C_i : Concentration de la solution mère d'extrait.

M : Masse molaire du standard.

c. Méthode d'ABTS :

Elle est basée sur la décoloration d'un cation radicalaire stable, ABTS^{•+} (2,2'-azynobis-[3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid]) en ABTS en présence de composés antiradicalaires à 734 nm car le cation radicalaire chromophore ABTS^{•+} de couleur bleu-vert directement produit par réaction entre l'ABTS et le persulfate de potassium a une absorption maximale à 734 nm.

d. Activité réductrice sur le ferricyanure de potassium :

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. L'activité réductrice des extraits polaires est déterminée selon la méthode d'Oyaizu (1986), basée sur la réaction chimique de réduction du Fer (III) présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en Fer(II). L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés [136].

e. Capacité de piégeage du radical anion superoxyde :

Le pouvoir antioxydant d'un extrait peut également être évalué par sa capacité à piéger les espèces oxygénées réactives telles que l'anion superoxyde. Cette méthode est basée sur la réaction chimique de réduction du bleu de tétrazolium, dépendant directement de la présence de radicaux superoxydes. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 560 nm. Une diminution de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir antioxydant des extraits testés. Le pouvoir antioxydant de molécules ou d'extraits est ainsi déterminé en évaluant le pourcentage d'inhibition de l'absorbance du radical à 560 nm [147] :

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

A_{contrôle} : Absorbance sans antioxydant.

A_{test} : Absorbance avec antioxydant.

f. Méthode de Trolox :

Le test ORAC a été effectué sur un Fluoroskan Ascent. Le trolox a été utilisé comme standard de contrôle. L'expérience a été menée à une température et à un pH déterminés, avec un échantillon témoin en parallèle. Le fluorimètre a été programmé pour enregistrer la fluorescence de la fluorescéine toutes les 30s après l'addition du 2,2-azobis (2-amidinopropane) dichlorhydrate (AAPH). Les résultats finaux sont calculés en comparant la différence de l'aire sous la courbe de l'échantillon et celle du témoin. Les valeurs du test ORAC sont exprimées en micromoles d'équivalents de Trolox (TE) par milligramme (TE

umol / mg). Les manipulations sont similaires à celles rapportées dans la littérature par notre groupe.

5. Activité anti bactérienne

Les polyphénols sont dotés d'activités antibactériennes importantes et diverses, probablement dû à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre de groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité [149]. Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés plus ils sont inhibiteurs des microorganismes [150]. Les flavane-3-ols, les flavonols et les tanins ont reçu plus d'attention due à leur large spectre et une forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols. [151]. Ces composés jouent un rôle inhibiteur, ils n'agissent pas sur la paroi bactérienne mais plutôt sur un mécanisme interne. Ces composés sont supposés agir sur l'ADN, l'ARN et la synthèse protéique [152]. Ils possèdent une capacité de supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne, telles que l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte et la neutralisation des toxines bactériennes ainsi qu'à leur capacité d'établir une synergie avec certains antibiotiques [151].

6. Activité anti inflammatoire

De nombreuses études indiquent que les polyphénols, notamment les flavonoïdes possèdent des propriétés anti inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations. Ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires [153]. D'autres flavonoïdes sont capables d'inhiber l'histamine [154]. Les flavones et les flavonols sous forme glycosylée ou libre comme la quercétine, kaempférol, myricétine ont une activité inhibitrice de la cyclooxygénase COX [155].

7. Activité anti tumorale

Le développement d'un cancer est un processus lent, constitué de plusieurs phases (initiation, promotion, progression et invasion) dans lesquelles les radicaux libres oxygénés et des composés carcinogènes jouent un rôle primordial. En effet, ils modifient la structure et l'expression de certains gènes dont le rôle est de contrôler le fonctionnement normal de la cellule [156, 157]. Par leur action antioxydante puissante, les polyphénols pourraient donc produire leur effet anti-cancer.

Les stilbènes notamment le resvératrol agissent sur la carcinogénèse en présentant des actions au niveau des trois stades de ce processus : la phase d'initiation, la phase de promotion et la phase de progression. De plus, il supprime les phases finales de la carcinogénèse telles que l'angiogénèse et les métastases [158]. Le resvératrol joue un double rôle, car il peut prévenir de la formation de cancers mais permet aussi de lutter contre un cancer déjà déclaré [159]. A faible dose, le resvératrol a la propriété de potentialiser l'effet des chimiothérapies traditionnelles [158].

8. Activité anti cardiovasculaire

Diverses études épidémiologiques ont montré qu'il existe une corrélation inverse entre la consommation d'aliments riches en polyphénols et le risque de développement des maladies cardiovasculaires [160]. Au niveau des artères, ces molécules préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) [161] évitant ainsi l'athérosclérose (épaississement des artères qui contribue à réduire le flux sanguin et peut conduire à l'asphyxie des tissus irrigués). Les polyphénols inhibent aussi l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose, qui induit l'occlusion des artères. Ainsi en prévenant l'athérosclérose et les risques de thrombose, ces composés limitent les risques d'infarctus du myocarde [162].

D'après de récentes données probantes, certains polyphénols sous forme purifiée, y compris le resvératrol, et la naringénine, ont des effets bénéfiques sur la dyslipidémie chez les modèles humains ou animaux. Un traitement à la naringénine atténuait l'athérosclérose en corrigeant la dyslipidémie [163].

9. Activité anti diabétique

Des travaux multiples ont démontré les bienfaits des polyphénols sur les troubles et les complications métaboliques induites par le diabète. Les produits riches en polyphénols peuvent moduler le métabolisme des glucides et des lipides, atténuer l'hyperglycémie, la dyslipidémie et la résistance à l'insuline, améliorer le métabolisme du tissu adipeux, atténuer le stress oxydatif et les voies de signalisation sensibles au stress et les processus inflammatoires [164].

Les effets antidiabétogènes et cytoprotecteurs des extraits de flavonoïdes notamment la quercétine se traduit par un effet significativement positif sur l'insulinosécrétion des cellules β et la glycémie. Cet effet est dû au pouvoir antioxydant et cytoprotecteur des composés phénoliques et à la réduction de la production du MDA en empêchant donc la

lipoperoxydation et la normalisation du niveau cytosolique des systèmes antioxydants (SOD, CAT et GSH) [165].

Les composés polyphénoliques peuvent également prévenir la santé avec d'autres activités en l'occurrence l'activité sur les maladies neurodégénératives, activité insecticide, activité anti virale, anti parasitaires...etc.

CHAPITRE 2

Présentation des plantes étudiées

I. La famille Tamaricaceae

I.1. Généralités

La famille des Tamaricaceae est une famille des plantes dicotylédones, elle comprend 125 espèces qui sont généralement réparties dans les différentes régions du monde et notamment en Europe, USA, l'Asie et l'Afrique [166]. Ces espèces sont regroupées en 3 genres qui sont respectivement [167] :

- Tamarix L
- Reaumuria L
- Myricaria Desv.

Les Tamaricaceae sont de petits arbres ou arbustes, et le plus souvent des herbacées. La plupart sont des halophytes et rarement des xérophytes, qu'on peut rencontrer dans les zones arides, ou sablonneuses des régions tempérées à subtropicales.

En Algérie cette famille renferme seulement deux genres : *Tamarix* L (10 espèces) et *Reaumuria* L (une seule espèce, *Reaumuria vermiculata* L) [168].

I.2. Caractères généraux de la famille Tamaricaceae

Les Tamaricacées sont généralement caractérisées par des petites feuilles écailleuses, les fleurs sont souvent petites, bisexuelles et rarement unisexuelles, actinomorphes bractéoles penta ou tétra mères, sépales et pétales imbriqués. Ovules anatropes ou ascendants, les fruits sont des capsules loculicides contenant des graines entièrement barbues [169].

I.3. Position systématique

I.3.1. Classification classique des Tamaricacées selon Cronquist 1988

Les Tamaricaceae sont des dicotylédones appartenant à l'ordre des Violales.

Tableau 01: Classification des Tamaricaceae selon Cronquist (1988).

Règne :	Plantae
Sous règne :	Tracheobionta
Division :	Magnoliophyta ou Angiospermes
Classe :	Magnoliopsida ou Dicotylédones
Ordre :	Violales
Sous-classe :	Dilleniidae
Famille :	Tamaricaceae

I.3.2. Classification des Tamaricaceae selon APG 2003

Selon la classification phylogénétique APG 2003 (Angiosperm Phylogeny Group), les Tamaricaceae appartiennent à l'ordre des Caryophyllales.

Tableau 02: Classification des Tamaricaceae selon APG 2003.

Clade :	<i>Angiospermes</i>
Clade :	<i>Dicotylédones vraies</i>
Clade :	<i>Noyau des Dicotylédones vraies</i>
Ordre :	Caryophyllales
Famille :	Tamaricaceae

I.4 Utilisations traditionnelles des Tamaricaceae

Les populations anciennes ont adopté de nombreuses espèces de Tamaricaceae en médecine traditionnelle.

- Les tradipraticiens chinois ont généralement utilisé les branches, et les feuilles des plantes *Myricaria wardii* et *Myricaria bracteta* pour le traitement de la grippe, et limiter l'effet de poisons de scorpions [170].
- En Afghanistan les fleurs de quelques tamaris sont appliquées en cataplasme sur les abcès cutanés, les plaies, et les furoncles fermés pour les faire mûrir [167].
- Les feuilles de *Tamarix ramosissima* sont considérées comme remède très efficace pour le traitement du rhumatisme et d'hépatite, alors que les branches sont brevetées comme astringent [171].
- Au Maroc les différentes espèces du genre *Tamarix* L sont souvent utilisées pour leurs propriétés curatives, les galles sont prescrites sous forme de tisane afin de traiter : la diarrhée, les douleurs dentaires et l'ulcère buccal. Les poudres et les décoctions des racines sont employées pour soigner : la lèpre, la variole et la tuberculose [172].

I.5. Etude pharmacologique des Tamaricaceae

Les huiles essentielles isolées des parties aériennes du *Tamarix boveana* d'origine tunisienne ont montré une activité antibactérienne contre les *Staphylocoques aureus* et les *Microcoques luteus* à des faibles concentrations de 0.3g/ml, et 0.5g/ml, alors que les huiles isolées à partir des fleurs sont actives contre le *Staphylocoques epidermidis* et l'*Escherichia*

coli (0.5g/l) [173]. Les tests biologiques menés sur l'espèce *Tamarix nilotica* ont mis en évidence une activité antivirale contre le virus HSV [174].

I.6. Etude phytochimique et principaux métabolites secondaires isolés à partir de la famille des Tamaricaceae

Le genre *Tamarix* L est celui le plus étudié des Tamaricaceae, ce dernier est caractérisé par sa richesse en composés polyphénoliques tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques et les coumarines [175, 176,177].

I.6.1. les flavonoïdes

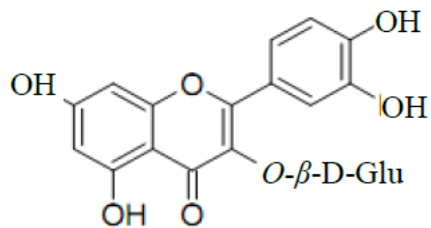
Les flavonoïdes constituent une classe importante du genre *Tamarix* L. D'après la bibliographie, on constate la présence de différentes classes de ces métabolites y compris les flavonoïdes sulfatés.

Tableau 03: Les différents flavonoïdes isolés à partir du genre *Tamarix* L.

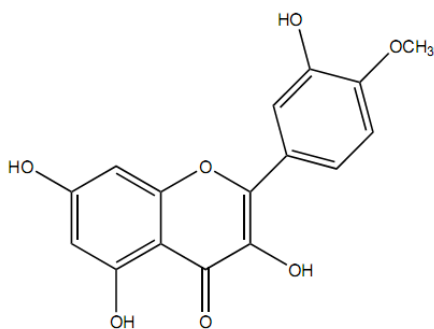
L'espèce	Le composé	Réf
<i>Tamarix elongata</i>	Quercétine 01 Tamarixetine 02 , Chrysoerirole 03 , Isorhamnetine 04 Rhamnazine 05 , Tamarixetine 3- <i>O</i> - α -L-arabinose 06 Tamarixetine 3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside 07 Tamarixetine 3- <i>O</i> - α - 08 Rhamnopyranoside 09 Tamarixetine 3- <i>O</i> -Sulfate 10 7,3',4'-trihydroxy-5-methoxy flavone 11 3,5,7-trihydroxy-3',4'-dimethoxy flavones 12 x Isorhamnetine 3- <i>O</i> - β - glucopyranoside 13 Isorhamnetine 7- <i>O</i> -sulfate 14	[178,179]
<i>Tamarix laxa</i>	Tamarixetine 02 Chrysoerirole 03	[178,179]

	<p>Isorhamnetine 04</p> <p>Tamarixetine 3-<i>O</i>-Sulfate10</p> <p>Quercétine 01</p> <p>Tamarixetine 3-<i>O</i>-α-rhamnopyranoside08</p> <p>7,3',4'-trihydroxy-5- methoxy flavone 11</p> <p>3,5,7-trihydroxy-3',4'-dimethoxy flavone 12</p> <p>Isorhamnetine 3- <i>O</i>-β- glucopyranoside 12</p> <p>Isorhamnetine 7-<i>O</i>-sulfate 13</p>	
<i>Tamarix africana</i>	<p>Tamarixetine 3-<i>O</i>-Sulfate 10</p> <p>Kaempferol 4'-methylether-sulfate 14</p>	[180]
<u><i>Tamarix aphylla</i></u>	<p>Rhamnetine 3'-glucuronide-3,5,4'-trisulfate 15</p> <p>7, 4'-dimethyl ether kaempferol-3-sulfate 16</p> <p>Quercetine 3-<i>O</i>-isoferulyl-β-glucuronide 17</p>	[181,182]
<i>Tamarix dioica</i>	<p>Tamaridone 18</p> <p>Tamadone 19</p> <p>Apegenine 20</p> <p>Nevadensine A21</p> <p>Gardenine A 22</p> <p>Gardenine B 23</p> <p>Gardenine C 24</p> <p>Gardenine E25</p>	[183]
<i>Tamarix</i>	7- <i>O</i> -sinapoylkaempferide 26	[1784]

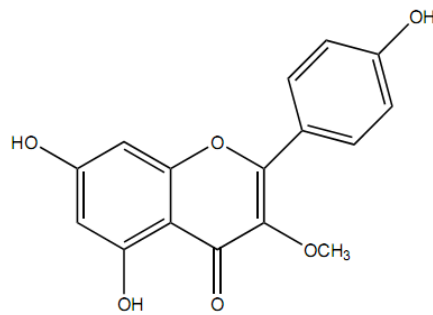
<i>ramasissima</i>	Kaempferole 27	
<i>Tamarix hispida</i>	Tamarixetine 3- <i>O</i> -Sulfate 09 Tamarixetine 02 Quercetine 01 Quercetine 3- <i>O</i> -sulfate 28 Isorhamnetine 04 Quercetine 3- <i>O</i> - β - glucopyranoside 29	[179]
<i>Tamarix hokenakeri</i>	7- <i>O</i> -sinapoylkaem Kaempferole 30 pferide 26	[179]
<i>Tamarix aplexicaulis</i>	Tamarixetine3- <i>O</i> -Sulfate 10 Quercetine 3- <i>O</i> - β - glucopyranoside 29 Quercetine 3- <i>O</i> - Sulfate 28	[184]
<i>Tamarix nilotica</i>	kaempferole-3- <i>O</i> - β -D-glucuronide 6''-ethyl ester 31 Quercetine 3- <i>O</i> - β -D-glucuronide 6''-methyl ester 32 Quercetine 3- <i>O</i> - β -D-glucuronide 6''-ethyl ester 33 Kaempferole7,4'-dimethyl ether 3-sulfate 16	[185]
<i>Tamarix bobeana</i>	Tamarixetine 3- <i>O</i> -Sulfate 10 Kaempferole 4'-methylether-sulfate 14	[180]
<i>Tamarix gallica</i>	Tamarixetine 3- <i>O</i> -Sulfate 10 Kaempferole 4'-methylether-sulfate 14 Kaempferole 7-methylether 34	[180, 186]



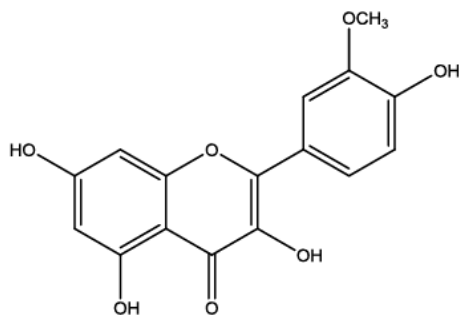
01



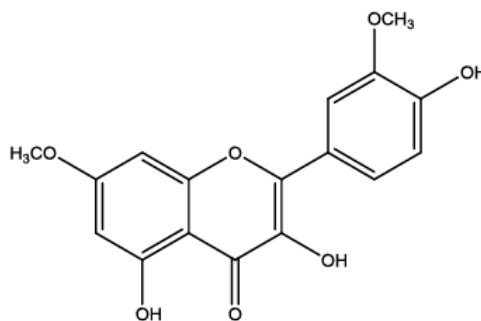
02



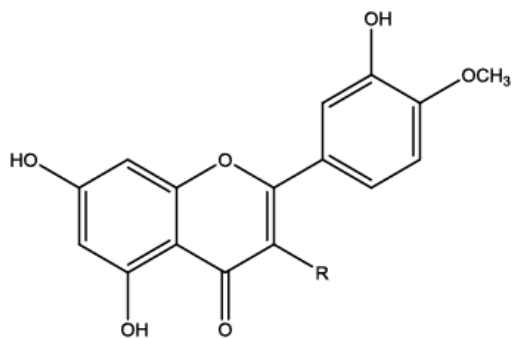
03



04



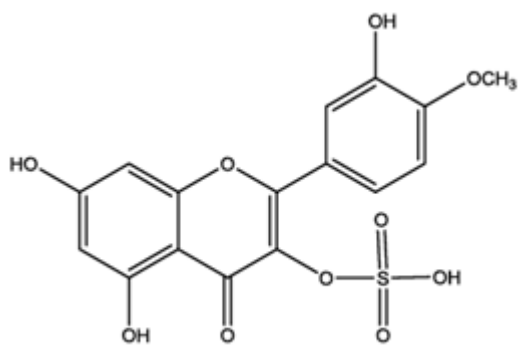
05



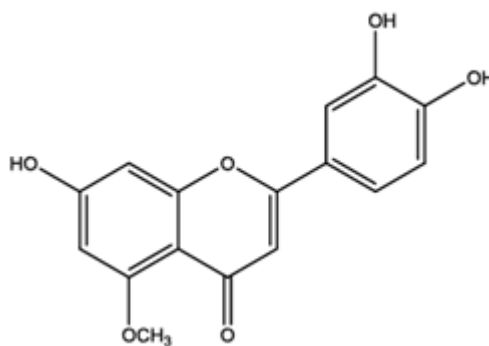
06 R=*O*- α -L-Ara

07 R=*O*- β -D-Glu

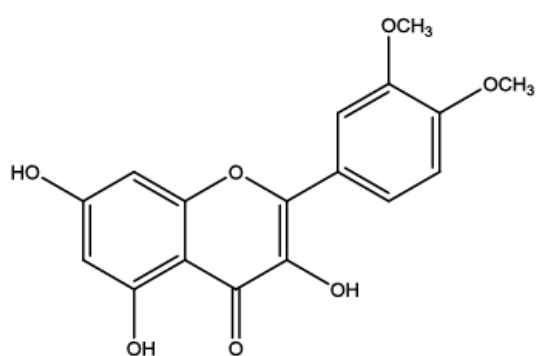
08 R=*O*- α -Rha



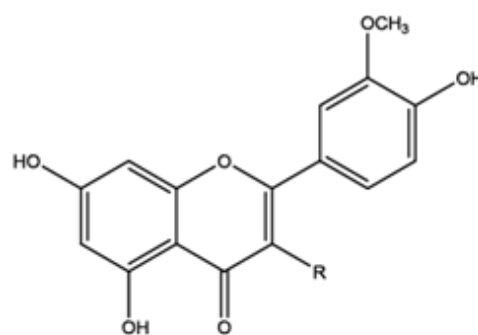
09



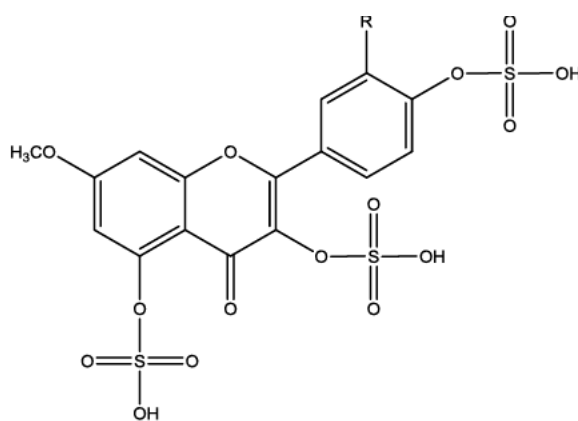
10



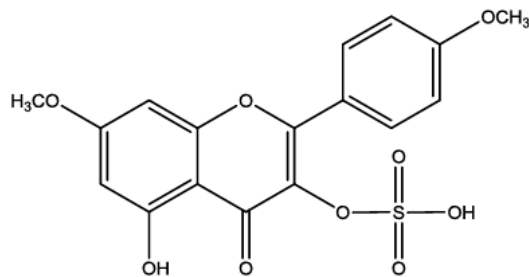
11



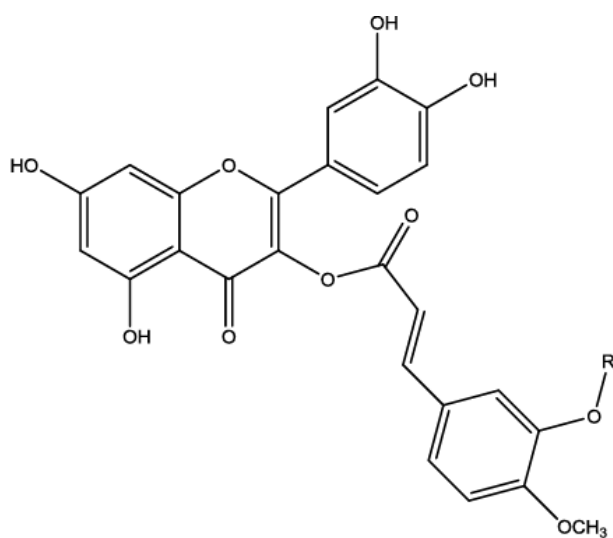
12 : R=O-β- Glu



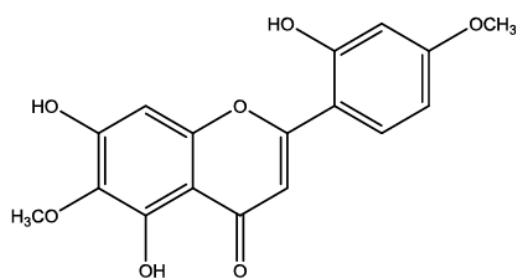
13 R=Gluc



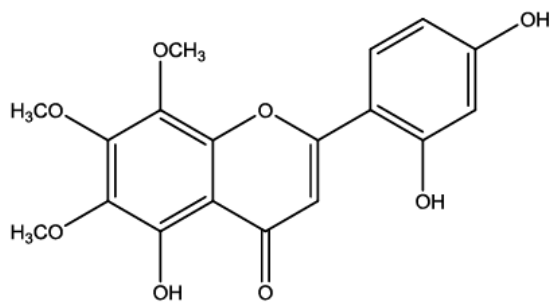
14



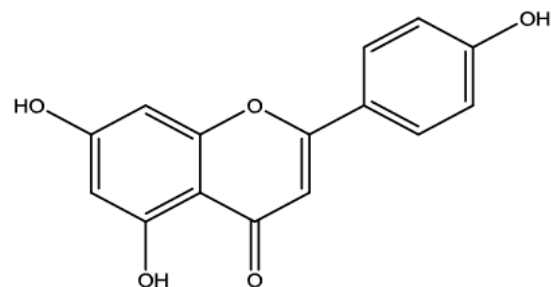
15 R=Gluc



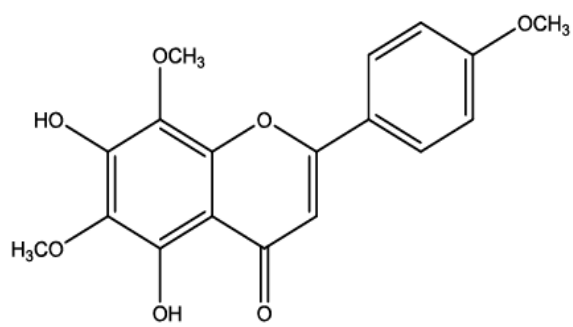
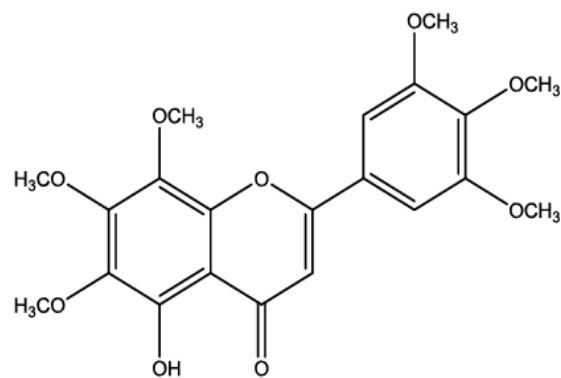
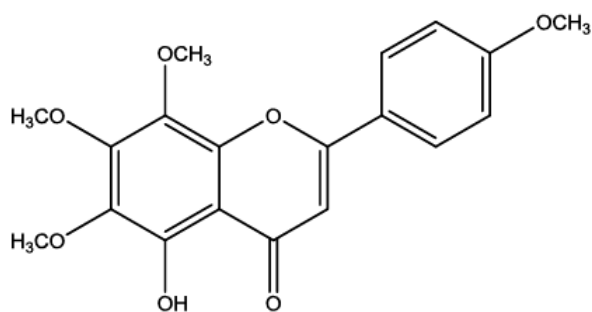
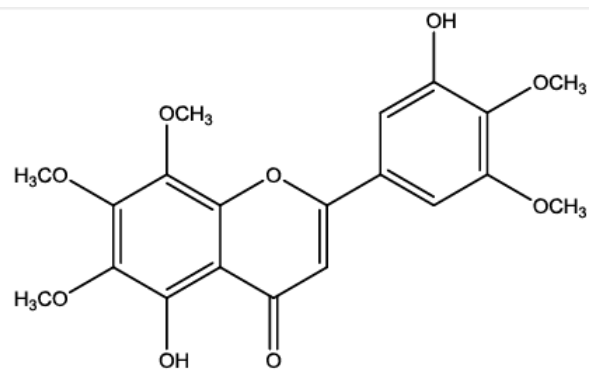
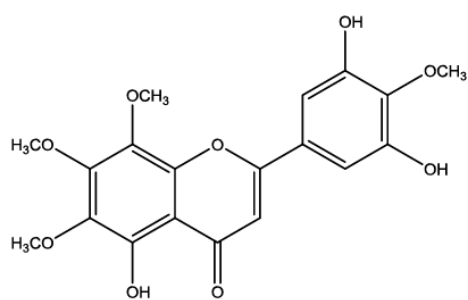
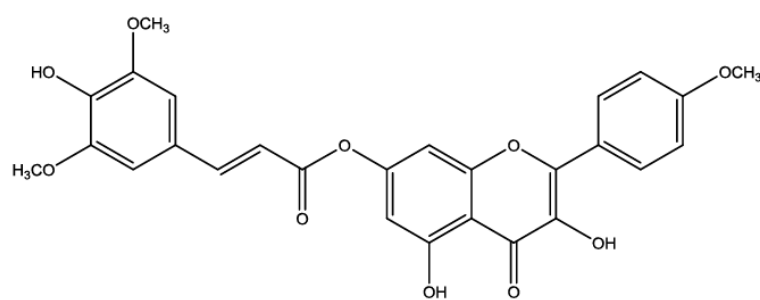
16

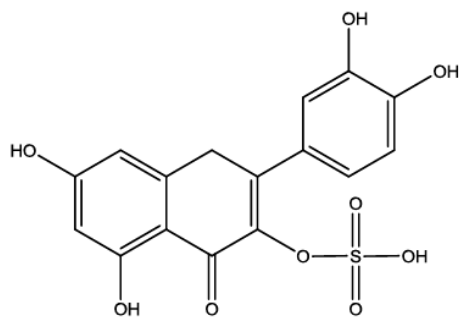


17

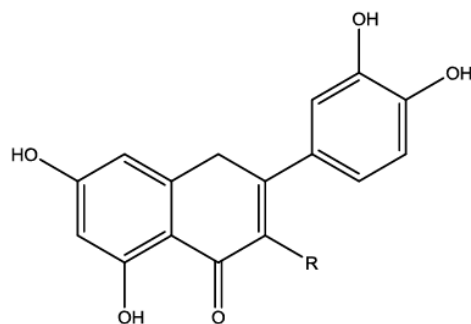


18

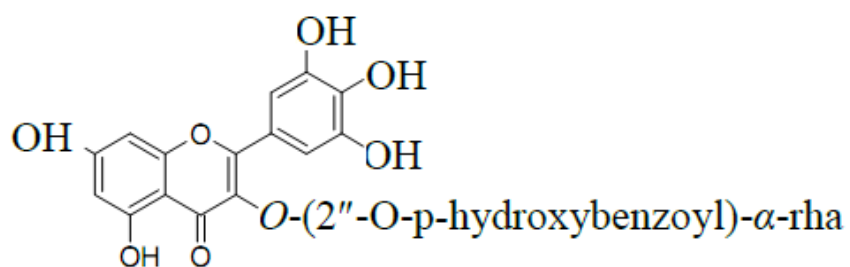
**19****20****21****22****23****24**



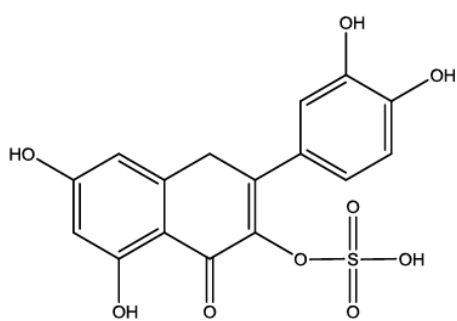
25



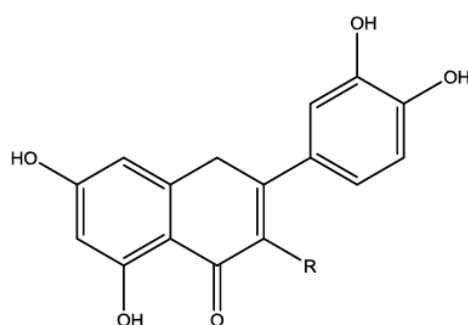
26



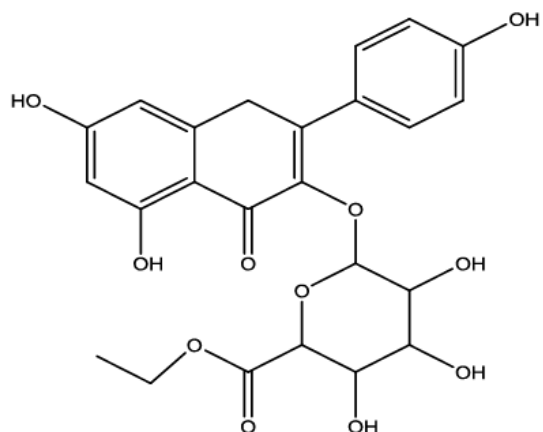
27



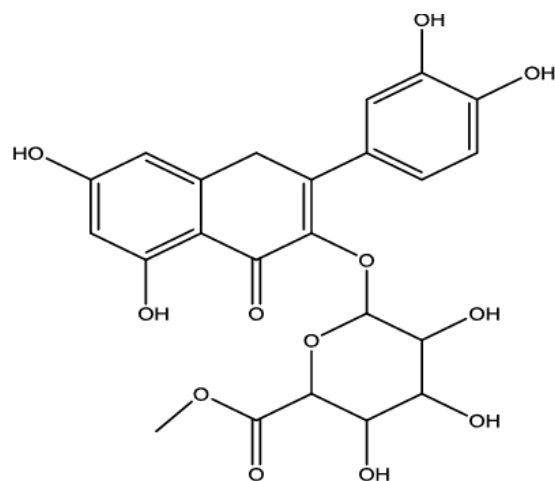
28



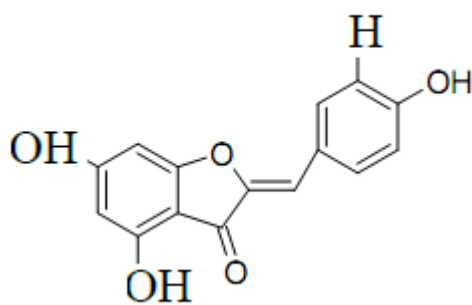
29



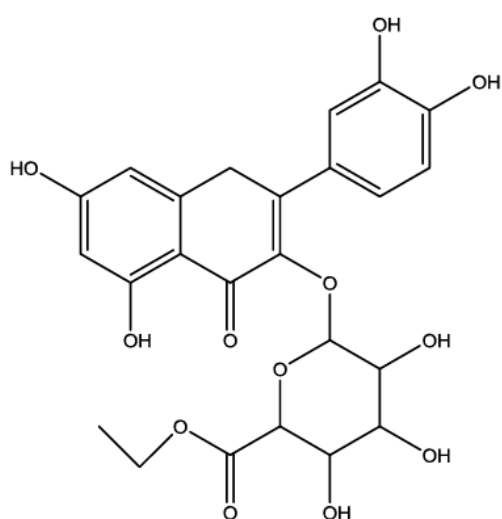
30



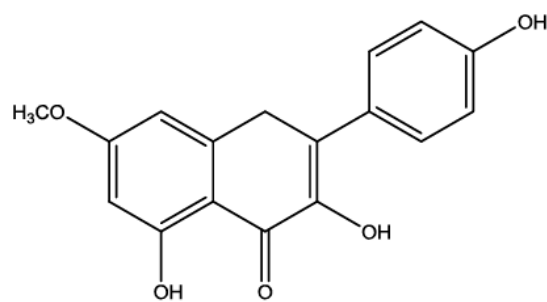
31



32



33



34

Figure. 11: Structures des flavonoïdes isolés à partir des *Tamarix L*

I.6.2. Les coumarines

Les travaux de Bikbulatova et Korul kina (2001) [184], menés sur les deux taxons *Tamarix hokenekari* et *Tamarix ramosissima* ont mis en jeu la présence des coumarines simples tels que le : coumarine **35** et l'ombelliferone **36**.

La Troupine **37**, isolée à partir des feuilles de *Tamarix troupii* [187], révèle une activité analgésique et anti spermatogénique [188].

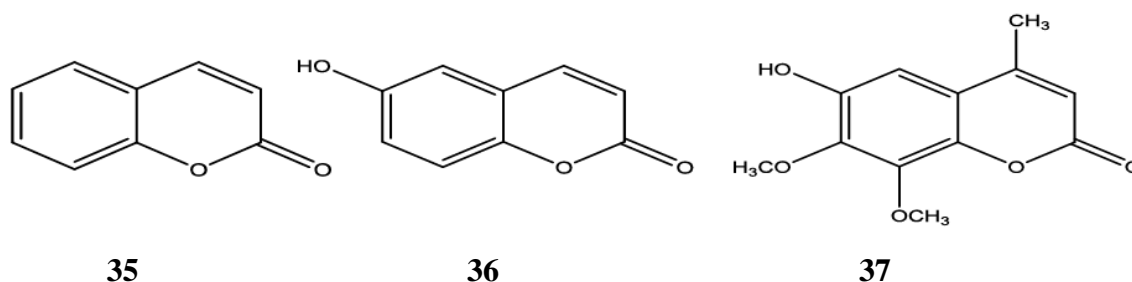


Figure 12: Structures des coumarines isolées à partir des *Tamarix* L

I.6.3. Les huiles essentielles

Saidana et ses collaborateurs ont recherché les composants des huiles essentielles des parties aériennes de *Tamarix boveana* d'origine tunisienne, ce qui a permis de dénombrer 62 composants dont 5 sont majoritaires à savoir : acide hexadecanoïque, germacrene D, acétate d'eschyle, benzoate de benzyle [173].

Tableau 04: Les composants majoritaires d'huile essentielle du *Tamarix boveana*.

Organe	Composant	Pourcentage %
Les parties aériennes	- benzoate de benzyle	4.11
	- acétate d'Eschyle	7.34
	- germacrene D	7.68
	- Docosane	13.43
	- acide Hexadecanoïque	18.14

L'huile essentielle des feuilles et des branches de *Tamarix chinensis* est constituée de 63 composants dont un majoritaire qui est l'acide Hexadecanoïque 22 % [189]

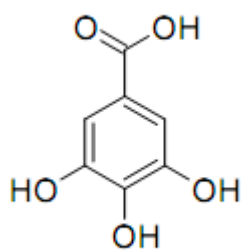
I.6.4. Divers

D'autres métabolites secondaires furent aussi isolés à partir du genre *Tamarix* L, que nous pouvons citer dans le tableau suivant :

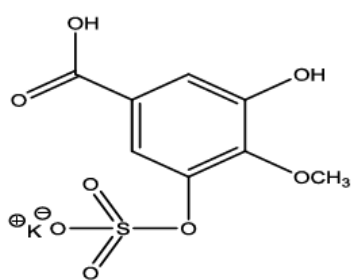
Tableau 05: Divers métabolites secondaires isolés à partir du genre *Tamarix* L

Le type de composé	Le composé	L'espèce	Réf
Les acides galliques et ses dérivés	acide gallique 38 acide gallique 5- potassium sulfate 39	<i>T. amplexicaulis</i>	[190]
	2, 6-di- <i>O</i> -galloyl-(α/β)-4C ₁ - glucopyranoside 40 3, 6-di- <i>O</i> -galloyl- (α/β)-4C ₁ -glucopyranoside 41 Dehydrodigallique 42 dehydrotrigallique acide 43	<i>T. aphylla</i>	[176]
	<i>p</i> -methoxy acidegallique 44 2,3-digalloyl-D-glucopyranoside 45	<i>T. nilotica</i>	[185,191]
	1,3-Di- <i>O</i> -galloyl-4,6- (<i>S</i>) hexahydroxydiphenoyl-Dglucopyranoside 46	<i>T. pakistanica</i>	[192]
	Les acides Ellagiques	2, 7-di-méthyl éther, 3- <i>O</i> -sulfate ellagique acide 47 3,8-di-méthyl éther, 2- <i>O</i> -sulfate ellagique acide 48	<i>T. tetragyna</i> , <i>T. amplexicaulis</i>
	acide ellagique 49	<i>T. africana</i> , <i>T. canariensis</i> , <i>T. hispida</i> , <i>T. pentandra</i> ,	[195]
Les acides cinnamiques et ses dérivés	<i>Trans</i> 2-hydroxy-4-méthoxy cinnamique acide 50 hexasosyl- <i>p</i> -coumarate 51	<i>T. dioica</i>	[183]
	acide férulique 52 acide isoférulique 53	<i>T. tetragyna</i>	[194]
	3-hydroxy-4-méthoxy cinnamaldehyde(isoferulaldehyde) 54	<i>T. nilotica</i>	[196]

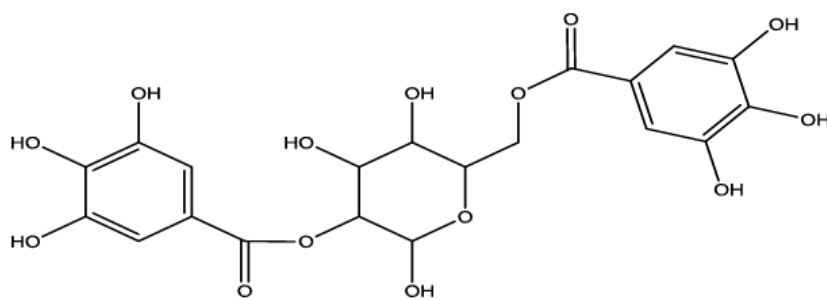
	4-hydroxy-3-méthoxy cinnamaldehyde(ferulaldehyde) 55		
	<i>Trans</i> coniferyl alcool -4- <i>O</i> -sulphate 56	<i>T. gallica</i> <i>T. africana</i> <i>T. bobeaana</i>	[180]
Les lactones phénoliques	3, 4, 8, 9, 10-penta hydroxy-dibenzo [b,d] pyran-6-one 57 3,7,8-Trihydroxy-2H,5H pyrano [3,2 c][1]benzopyran-2,5- dione 58	<i>T. aphylla</i>	[198]
Les alkyls phénoliques	3-Methoxy-5-tri cosyphenol (Tamarixinol) 59	<i>T. chinensis</i>	[199]
Les composés aliphatiques	7-Hentriacontanol 57 (Z) 7-Hentriacontene 60	<i>T. dioica</i>	[200]
	(+) 12 Hentriacontanol 61	<i>T. troupii</i>	[198]
	(±) 12 Hentriacontanol 62	<i>T. gallica</i>	
Les triterpenes	D-friedoolean-14-en-3 α , 28-diol (isomyricadiol) 63 Myricadiol 64 28-hydroxy-D-friedoolean-14- en-3-one 65	<i>T. aphylla</i>	[201]
	3 α -[3", 4"-dihydroxy-transcinnamoyl]- oxy - Dfridoolean-14-en-28-oic acid 66	<i>T. hispida</i>	[202]
	Tamarixol 67 Tamarixone 68	<i>T. chinensis</i>	[199]
	3- β -al-D-fridoolean-14-en-28- oate 69 3-[3',4'-dihydroxytranscinnamoyl]- Oxy -D-fridoolean- 14-en-28-oic acide 70	<i>T. laxa</i> <i>T. elongate</i>	[203]



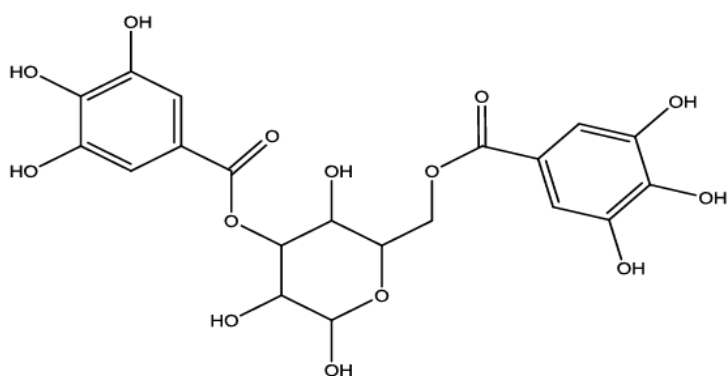
38



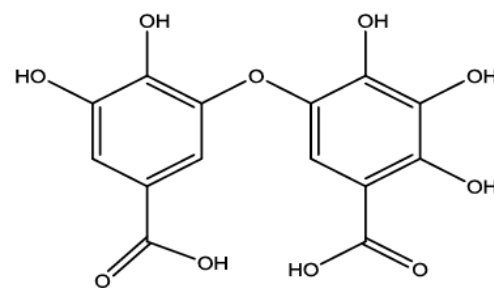
39



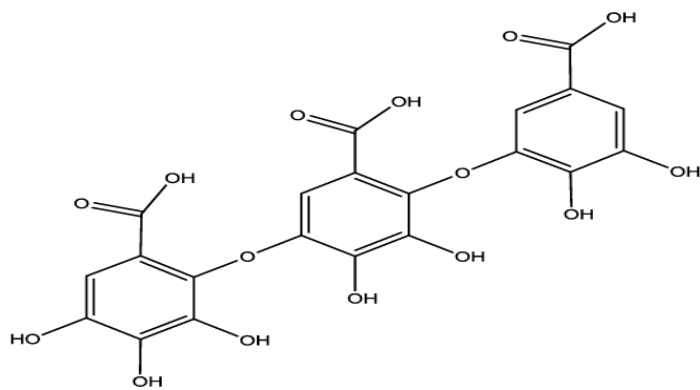
40



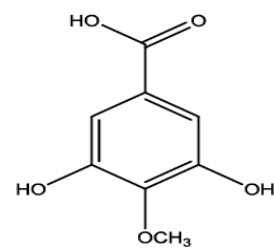
41



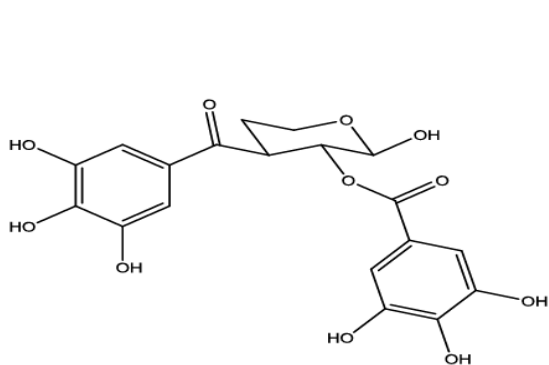
42



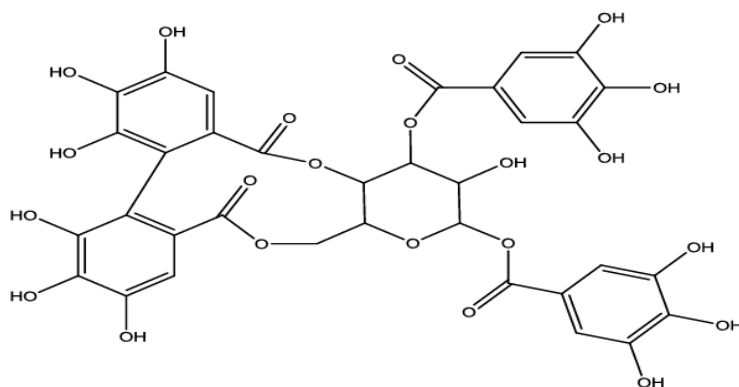
43



44

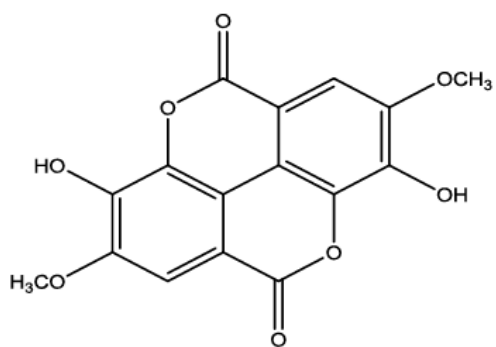


45

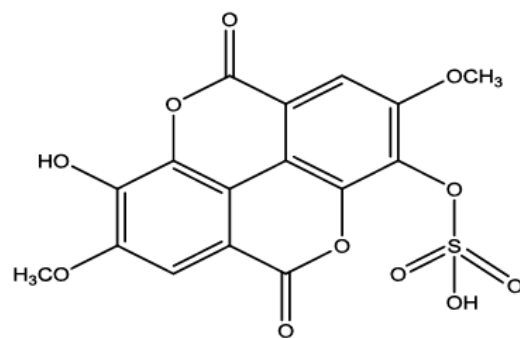


46

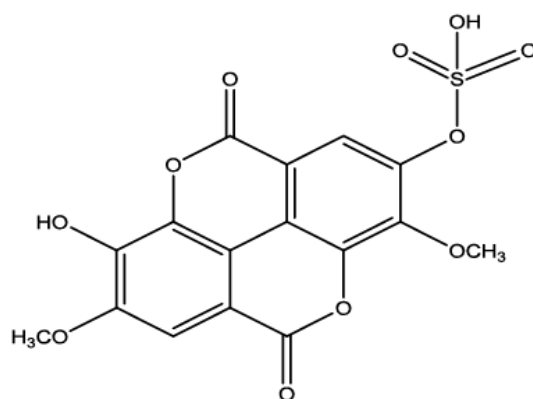
Figure 13: Structures des acides galliques et ses dérivés isolés à partir du *Tamarix L*



47

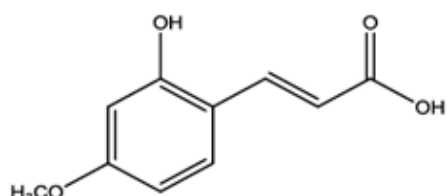


48

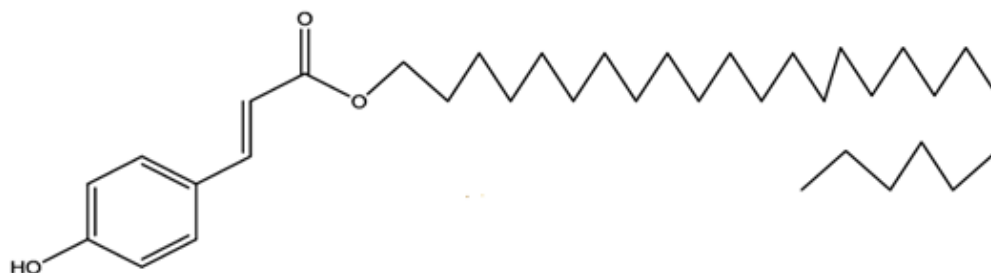


49

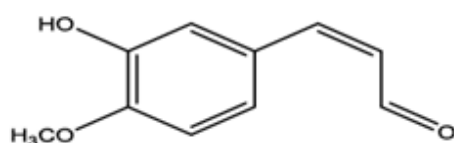
Figure 14: Structures des acides ellagiques et ses dérivés isolés à partir du *Tamarix L*



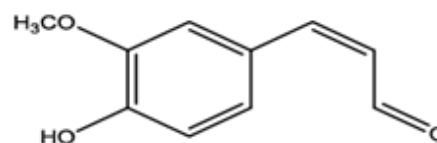
50



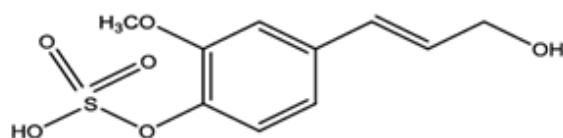
51



52



53



54

Figure 15: Structures des acides cinnamiques et ses dérivés isolés à partir du *Tamarix L*

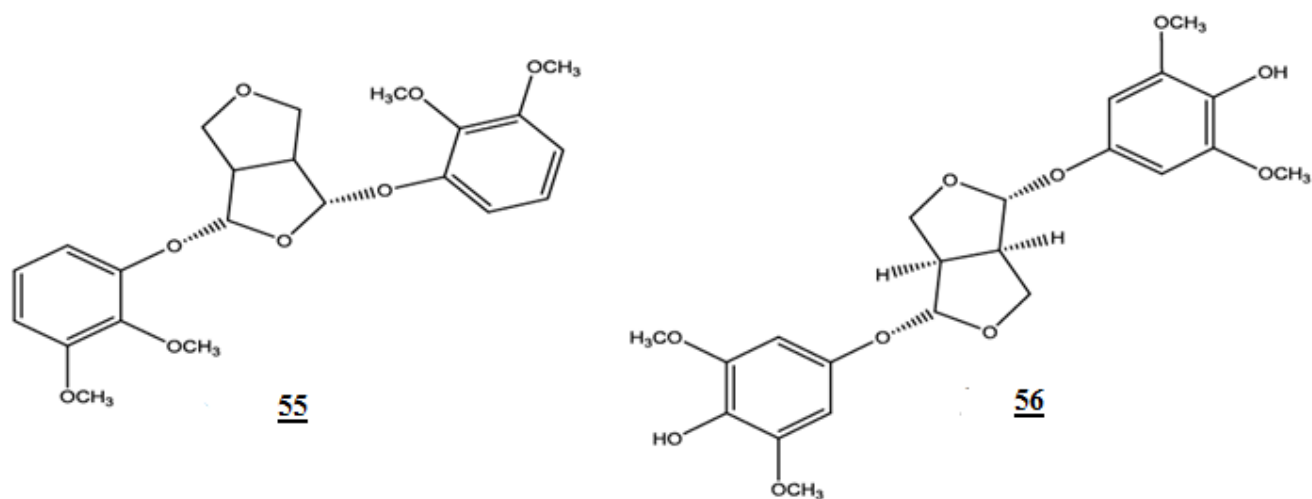


Figure 16: Structures des lignanes isolés à partir du *Tamarix L.*

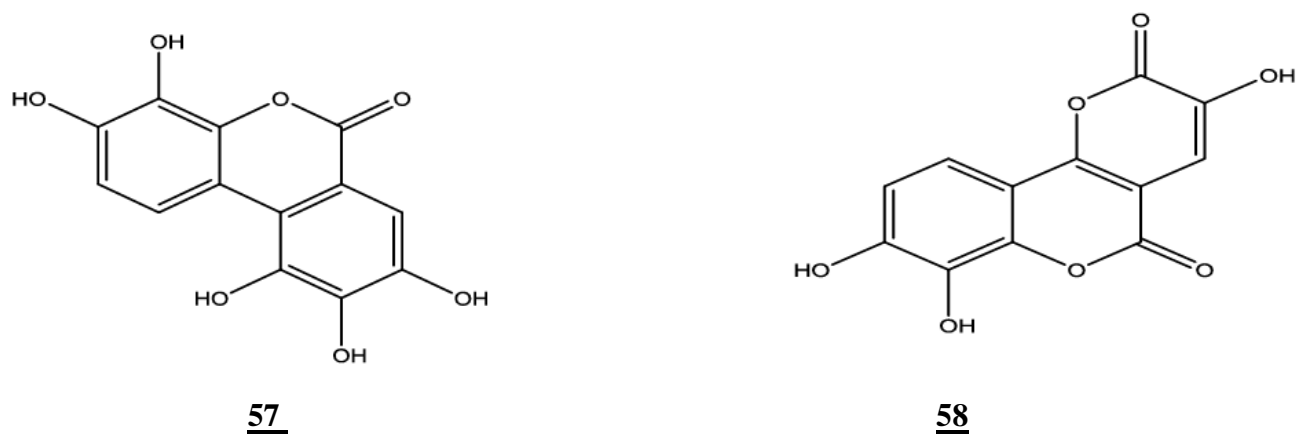
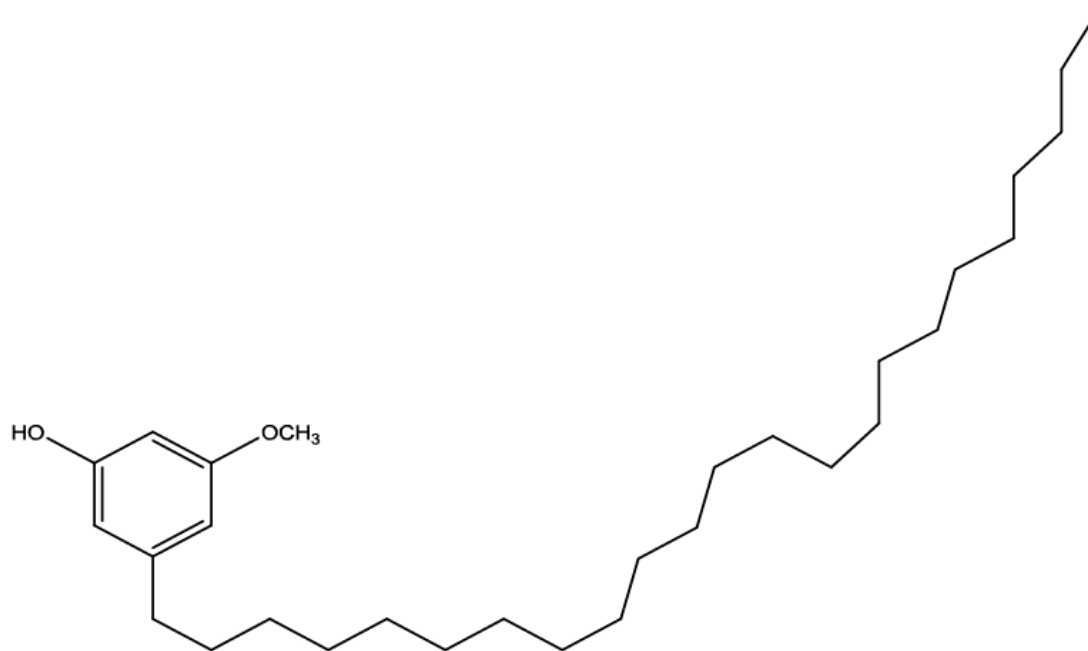
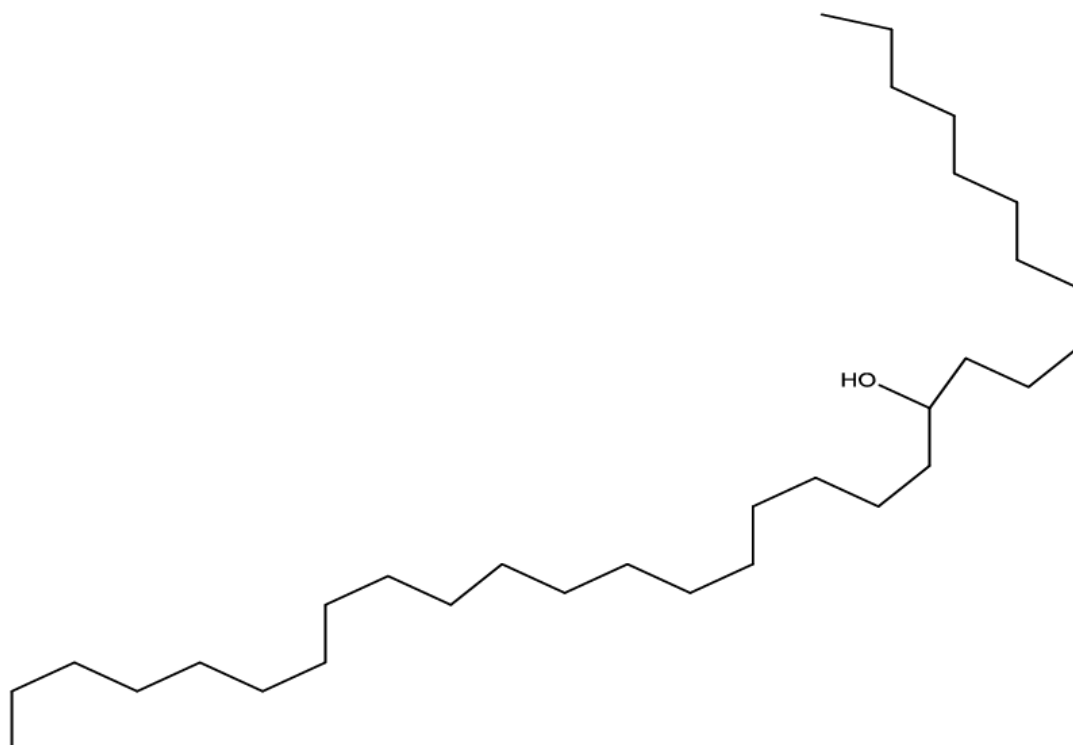


Figure 17: Structures de lactones phénoliques isolées à partir du *Tamarix L.*

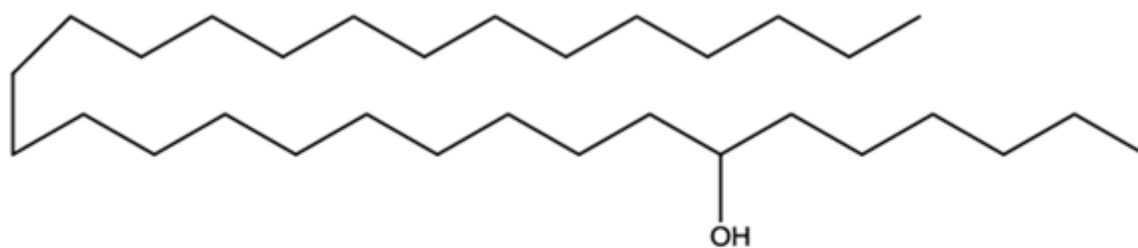


59

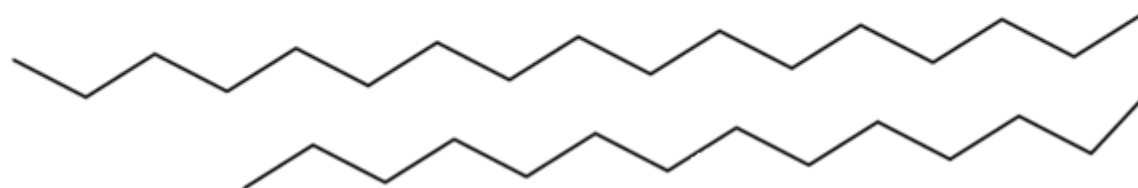
Figure 18: Structures des alkyls phénoliques isolés à partir du *Tamarix* L.



60

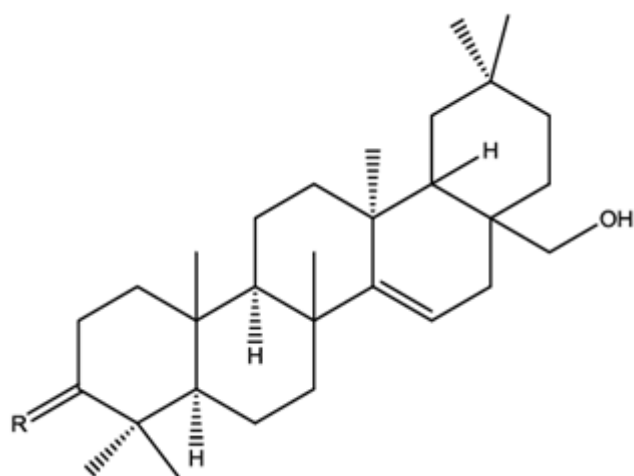


61



62

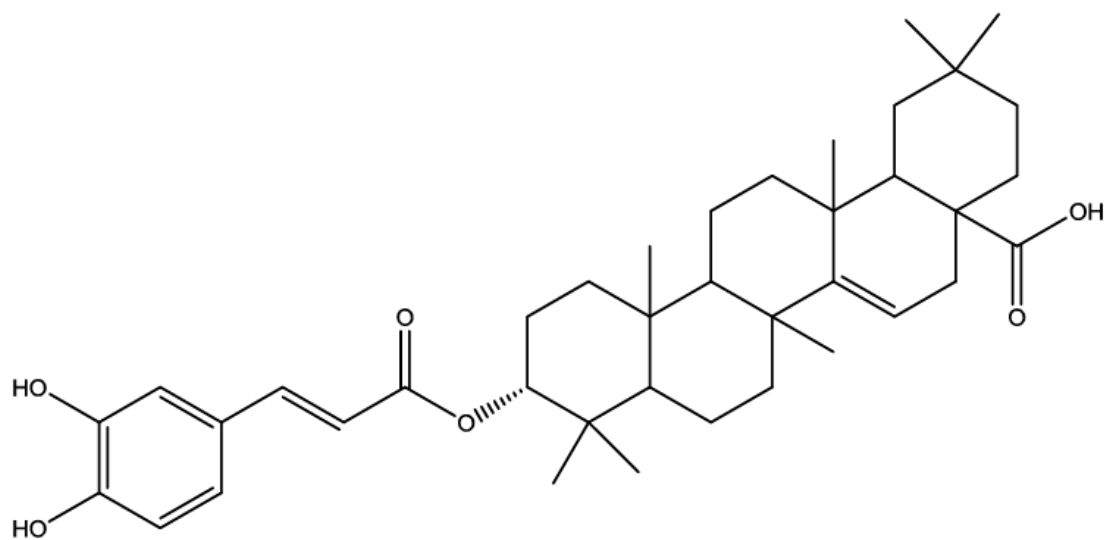
Figure 19: Structures des composés aliphatiques isolés à partir du *Tamarix L.*



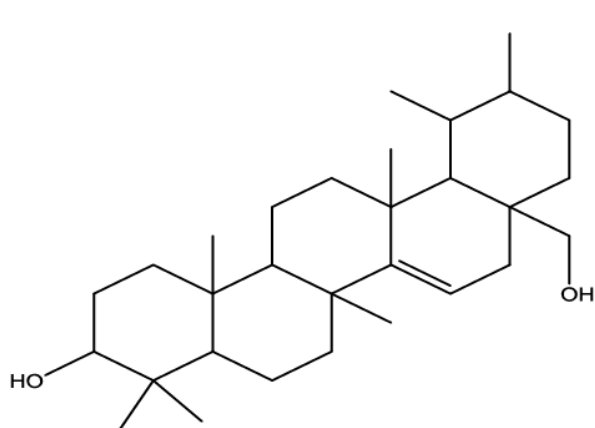
63 : R=β-H, α-OH

64 : R= α-H, β-OH

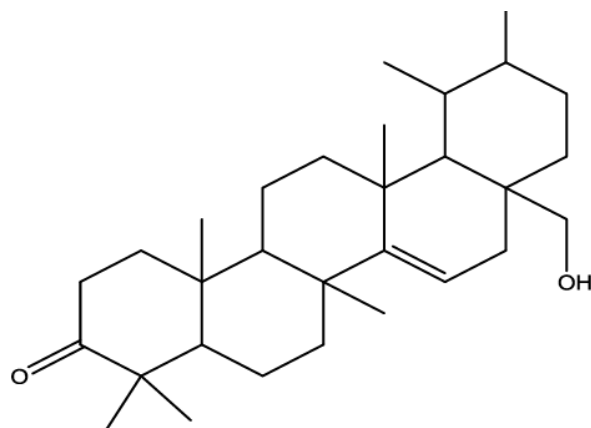
65 : R= O



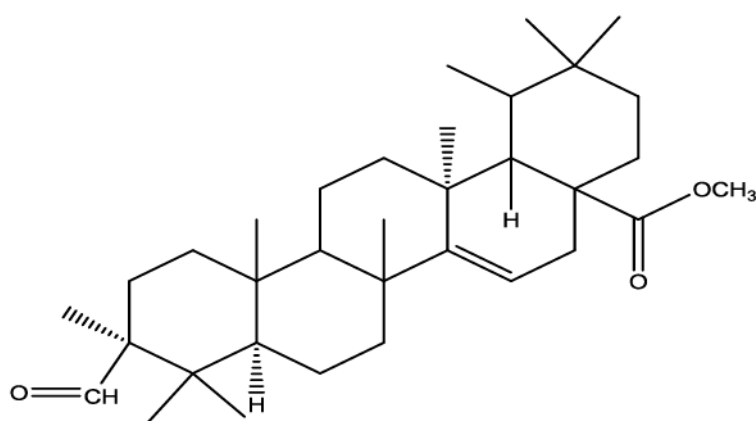
66



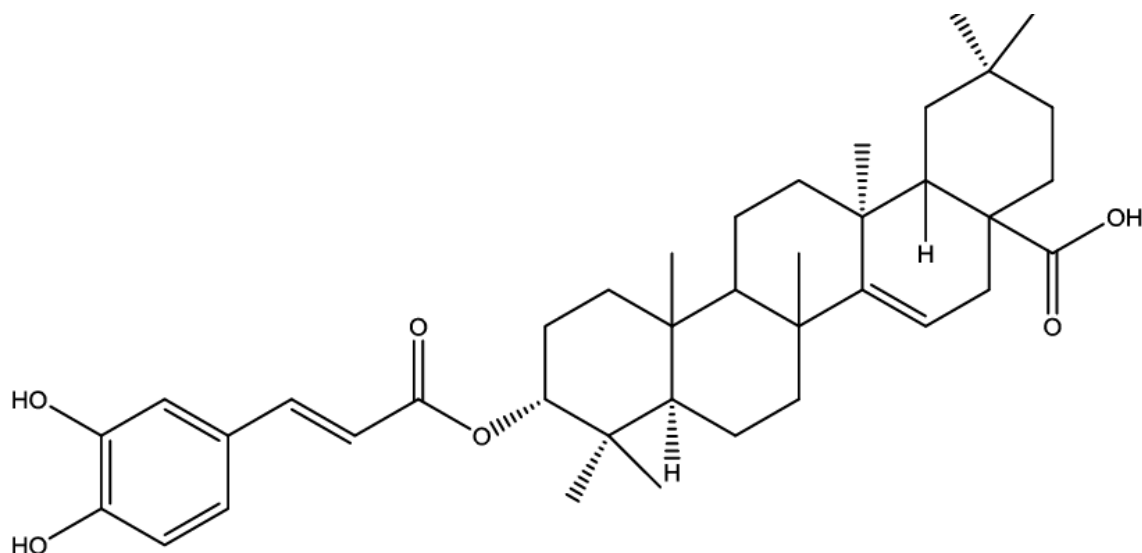
67



68



69



70

Figure 20: Structures des tritèrènes isolés à partir du *Tamarix* L.

I.7. Etude du genre *Tamarix* L

Le genre *Tamarix* L est représenté par des espèces protophytes facultatives et généralement halophytes qui sont originaires d'Europe, de la méditerranée, de l'Afrique du nord, du Sahara et de l'Asie [204].



Schéma 01: Aire d'origine de la répartition du genre *Tamarix* L.

En Algérie le genre *Tamarix* L est représenté par 10 espèces [168] qui sont reportés dans le tableau suivant :

Tableau 06: Les différentes espèces du genre *Tamarix* L en Algérie

<u>Tamarix aphylla (L.) Karst</u>	<i>Tamarix balansae</i> J. Gay.
<u>Tamarix gallica L.</u>	<i>Tamarix speciosa</i> BaII. appI. Maire
<i>Tamarix boveana</i> Bunge	<i>Tamarix anglica</i> Webb
<i>Tamarix parviflora</i> Ehrenh.	<i>Tamarix pauciovulata</i> J. Gay.
<i>Tamarix africana</i> Poiret	<i>Tamarix brachystylis</i> J. Gay.

I.7.1. Caractères généraux du genre *Tamarix* L

Les *Tamarix* sont en général des arbrisseaux ou arbres, très rameux dressés, grêlés, effilés, ceux de l'année sont feuillés.

- Les feuilles sont petites, en forme d'écailles, alternées, plus au moins difficiles à la base et imbriquées ou linéaires.
- Les fleurs sont aussi petites, de moins de 2mm de diamètre, de couleur rose ou blanche, nombreuses en long épi plus ou moins cylindriques.



Schéma 02: La forme des fleurs chez les *Tamarix* L.

- Les fruits sont en forme de capsules trigones contenant de petites graines.
- Les graines sont petites avec une touffe de cheveux sur l'extrémité qui leurs facilitent leur dispersion par le vent, ou de flotter sur l'eau [205]. Ils sont par ailleurs cylindriques et très petites [206].

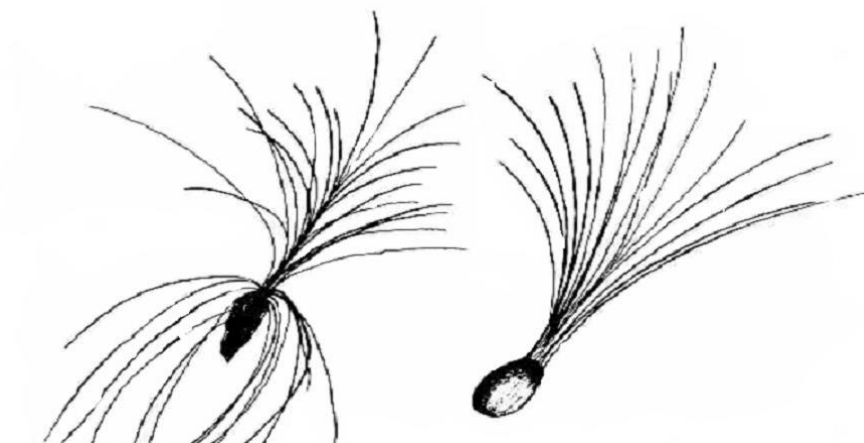


Schéma 03: La forme des grains de certaines espèces du genre Tamarix L.

I.7.2 L'espèce *Tamarix gallica* L

L'espèce *Tamarix gallica* L, possède de remarquables propriétés thérapeutiques ; c'est pour cette raison que plusieurs tradipraticiens l'utilisent comme agent : astringent, expectorant, et laxatif [207].

En Algérie cette plante, souvent connue sous le nom Tarfa et Tarfaïa, est largement employée afin de se soigner le rhumatisme, et la diarrhée [208].



Schéma 04: *Tamarix gallica*

I.7.2.1 Nom vernaculaire

En Algérie : Tarfa, Tarfaïa [168]

En Inde : Jhau [208]

En anglais : Tamarisk [209]

I.7.2.2 Classification

Tableau 07:La classification de *Tamarix gallica* L.

Règne :	Plantae
Sous règne :	Tracheobionta
Division :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida
Sous-classe :	Dilleniidae
Ordre :	Violales
Genre :	<i>Tamarix</i>
Espèce :	<i>Tamarix gallica</i> L

I.7.3.3 Description botanique du *Tamarix gallica*

a- Ecorce: arbuste à écorce brune rougeâtre et à minces rameaux glabres, paraissant plumeux.

b- Feuilles: Les feuilles sont alternées, d'un vert blanc rosâtre, elles n'ont qu'environ 5 mm de diamètre, mais très nombreuses, disposées en épis denses, donnant à l'ensemble de la plante une coloration rose.

c- Fleurs: Fleurs petites globuleuses dont le bouton en chaton, large de 3-4 mm, naissant sur les pousses de l'année, très denses dans lieux humides, au bord de l'eau.

d- Fruits: Le fruit est une graine surmontée d'une courte touffe de poils

e- Graines: contenues dans une capsule.

f- Troncs: Arbrisseau de 1 à 3 mètres, à rameaux grêles, effilés, rougeâtres.

g- Inflorescences: racème d'épi.



Schéma 05: Description botanique du *Tamarix gallica*

I.7.3. L'espèce *Tamarix articulata* L

Le *Tamarix articulata* est un arbre qui existe dans toutes les régions désertiques. Il résiste aussi bien aux températures les plus fortes qu'aux températures les plus basses [209]. Le *Tamarix articulata* supporte des températures variant entre 47°C et 50°C. Il résiste aussi, au froid qui peut atteindre -5°C en hiver, dans la vallée sud du grand Atlas.



Schéma 06: *Tamarix articulata*

I.7.3.1 Nom vernaculaire

Le *Tamarix articulata* (L.) karst est l'espèce la plus facile à distinguer parmi les nombreux *Tamarix* existants. Il a reçu plusieurs noms dont le plus ancien est *Tamarix alte* P. Alp qui fut donné par le naturaliste italien PROSPERI ALPINI en 1735. Cette dénomination a été ensuite changée par LINNE [211] bien que cette nomination a la priorité, elle a été cependant contestée à cause de l'erreur du genre, ce qui fait que la dénomination *Tamarix articulata* vahl est celle que l'on adopte généralement. Le *Tamarix aphylla* L. karst est communément connu sous le nom de Tabarkket n Tamahaq (langue parlée des touaregs de l'Hoggar) et Ethel ou Tloua en arabe.

I.7.3.2. Classification

Tableau 08:La classification de *Tamarix articulata*.

Embranchement :	Spermaphytes
Sous-embranchement:	Angiospermes
Division :	Magnoliophyta
Classe :	Dicotylédones
Sous-classe :	Archichlamydées
Ordre :	Parlétales
Genre :	<i>Tamarix</i>
Espèce :	<i>Tamarix aphylla</i> L. karst.

I.7.3.3 Description botanique du *Tamarix articulata* L

a- Ecorce: rugueuse, marron à gris foncé, profondément crevassée, fissurée, feuillage retombant, vert glauque.

b- Feuilles: petites écailleuses imbriquées formant un fourreau autour des rameaux, de sorte que ceux-ci paraissent articulés et dépourvus de feuilles, ponctués de minuscules trous correspondant à des entonnoirs au fond desquels se trouvent placées des stomates et par exsude un mucus contenant du sel.

c- Fleurs: groupées en chatons grêles avec 5 étamines sur les jeunes pousses, petites 1.5 à 3mm, ovaire libre à 3 stigmates, portant des fleurs blanches ou roses.

d- Fruits: une capsule conique d'environ 3mm.

e- Graines: contenues dans une capsule ornée d'une aigrette.

f- Troncs: uniques, robustes, non mutilés. Hauteur 12-15m, diamètre environ 2m.

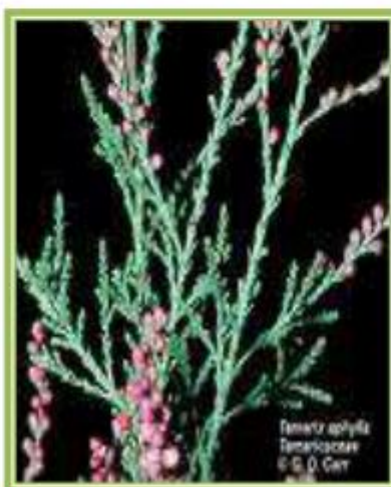
g- Inflorescences: en grappes denses, sont réunis au sommet des jeunes tiges floraison



Fleurs de de *Tamarix articulata*



arbre *Tamarix articulata*



Feuilles et grains de *Tamarix articulata*

Schéma 07: Description botanique du *Tamarix articulata*

Partie expérimentale

Chapitre I

Matériels et Méthodes

I. MATERIELS

I.1. Matériel végétal

I.1.1. Choix des plantes

Les deux plantes ayant fait l'objet de notre étude ont été choisies sur la base d'une recherche bibliographique méticuleuse qui a montré que ces espèces végétales sont très peu ou pas étudiées. L'endémisme était un autre facteur important à prendre en considération dans notre choix.

I.1.2. Identification botanique

L'identification du matériel végétal est faite par le Dr. Youcef HALIS Professeur associé, Centre de recherche scientifique et technique pour les zones arides (CRSTRA), Station biophysique à Touggourt, Algérie.

I.1.3. Récolte de la plante

La plante est récoltée à la fin du mois de Septembre 2016 dans la région saharienne d'El oued. Les plantes sont ensuite lavées puis séchées à l'air libre et à l'ombre pendant une semaine. Après le séchage, les plantes sont finement broyées puis stockées dans des bocaux fermés hermétiquement et placés dans un endroit à l'abri de la lumière et de la chaleur avant leur utilisation.

I.2. Réactifs chimiques et appareillage

Tous les produits chimiques utilisés sont de qualités analytiques. Les réactifs chimiques et solvants nous ont été fournis par les sociétés Sigma Aldrich (France), Alpha Asear (France).

Les différents appareils utilisés pour nos analyses sont les suivants:

- Un rotavapeur de marque B.U.C.H.I modèle R-210, équipé d'un refroidisseur supérieur.
- Un spectrophotomètre Shimadzu UV-Vis 1800, caractérisé par une haute résolution et une erreur inférieure à 0.01 nm. Cet appareil est relié à un microordinateur pour faciliter le traitement des résultats.
- Un chromatographe liquide à haute performance HPLC (RP - HPLC) de marque Shimadzu composé d'un dégazeur DGU-20 A3, deux pompes LC-20 AT couplées à un détecteur UV-Visible SPD-20 A et équipées d'une boucle d'injection de 20 µl et

d'une colonne CTO-20 AC (RP C18 taille 4.6 mm x 150 mm; avec une taille de particules de 5 µm).

- Un incubateur Mammert caractérisé par une haute précision de la température (Allemagne).
- Une centrifugeuse à grande vitesse de type EBA 21 de marque Hittech (Allemagne).

I.3. Souches bactériennes

Les souches bactériennes ayant fait l'objet de cette étude ont été gracieusement fournies par le laboratoire de pathologie de l'hôpital central d'El Oued (Algérie), au sein duquel nous avons réalisé cette partie de notre travail, à savoir le test antibactérien: *E. coli* (ATCC 35218 P), *Micrococcus luteus* (NCIMB 8166) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

* *Escherichia coli* (ATCC 35218 P)

Cette espèce appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. C'est un coccobacille, gram négatif et mobile (ciliature peritriche) [212]. C'est une bactérie aérobie ou anaérobie facultative, catalase positif et oxydase négatif [213]. Elle fermente le glucose et le lactose avec production de gaz. C'est une bactérie indicatrice de contamination fécale des eaux potables et des aliments [214]. Nous avons choisi de tester nos extraits sur *E. coli* parce que c'est l'agent pathogène le plus fréquemment impliqué dans les infections humaines, d'origine bactériennes [212].

* *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213)

L'espèce appartient à la famille des *Staphylococcaceae*. L'espèce *S. aureus* est l'une des espèces redoutées du genre *Staphylococcus*. Ces cellules sont des coques regroupées en amas (grappes de raisin). Ce sont des Gram positif, immobiles, anaérobies facultatives, non exigeantes. C'est une bactérie productrice de l'enzyme coagulase, et d'un ensemble de toxines responsables des symptômes cliniques observés lors des infections invasives, des toxicoses et des formes mixtes causées par cette espèce [212].

* *Micrococcus luteus* (NCIMB 8166)

Le *Micrococcus luteus* est une bactérie Gram positif qu'on retrouve sur la peau, dans la bouche et les voies respiratoires supérieures des mammifères, y compris celles de l'homme. C'est l'espèce de micrococcus la plus courante et qui peut persister jusqu'à deux ans et demi sur la peau humaine. Il ne s'agit pas d'une bactérie systématiquement pathogène mais elle peut le devenir chez les personnes immunodéprimées. Le *Micrococcus luteus* peut alors se rendre

responsable d'abcès intracrâniens, de pneumonie, d'endocardite, d'arthrite septique ou encore de méningite[212].

II. Méthodes

II.1. Objectifs et méthodologie

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des produits naturels issus des plantes médicinales sahariennes. Nous avons voulu apporter par la présente étude notre contribution à une meilleure connaissance relative aux activités biologiques et à la composition chimique de deux espèces végétales spontanées très peu connues jusqu'à présent.

Dans ce contexte, et dans l'optique de recherche des extraits, des fractions d'extraits ou des nouveaux composés bioactifs qui peuvent trouver des applications dans le domaine agroalimentaire et pharmaceutique, notre étude se propose d'évaluer *in vitro* deux activités biologiques dont la capacité antioxydante et l'activité antibactérienne de ces deux plantes.

Notre démarche expérimentale est résumée à travers le schéma suivant (Figure 21):

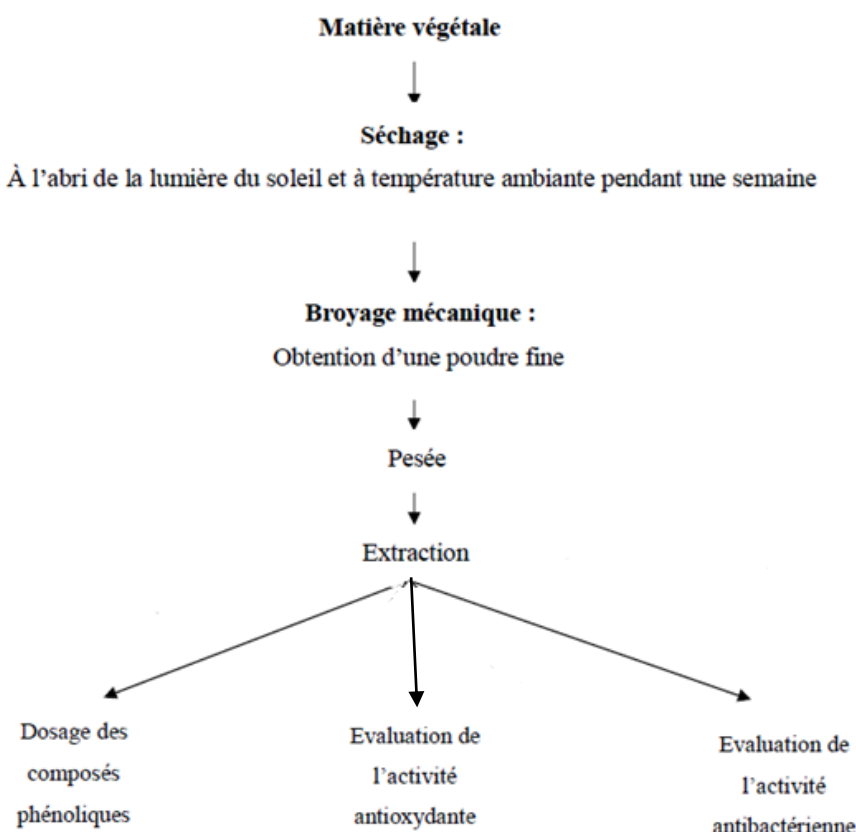


Figure 21: Schéma illustrant la démarche expérimentale suivie dans cette étude

II.2. Préparation des extraits

Cette étape consiste à extraire le maximum des substances actives contenues dans les plantes en utilisant le méthanol comme solvant organique auquel nous avons ajouté une quantité d'eau pour en augmenter la polarité.

Une quantité de 10 g de chaque plante sèche et finement broyée est macérée dans 150 ml Méthanol-eau dans une proportion de (70:30) en volume, pendant 24H. Une agitation manuelle de temps à autre a été effectuée. Les macérations hydrométhanoliques ainsi obtenues sont filtrées sur papier filtre, puis évaporées à sec sous vide à l'aide d'un rotavapeur. Les résidus secs sont pesés puis repris dans l'Ethanol ou dans le DMSO 1% pour le test antibactérien.

II.2.1. Préparation du filtrat hydrométhanolique

Extraction à froid ou Macération

La macération consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante et qui a l'avantage de préserver les substances thermosensibles. Cette extraction se déroule en deux étapes (Figure 22):

A. Préparation du filtrat hydrométhanolique

Une quantité de 80 g de la poudre de plante délipidée est macérée quatre fois dans 450 ml de Méthanol 70% pendant 24 heures sous agitation. Le filtrat hydrométhanolique obtenu est filtré sur papier filtre, puis concentré sous vide à l'aide d'un rota vapeur à 45°C, pour obtenir une solution aqueuse chargée en substances extractibles.

B. Fractionnement de la phase aqueuse

La solution aqueuse (phase aqueuse) ainsi obtenue est diluée avec de l'eau distillée puis subit une extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter avec une succession de solvants organiques par ordre de polarité croissante: chloroforme (CHCl_3), acétate d'éthyle (AcOEt) et n-Butanol. La solution aqueuse est extraite jusqu'à l'épuisement avec chaque solvant; chaque portion de solvant organique (phase organique) reste en contact avec la phase aqueuse sous agitation manuelle pendant quelques secondes, puis elles sont laissées reposer jusqu'à la séparation des deux phases. Après décantation, les portions de chaque phase organique sont réunies et évaporées à sec, sous pression réduite à 45°C. Les trois extraits issus du fractionnement sont pesés puis repris dans l'Ethanol 100 %.

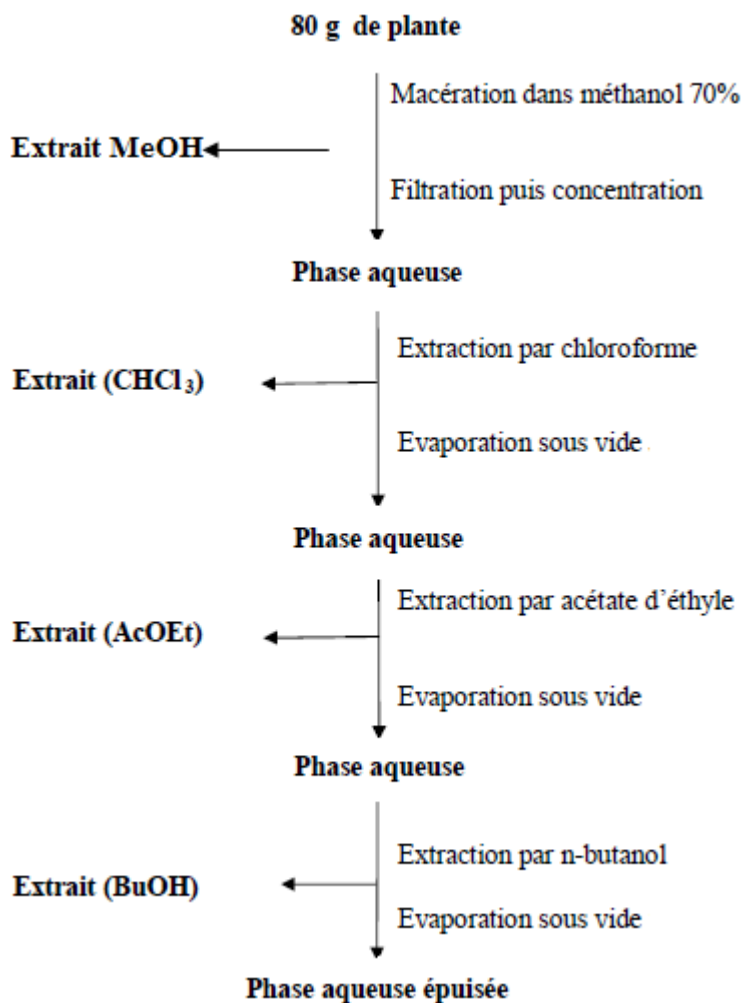


Figure 22 : Les étapes de préparation des différentes phases de la plante [214].

II.2.3. Calcul de rendement

Le rendement en pourcentage (%), est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait et celle de la plante sèche en poudre. Il est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rdt} = \left(\frac{P_B}{P_A} \right) \times 100$$

P_B : poids d'extrait brut.

P_A : poids de la plante sèche en poudre.

II.3. Méthodes de caractérisation quantitative des polyphénols

Les méthodes colorimétriques basées sur l'utilisation du spectrophotomètre UV-visible, ont été utilisées pour évaluer la quantité des composés phénoliques dans la matière végétale.

La caractérisation quantitative des différentes phases de la plante a été réalisée de la manière suivante :

II.3.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit en 1965 par Singleton et Rossi. Depuis, son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origines plus diverses.

➤ Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène [215]. La coloration produite, dont l'absorption maximum à environ 760-765 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux [216].

➤ Protocole

Les polyphénols totaux ont été déterminés par spectrophotométrie, suivant le protocole appliqué par Singleton et Rossi en 1965. 0.3-0.03mg/ mL d'extrait végétal dilué dans le méthanol est mélangé avec 0,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (FCR). Après 5 minutes, 1250 μ l de 2% de carbonate de sodium (Na_2CO_3) et 1000 μ l d'eau distillée sont ajoutés. Après une incubation du mélange réactionnel pendant 90 minutes à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 760 nm.

La courbe d'étalonnage est effectuée à l'aide de l'acide gallique à différentes concentrations (0-500 μ g/ml), dans les mêmes conditions et les mêmes étapes de dosage. Les résultats sont ainsi exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par 1g poids sec de l'extrait (mg EAG/1g EXS). Toutes les mesures sont répétées 3 fois.

II.3.2. Dosage des flavonoïdes

➤ Principe

Le dosage des flavonoïdes totaux est basé sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ avec lequel ils forment des complexes acides stables soit avec le carbonyle (C=O) en position C-4, soit avec le groupe hydroxyle en C-3 ou C-5 des flavones et des flavonols. Par ailleurs, $AlCl_3$ peut également former des complexes acides labiles avec les groupements orthodihydroxyyles éventuellement présents sur le noyau A et/ou B des flavonoïdes [217].

➤ *Protocole*

La méthode décrite par Chang CC et ses collaborateurs (2002) [217] est adoptée pour déterminer la teneur en flavonoïdes dans les différents extraits des deux plantes étudiées. 10 ml sont introduits successivement 500 μ l de l'extrait méthanoïque des feuilles à concentration connus et 1.25 ml d'eau distillée. Après 5 minutes on ajoute 75 μ l d'une solution de NaNO₂ (5%), aussi après 5 minutes 125 μ l d'AlCl₃ (10 %) sont ajoutés. Ensuite à 6 minutes, 500 μ l de NaOH (1N) et 275 μ l d'eau distillée sont ajoutés successivement au mélange. La solution est bien homogénéisée et l'absorbance a été mesurée immédiatement à 510 nm.

II.3.3. Courbes d'étalonnages des dosages des PPT et FVT

II.3.3.1. Courbe d'étalonnage pour le dosage de polyphénols totaux (PPT)

Cette courbe est établie en utilisant l'acide gallique comme référence et les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EGa/ gMs).

La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0.991$

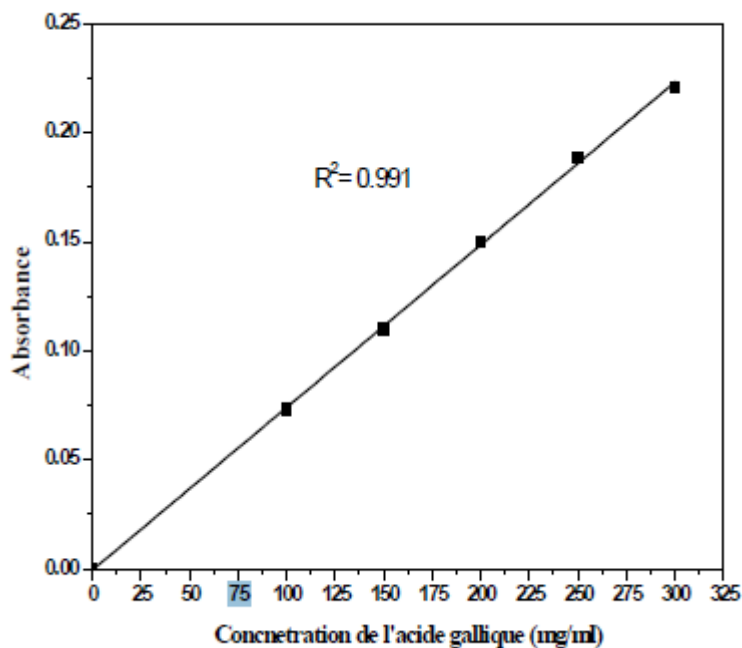


Figure 23. Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux

II.3.3.2. Courbe d'étalonnage pour le dosage de flavonoïdes totaux (FVT)

Le composé de référence utilisé pour l'établissement de cette courbe est la catéchine. La courbe est établie avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,988$ (figure 24). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg E Ct/g Ms).

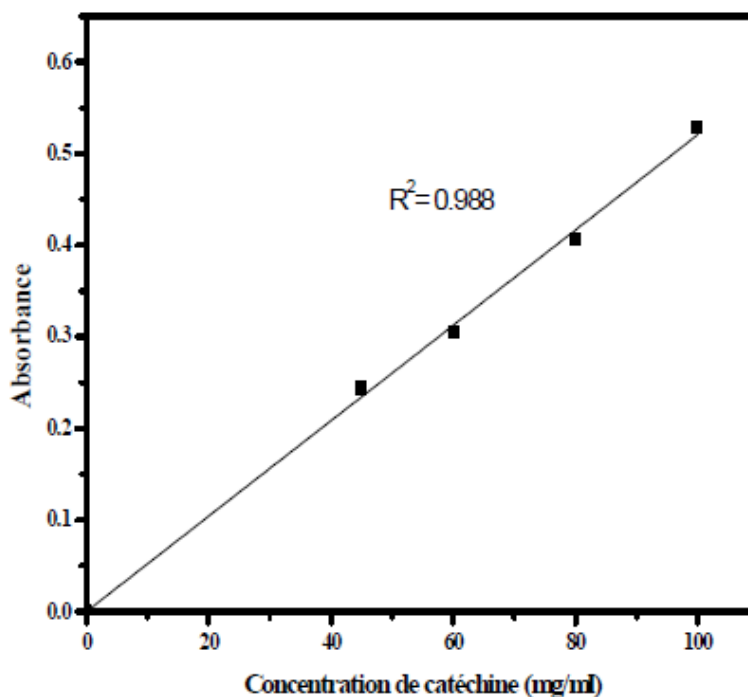


Figure 24 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux

II.3.4. Chromatographie liquide de haute performance (HPLC)

La HPLC est un moyen très flexible et simple pour isoler et identifier les différents composés d'un mélange. La HPLC peut être assez largement décrite par des théories communes. Un fluide appelé phase mobile traverse une colonne qui contient une phase solide (silices, silices fondues, silices greffées).

Au départ, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il est entraîné par la phase mobile. Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange ayant des temps de rétentions différents sont séparés par élution. Un détecteur, placé à la sortie de la colonne, couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme.

II.3.4.1. Appareillage

Les différentes parties constituant l'HPLC sont décrites ci-dessous:

- **Pompe** : une pompe est alimentée à partir des plusieurs flacons contenant des solvants, de polarités différentes permettant d'effectuer leur programmation pour assurer un système de gradient.
- En mode isocratique: 100% d'un mélange du même éluant tout au long de l'analyse,
- En mode gradient, la concentration des constituants du mélange d'éluant varie en fonction du temps.
- **Injecteur** : c'est une vanne d'injection qui porte une boucle d'échantillonnage.
- **Colonne** : elle contient la phase stationnaire qui définit le type de chromatographie, soit en phase normale soit en phase inverse.
- La phase normale : Dans le cas d'une chromatographie en phase normale, la silice est greffée par des groupements polaires et l'éluant utilisé est apolaire.
- La phase inverse :
Dans le cas de la phase inverse, la silice est greffée par des chaînes carbonées linaires (C8, C18 et l'éluant utilisé est polaire (ACN (acétonitrile), MeOH, H₂O).
- **Détecteur** : un détecteur UV-visible à longueur d'onde variable (190-400 nm) qui permet de détecter les différents composés contenus dans l'échantillon à analyser. Notons qu'il est important que les produits à détecter portent un chromophore qui absorbe dans cette plage de longueur d'onde
- **Les solvants**
L'équilibre en adsorption est un phénomène de compétition. Les molécules de la phase mobile entrent en compétition avec les molécules de solutés pour les sites polaires d'adsorption (séparation liquide-solide). Plus l'interaction entre la phase mobile et la phase stationnaire est forte moins l'adsorption du produit en solution sera importante. Les solvants sont donc classés selon leur force qui va dans le même sens que leur polarité.

Tableau09 : Propriétés de quelques solvants utiles en chromatographie phase liquide

Solvant	UV cutoff (nm)	Viscosité (cP)	Eb (°C)	Indice de miscibilité (M)	Polarité (P)
Isooctane	215	0.50	99	29	0.1
Hexane	195	0.31	69	29	0.1
Toluène	284	0.59	111	23	2.4
Méthyl-t-butyléther	210	0.27	55	-	2.5
Dichlorométhane	233	0.44	40	20	3.1
Propanol-1	210	2.30	97	-	4.0
Tétrahydrofurane	212	0.55	66	17	4.0
Chloroforme	245	0.57	61	19	4.1
Éthanol	210	1.08	78	-	4.3
Acétate d'éthyle	256	0.45	77	19	4.4
1,4-Dioxane	215	1.37	101	17	4.8
Acétone	330	0.36	56	15	5.1
Méthanol	205	0.55	65	-	5.1
Acétonitrile	190	0.38	82	11	5.8
Acide acétique	-	1.10	118	-	6.0
Eau	190	1.00	100	-	10.2

II.3.4.2. Analyse des composés phénoliques par HPLC

➤ Conditions opératoires d'HPLC

L'analyse des composés phénoliques individuels a été réalisée suivant la méthode proposée par Merken et al 2000 [218]. La séparation chromatographique effectuée avec une colonne Shimadzu C18 HPLC (250 mm x 4,6 mm, 5 ml) et chauffé à 35 °C. La phase mobile utilisée pour la séparation est composée de TFA aqueux à 0,1% (A) et d'acétonitrile (B) en mode gradient défini comme suit: conditions initiales de 10% B; 0 à 3 min 10% de B; 3 à 15 min 15% B; 15 à 20 minutes la composition a été maintenue constamment à 15% B; 20 à 25 min 18% de B et de 25 à 40 min 30% de B. La période de l'équilibre de la colonne est de 5 minutes. Le débit a été fixé à 1 ml/ min pour toutes les expériences. La concentration des extraits est de 3 mg/ml et la capacité de la boucle d'injection est de 10 µl. La détection a été réalisée à 300 nm. Après chaque cycle, le système est reconditionné pendant 20 minutes avant une nouvelle analyse.

II.5. Evaluation de l'activité antioxydante

Cinq tests ont été utilisés pour évaluer la capacité antioxydante *in vitro* des extraits méthanoïques des deux espèces étudiées dans ce travail. Il s'agit du pouvoir antioxydant total, du pouvoir piègeur du radical DPPH[•], de celui piègeur du radical cationique ABTS^{•+}, du pouvoir réducteur du fer FRAP et enfin celui du blanchiment du β-carotène.

II.5.1. Pouvoir antioxydant total

➤ Principe

Le test est basé sur la réduction du molybdène de l'étage d'oxydation (VI) à l'étage d'oxydation (V). Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/ Mo (V)) à un pH acide. On mesure la diminution de la coloration du complexe molybdène (VI) en présence d'antioxydant. A la différence des autres tests, celui-ci permet non seulement de quantifier l'apport de l'activité antioxydant des polyphénols mais aussi d'autres composés antioxydants telles que les vitamines.

➤ Protocole

La méthode consiste à introduire dans un tube Eppendorff 300 μl de l'extrait méthanoïque à 2.7 ml d'un réactif composé de H₂SO₄ (0.6 M), de NaH₂PO₄ (28 mM) et du molybdate d'ammonium (4 mM). Le tube est ensuite bien fermé puis incubé à 95°C pendant 90 minutes. Après les avoir refroidis, l'absorbance est mesurée à 695 nm. Le témoin est constitué de 300 μl de méthanol mélangé avec 2.7 ml du réactif mentionné ci-dessus [219].

Les étalons, les échantillons et les témoins sont incubés dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg E AG/g Ms).

II.5.2. Test DPPH

➤ Principe

La molécule de 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]) est un radical libre stable, dont la solution possède une coloration violette et une absorption caractéristique à 517 nm. Quand une solution de DPPH[•] est mélangée avec une substance donneuse d'atomes d'hydrogène, antioxydant, il y a formation de la forme réduite (Figure 25). Ceci provoque la perte de la coloration violette en coloration jaune caractérisée par une bande d'absorption dans le visible à 517 nm [220].

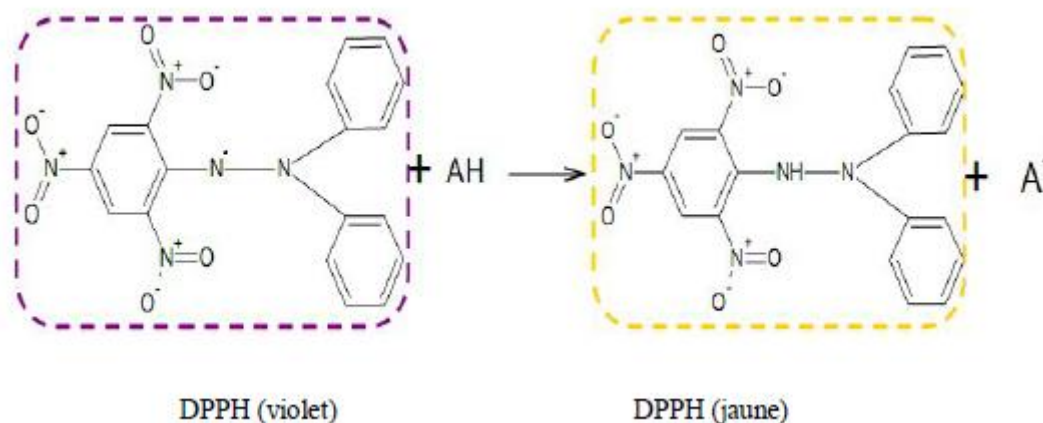


Figure 25: Structure chimique du radical DPPH[•] et de sa forme réduite.

➤ Protocole

L'effet piègeur ou le pouvoir antiradicalaire des extraits méthanoïques des plantes étudiées vis-à-vis du radical DPPH[•] est évalué selon la méthode décrite par Hanato et ses collaborateurs (1988) en y apportant quelques modifications. Un volume de 2 ml de la solution de DPPH[•] (0.2 mM) préparée dans l'éthanol 80% est mélangé avec 2 ml des solutions d'extraits ou des antioxydants de référence (BHA, Trolox, Vitamine C et Vitamine E) à différentes concentrations. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm. Le pourcentage d'inhibition (PI%) est calculé par la relation suivante :

$$I\% = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs test})}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

La concentration efficace (EC50) qui est la concentration d'extrait ou de l'antioxydant de référence responsable de 50% d'inhibition des radicaux DPPH[•] présents dans le milieu réactionnel, est déterminée sur le graphique représentant le pourcentage d'inhibition du DPPH[•] en fonction des concentrations des extraits ou des antioxydants de référence.

II.5.3. Pouvoir réducteur (FRAP, Ferric Reducing Antioxydant Power)

➤ Principe

La méthode FRAP développée par Benzie et Strain (1996) [221] correspond à la réduction d'un complexe tripyridyltriazine ferrique [(Fe(III)-TPTZ)₂] en un complexe tripyridyltriazine ferreux [(Fe(II)-TPTZ)₂] par un antioxydant (AH), à un pH de 3,6 pour maintenir la solubilité du fer (Figure 26).

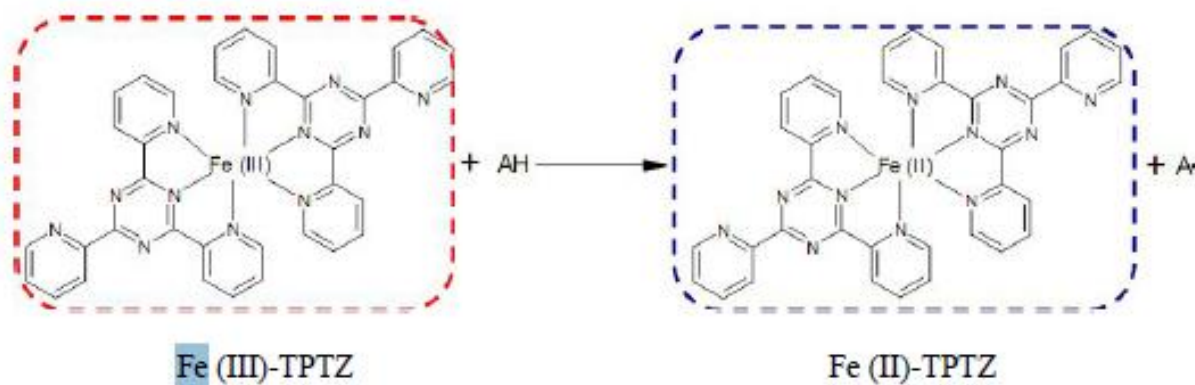


Figure 26: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant (AH).

➤ Protocole

Le test FRAP a été réalisé selon la méthode de Benzie et Strain (1996) avec quelques modifications. La solution de travail FRAP est préparée en mélangeant dans un rapport de volume 10 : 1 : 1 les trois solutions suivantes : une solution tampon d'acétate de sodium à 300 mM (pH= 3.6), une solution TPTZ à 10 mM (HCl 40 mM comme solvant) et une solution de FeCl₃ à 20 mM. La solution de travail FRAP est maintenue dans un bain thermostaté à 37°C. Le test consiste à faire réagir, dans des tubes à hémolyse en verre, 100 µl de chaque extrait avec 3 ml de la solution de travail FRAP. L'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à 593 nm après 4 min d'incubation à température ambiante.

II.5.4. Test ABTS

➤ Principe

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{•+} de coloration vert bleu en le transformant en ABTS incolore. Le radical préformé ABTS^{•+} est généré en présence des ions persulfates.



En présence d'un antioxydant, le passage du radical ABTS^{•+} à la forme non radicalaire s'accompagne par la disparition de la coloration vert bleu intense qui peut être suivie par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 734 nm) [222]. Ce test est simple, opérationnel, reproductible, et peut être utilisé dans différents milieux.

➤ Protocole

Le test ABTS est effectué selon la méthode décrite par Bainsi et Strain (1996) [221]. Deux solutions ont été préparées : une solution d'ABTS (7 mM) et une solution de persulfate de potassium (2.4 mM). Le radical cationique $ABTS^{•+}$ est généré en mélangeant les deux solutions en quantités équivalentes. Le mélange est laissé réagir pendant 12 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière. 1 mL de la solution ainsi obtenue est dilué avec 60 mL de méthanol pour avoir une absorbance de 0.8 mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 734 nm.

II.4.5. Test de blanchiment de β -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique

➤ Principe

Le β -carotène est physiologiquement un composé important reconnu par sa forte activité biologique. Dans l'industrie agro-alimentaire, il est utilisé dans les boissons comme un agent de coloration et sa décoloration indique la réduction de qualité de ces produits [223]. Cependant, dans le test du blanchiment du β -carotène, la présence des 11 paires de doubles liaisons rend le β -carotène extrêmement sensible aux radicaux libres dérivés d'hydroperoxydes qui sont formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique dans un système émulsion aqueuse en résultant le blanchiment du β -carotène[224]. La présence des antioxydants comme les polyphénols réduisent l'ampleur de la destruction du β -carotène en neutralisant les hydroperoxydes et d'autres espèces radicalaires formées à l'intérieur de ce système.

Le test de blanchiment de β -carotène utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des extraits méthanoïques de deux plantes étudiées [225].

➤ Protocole

Le β -carotène est préparé tout d'abord par dissolvant 2 mg de ce réactif dans 10 ml de chloroforme. Dans un ballon à fond rond on ajoute 2 ml de la solution β -carotène, de 40 mg d'acide linoléique et 400 mg de Tween 80.

Après cette préparation, on élimine le chloroforme à 40 ° C par l'utilisation d'un évaporateur rotatif (BUCHI R- 210, Suisse). Ensuite, on complète le mélange précédent à 100 ml d'eau aérée (riche en oxygène) dans une fiole jaugée sous agitation et protection contre la lumière. On prend 4.8 ml de la solution résultante qu'on transfère dans des tubes contenant 0.2 ml d'extraits de feuilles avec des concentrations différentes. Un échantillon témoin est préparé de 0.2 ml de méthanol et 4.8 ml de réactif de β -carotène. Les tubes ont été incubés à

50 ° C pendant 2 h, l'absorbance mesurée à 470 en utilisant un spectrophotomètre UV-visible (Shimadzu UV- 1800, Japon). L'activité antioxydante est calculée en utilisant l'équation ci-dessous :

$$IC \% = ((A_0 - A) / (A_0 - A^{\circ})) \times 100$$

Où A et A₀ sont respectivement l'absorbance calculée au temps zéro de l'incubation des extraits et témoin; Une A₀[°] et A[°] sont l'absorbance mesurée après 2 h respectivement pour l'extrait et le témoin.

II.6. Evaluation de l'activité antibactérienne

Le test d'évaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits a été réalisé par deux méthodes:

- Dans une première étape, par la méthode de diffusion sur milieu solide, pour sélectionner les extraits méthanoïque ayant une activité importante.
- Dans la deuxième étape, par la méthode de dilution en milieu liquide, afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ainsi que les concentrations minimales bactéricides (CMB).

II.6.1. Test de diffusion en milieu gélosé

Pour tester l'activité antibactérienne des espèces étudiées, nous avons adopté la technique de diffusion sur milieu solide, à partir des disques imprégnés de nos extraits. Elle permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance bactérienne par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque [226]. Une suspension de chaque bactérie est préparée dans de l'eau physiologique stérile et ajustée à 0.5 Mc-Farland (108 CFU/ml) à partir d'une culture bactérienne de 24 h sur gélose nutritive.

A l'aide d'un écouvillon stérile bien imbibé de la suspension microbienne ajustée, les surfaces du milieu gélosé Mueller-Hinton des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre ont étéensemencées. Des disques de papier Wattman N° 03 stériles de 06 mm de diamètre sont imbibés de 10 µl de chaque extrait. Le screening antibactérien a été effectué avec deux concentrations (200 et 100 mg/ml). Les disques du contrôle négatif sont imprégnés de 10 µl de solvant. Des disques standards contenant Gentamycin, antibiotique de référence, servent de contrôle positif. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37° C pendant 24 heures. A la fin de l'incubation, nous avons noté l'activité des extraits, en mesurant la zone d'inhibition, claire, autour des disques, à l'aide d'un pied à coulisse.

II.6.2. Détermination de la CMI et de la CMB

Après avoir réalisé le screening antibactérien par la méthode de diffusion, nous avons procédé à la détermination des CMI et des CMB des extraits méthanoïque des feuilles des plantes étudiées par la méthode de la dilution en liquide [227].

Des volumes constants de milieu de bouillon nutritif Mueller-Hinton (1.98 ml) ont été répartis dans des tubes à essai. Ensuite, nous avons effectué la série de dilution en cascade, allant de 50 à 0.2 mg/ml. On a préparé également pour chaque souche bactérienne, un inoculum dont la turbidité est ajustée à 0,5 Mc-Farland (soit 10⁸ CFU/ml) et ramenée à 10⁶ CFU/ml dans les tubes ainsi préparés. Un tube témoin de croissance contenant 1 ml d'une solution stérile de DMSO à 1% et 1 ml d'inoculum a été préparé, de même qu'un tube témoin de stérilité contenant 2 ml de bouillon nutritif stérile.

La série des tubesensemencés, ainsi que les deux tubes témoins sont incubés à 37° C pendant 24 heures. Après l'incubation, on examine la croissance bactérienne, dans chaque tube, qui se traduit par une turbidité. La CMI d'un extrait vis-à-vis d'une souche donnée sera la plus petite concentration ne montrant aucune croissance visible de germe.

II.7. Analyse statistique

Les données expérimentales obtenues du dosage et de l'évaluation des activités antioxydants sont été exprimées par une moyenne et plus ou moins l'écart type. Le coefficient de corrélation des différentes propriétés a été déterminé en utilisant les programmes Origine 6 et l'Excel 2003.

Chapitre II

Résultats et Discussions

I. Rendements des extraits bruts

L'extraction des composés phénoliques des plantes étudiées par la méthode de macération, nous a permis de déterminer les rendements de leurs extraits (**Tableau10**).

Tableau 10 : Rendements des extraits bruts obtenus.

Extrait	Rdt (%)	
	Tamarix gallica	Tamarix articulata
Extrait MeOH	5.44	11.08
Extrait CHCl ₃	0.86	2.33
Extrait AcOEt	0.43	1.22
Extrait BuOH	0.35	0.86

Nous constatons que l'extrait hydrométhanoïque des feuilles de *Tamarix articulata* qui enregistre un fort rendement, varie entre 0.86 à 11.08% par rapport à l'extrait hydrométhanoïque des feuilles de *Tamarix gallica* qui est compris entre 0.35 à 5.44% correspondant aux solvants utilisés.

Le rendement d'extraction est tributaire de plusieurs facteurs qui peuvent influencer les performances de l'extraction, tels que la taille des particules, la nature du solvant, la température, le temps d'extraction et le degré d'agitation.

L'utilisation d'un mélange hydroalcoolique comme solvant donne des résultats satisfaisants dans un processus d'extraction [228].

Il a été rapporté dans la littérature que la combinaison méthanol-eau dans les proportions 70 : 30 en volume donne le meilleur rendement d'une macération et que cette même combinaison a donné la teneur la plus élevée en composés phénoliques des feuilles de *Tamarix aphylla* L. par rapport à d'autres solvants dont éthanol-eau, acétone-eau et eau distillée d'extraction [229].

II. Compositions phytochimiques

II.1. Teneurs en phénols totaux

Le dosage colorimétrique par le réactif Folin-Ciocalteu appliqué dans cette étude est une méthode simple et nécessite peu de réactifs, ce qui est approprié pour l'estimation grossière de la teneur en polyphénols totaux, même si elle est limitée par la faible spécificité envers les polyphénols, et s'appuie sur l'utilisation d'un composé standard [230]. La mesure de l'absorbance d'une solution d'acide gallique, pris comme standard, à différentes concentrations, nous a permis de tracer une courbe d'étalonnage.

Les quantités des phénols totaux dans les extraits bruts ont été rapportées en milligramme d'équivalents de l'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS) **Figure 27**. En plus de sa sensibilité, cette méthode de dosage représente une productibilité puisque l'absorbance est étroitement corrélée à la concentration de l'acide gallique utilisé dans la gamme étalon, $R = 0,988$.

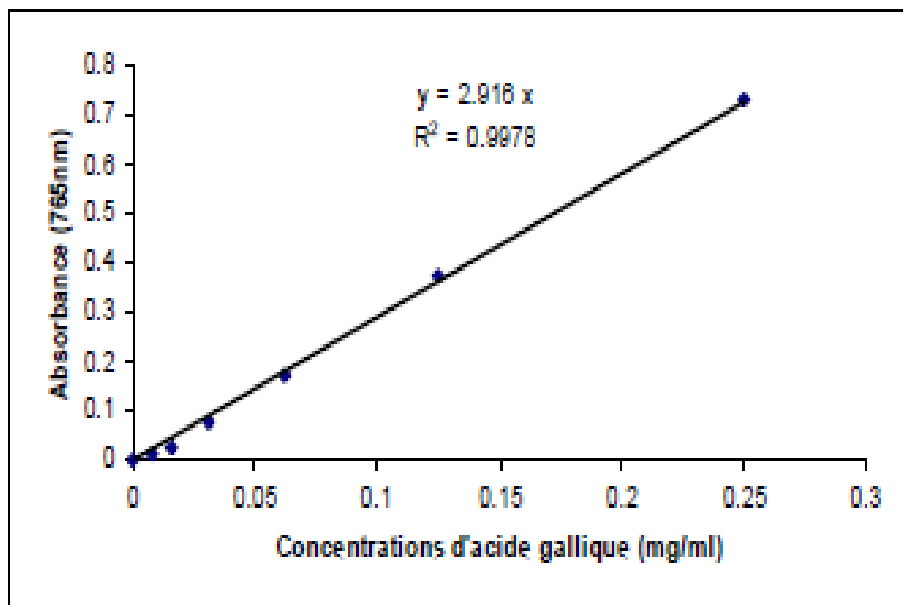


Figure 27 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

Les résultats sont indiqués dans le tableau 11.

Tableau 11: Résultats de Teneur en phénols et teneur en flavonoïdes des extraits méthanoïques des feuilles de *Tamarix articulata* et *Tamarix gallica*.

	<i>Tamarix gallica</i>	<i>Tamarix articulata</i>
Phénols totaux (mg GAE /g DW)	370.29 ± 6.31	398.42 ± 5.21
Flavonoïdes (mg CE/g DW)	175.22 ± 4.18	120.55 ± 3.41

D'après les résultats, on peut constater que tous les extraits des plante étudiées, sont riches en polyphénols mais avec des quantités différentes.

Le tableau 11 montre que l'extrait méthanoïque des feuilles du *Tamarix articulata* possède la plus haute teneur en polyphénols (398.42 ± 5.21mg EAG/g DW), suivi par l'extrait méthanoïque des feuilles du *Tamarix gallica* (370.29 ± 6.31mg EAG/g DW).

Les teneurs des polyphénols totaux déterminées ne sont pas des mesures absolues des quantités des phénols du matériel de départ. Elles sont en fait basées sur la capacité réductrice relative à une capacité réductrice équivalente à l'acide gallique (EAG). Les valeurs obtenues, par la méthode colorimétrique, fournissent des informations directes sur la quantité des groupes phénoliques antioxydants de l'extrait qui dépend essentiellement du nombre des groupes hydroxyles de ces derniers [231].

Le profil polyphénolique des extraits de plantes peut varier sous l'influence de divers facteurs parmi lesquels la variété, le climat, la localisation géographique [232], les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante [233], la température et le solvant d'extraction [234-235].

II.2. Teneurs des flavonoïdes

Les analyses quantitatives des flavonoïdes sont déterminées à partir d'une équation de la régression linéaire de courbe d'étalonnage exprimée en mg équivalent d'acide gallique et mg équivalent de catéchine par g de la matière sèche (**Figure 28**).

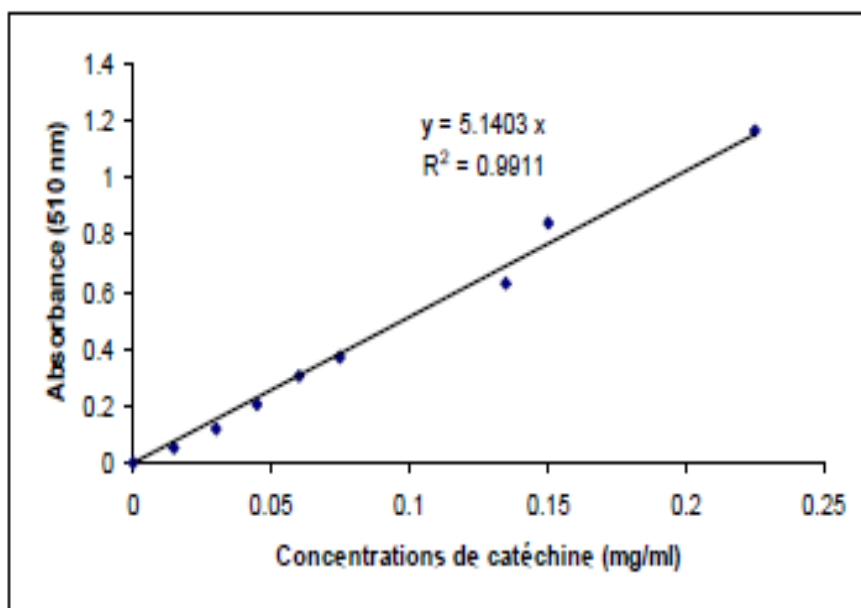


Figure 28 : Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

Les résultats des analyses quantitatives des flavonoïdes dans les extraits méthanoïques des feuilles des *Tamarix gallica* et *Tamarix articulata* sont reportés dans le tableau 11. Ces résultats nous indiquent que les extraits des feuilles de deux plantes étudiées sont très riches en flavonoïdes et que la variété *Tamarix gallica* contient la concentration la plus élevée.

II.3. Résultats des chromatogrammes d'étalons

Les figures suivantes donnent les chromatogrammes des mélanges des étalons utilisés, les analyses sont faites à deux longueurs d'ondes différentes 300 nm. L'identification et la quantification de composés phénoliques contenus dans les extraits se fait par comparaison du temps de rétention, des surfaces des étalons utilisés par rapport à ceux obtenus en analysant les extraits. Les analyses ont été répétées 3 fois.

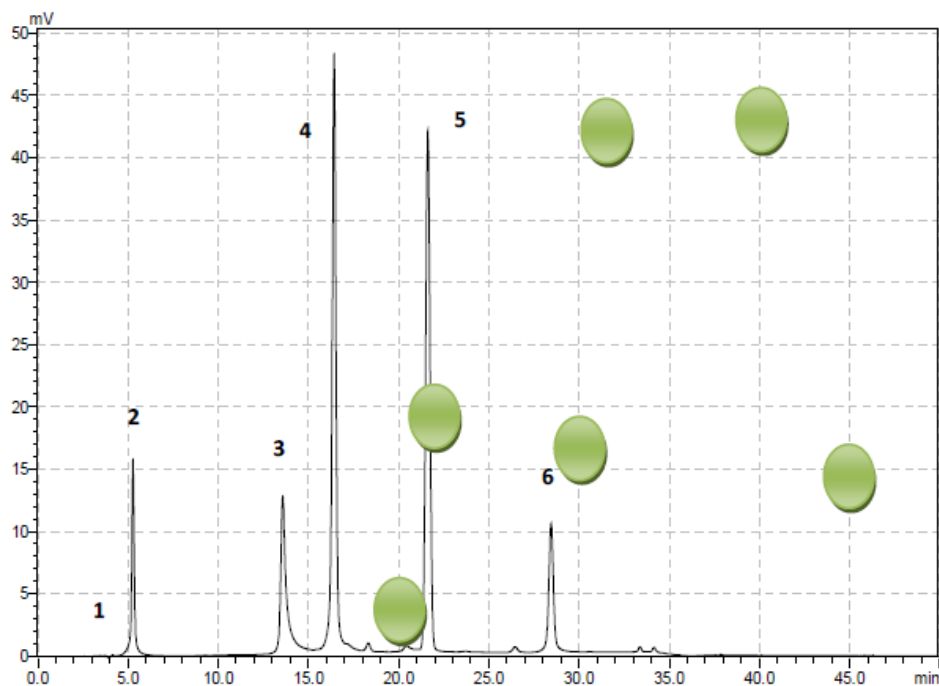


Figure 29. Profil du chromatogramme du mélange des étalons

1: Acide ascorbique; 2: Acide gallique; 3: Acide chlorengénique; 4: Acide caféique
5: vanilline; 6: Rutine

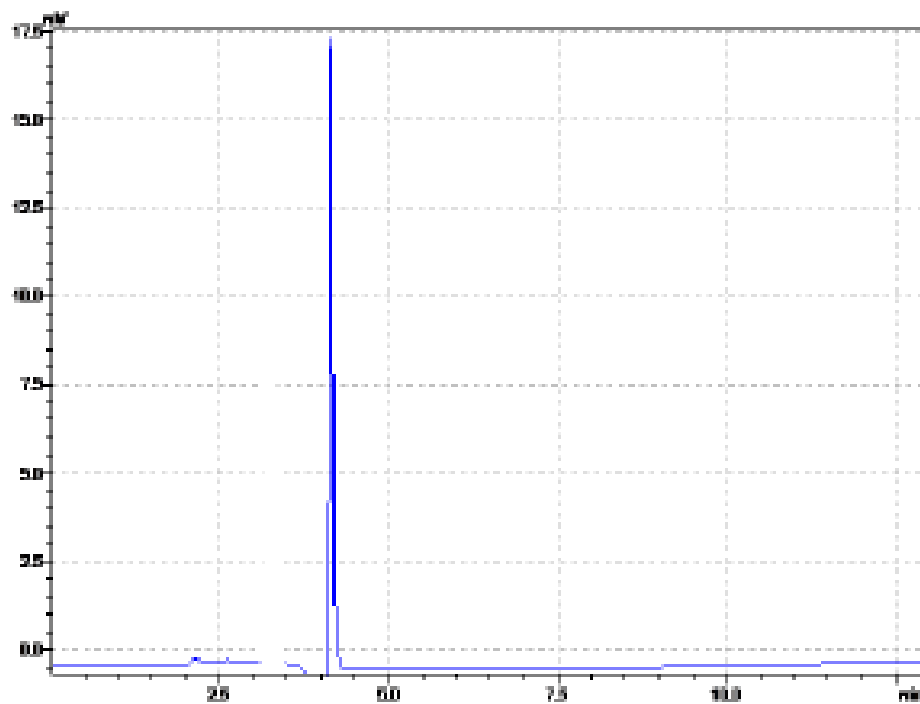


Figure 30 : Chromatogramme d'acide ascorbique (solution standards)

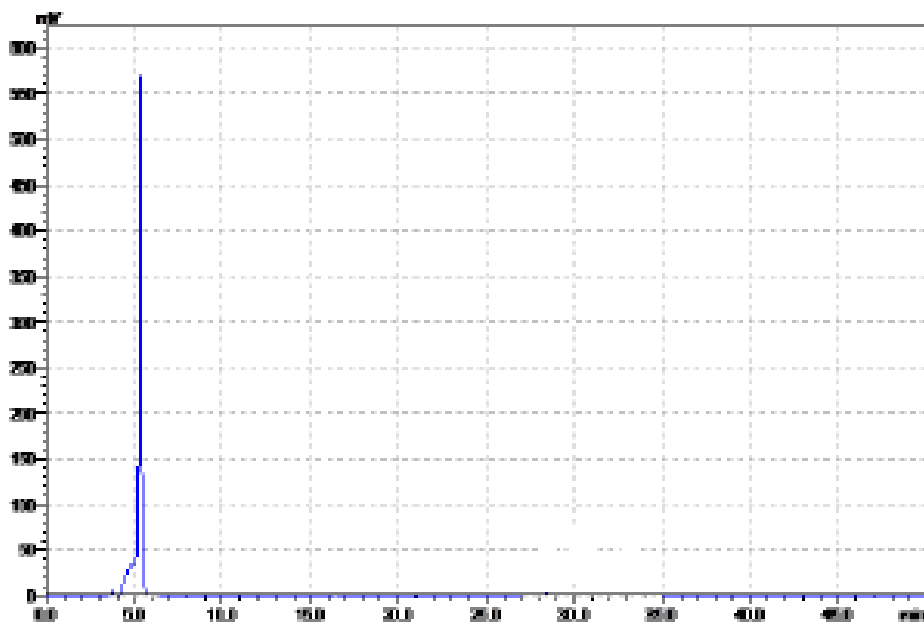


Figure 31 : Chromatogramme d'acide gallique (solution standard)

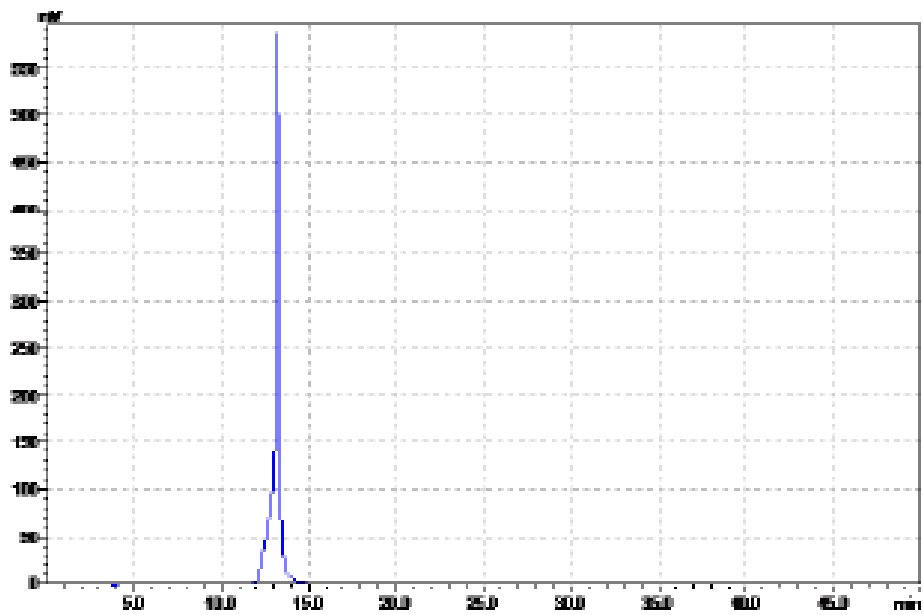


Figure 32 : Chromatogramme d'acide chlorogénique (solution standard)

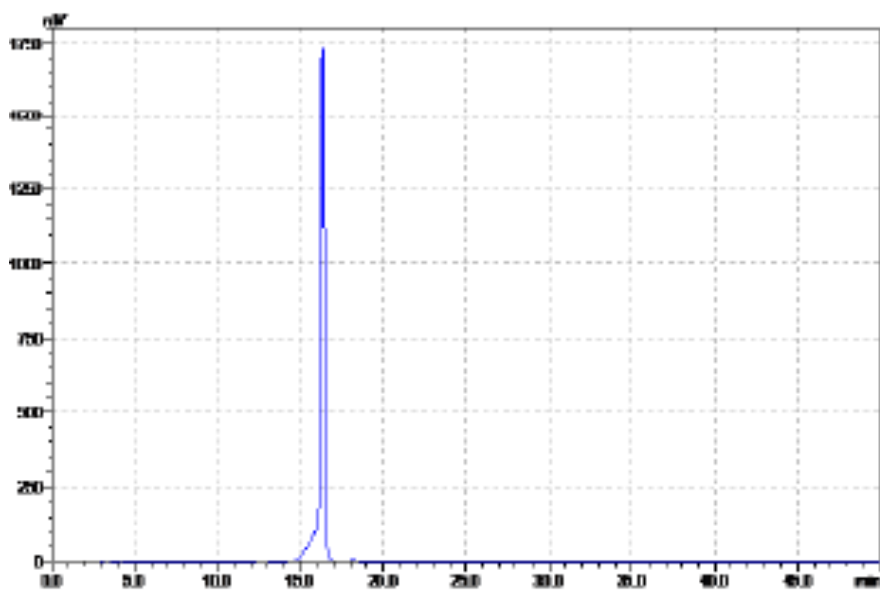


Figure 33 : Chromatogramme d'acide caféique (solution standard)

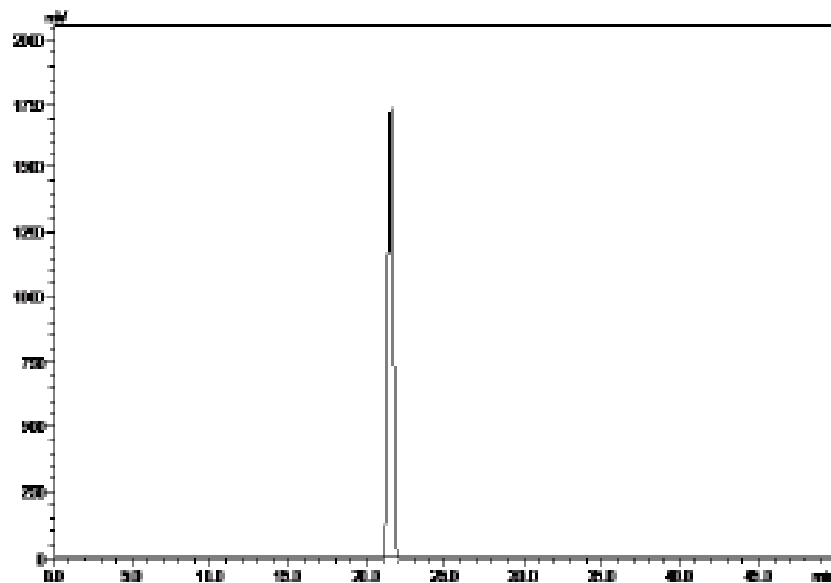


Figure 34 : Chromatogramme de vanilline (solution standard)

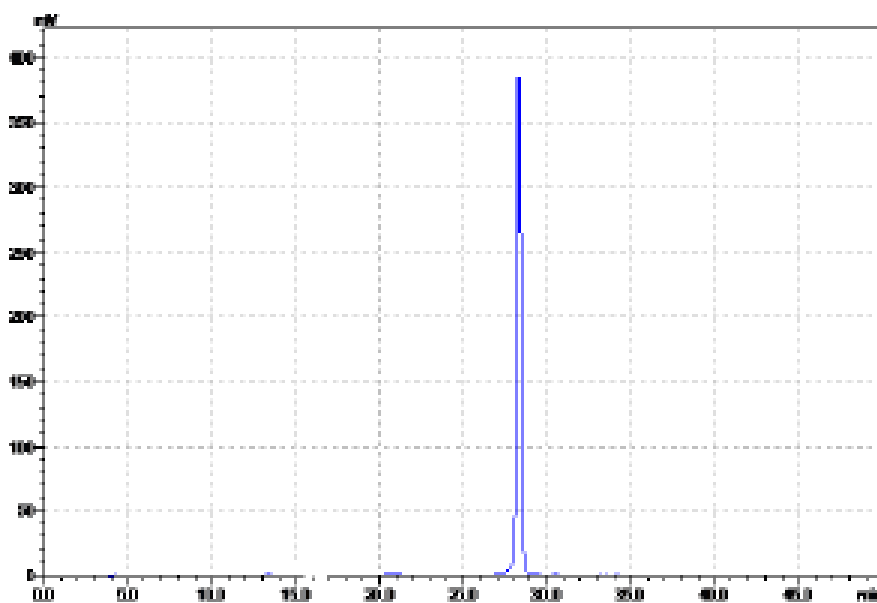


Figure 35 : Chromatogramme de la rutine (solution standard)

II.4. Résultats des courbes d'étalonnages des polyphénols standards

➤ *L'acide ascorbique*

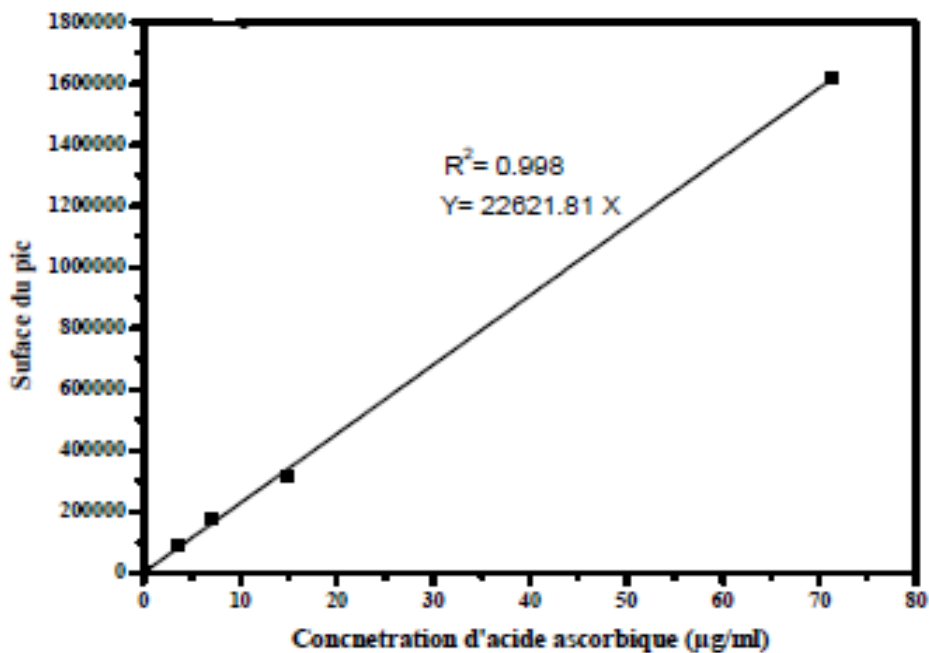


Figure 36 : Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique

➤ *L'acide gallique*

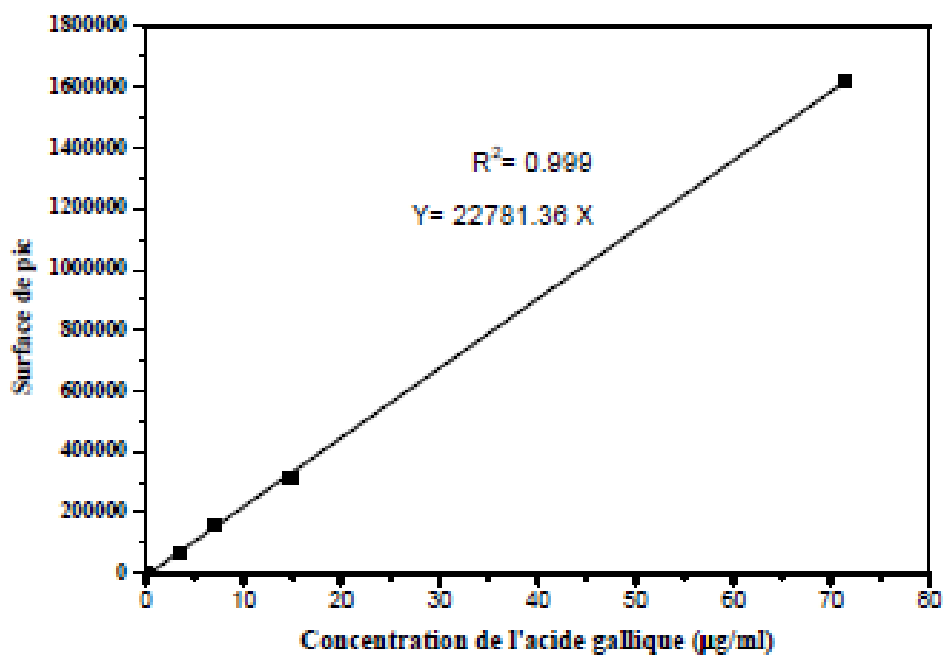


Figure 37 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique

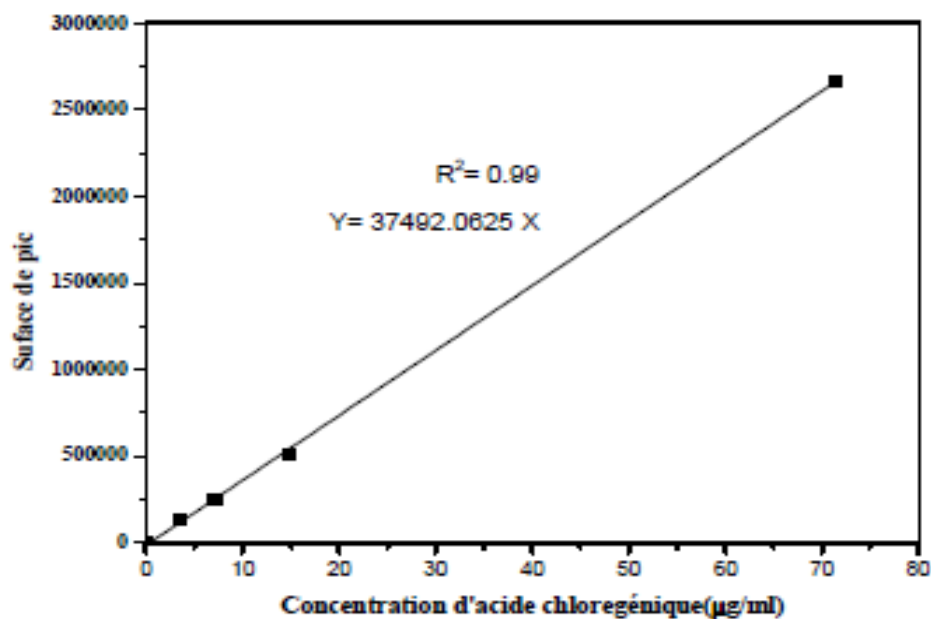
➤ *L'acide chlorengénique*

Figure 38 : Courbe d'étalonnage d'acide chlorengénique.

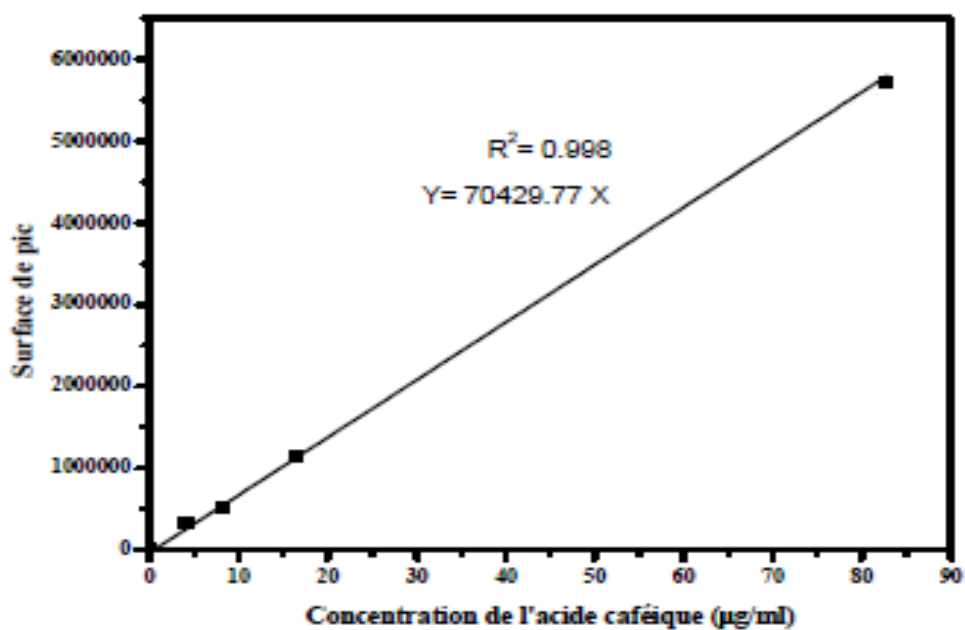
➤ *Acide caféique*

Figure 39 : Courbe d'étalonnage d'acide caféique

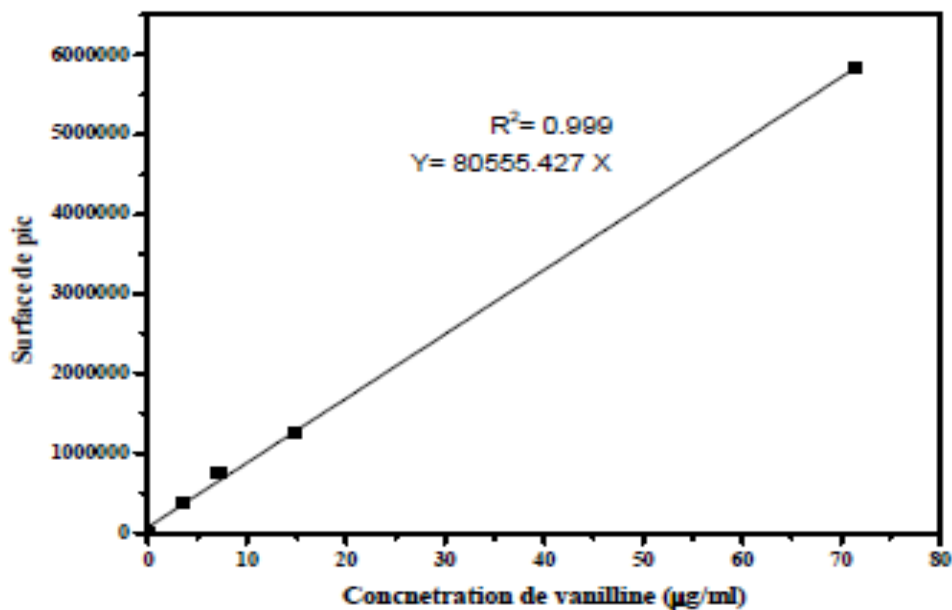
➤ *La vanilline*

Figure 40. Courbe d'étalonnage de vanilline

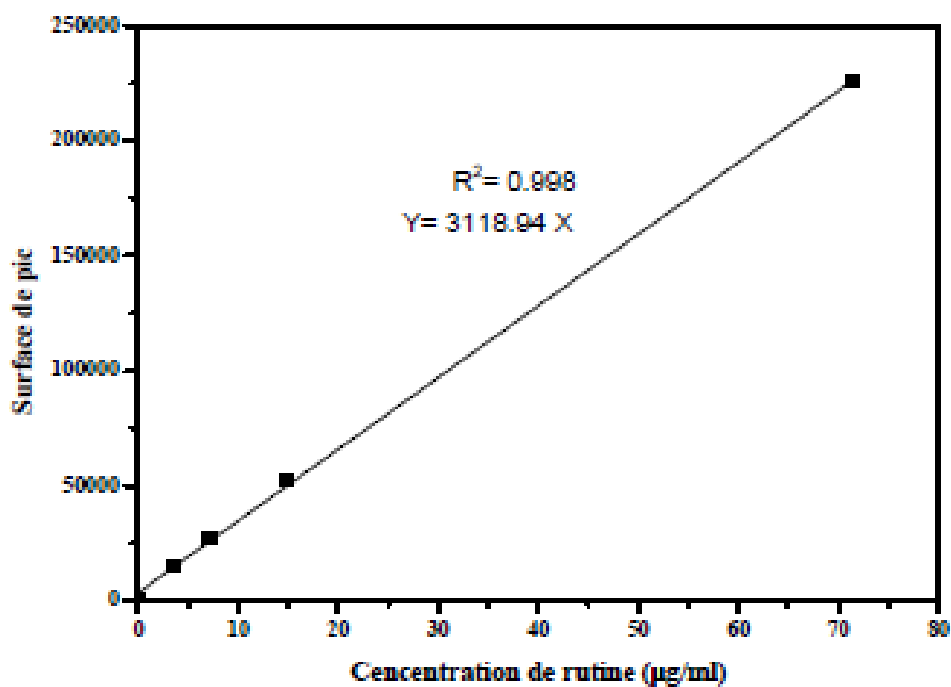
➤ *La rutine*

Figure 41. Courbe d'étalonnage de rutine

Le tableau 12, ci-dessous résume le temps de rétention, le coefficient de corrélation et l'équation des courbes d'étalonnage pour chaque composé phénolique.

Tableau 12. Le temps de rétention, le coefficient de corrélation et l'équation des courbes d'étalonnage des étalons

composés	Temps de rétention (mn)	Equation de courbe d'étalonnage	coefficient de corrélation
Acide ascorbique	4.35	$Y=22621.81 X$	$R^2=0.998$
Acide gallique	5.61	$Y= 22781.36 X$	$R^2=0.998$
Acide chloregénique	13.49	$Y=37492.06 X$	$R^2=0.999$
Acide caféique	16.54	$Y=70429.77 X$	$R^2=0.998$
Vanilline	21.46	$Y=80555.42 X$	$R^2=0.999$
Rutine	28.49	$Y=3118.94 X$	$R^2=0.998$

II. 5. Chromatogrammes HPLC des extraits méthanoïques des plantes étudiées

II. 5.1 -Chromatogrammes HPLC des extraits méthanoïques des feuilles de *Tamarix gallica* :

Le profil chromatographique d'extrait méthanoïque des feuilles de *Tamarix gallica* est représenté au niveau de la figure 43 tandis que le résultat des analyses quantitatives est présenté dans le tableau13 :

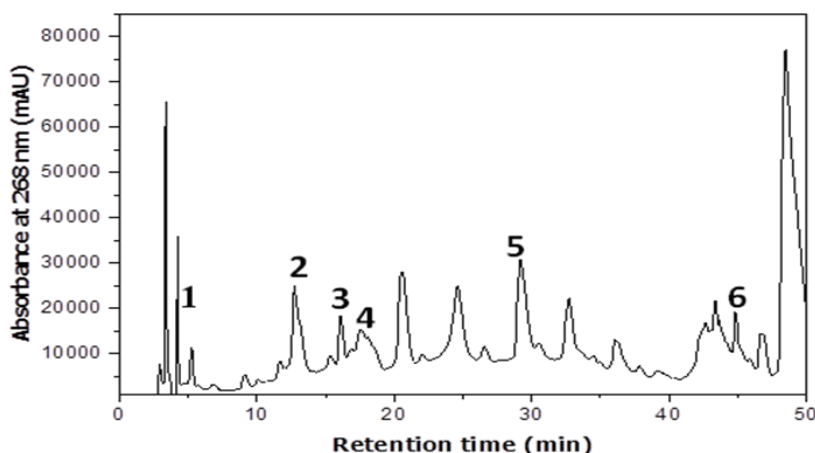


Figure 42: Le chromatogramme HPLC des extraits méthanoliques des feuilles de *Tamarix gallica* à 268 nm.

1: acide gallique; 2: Acide chlorogénique; 3: Acide vanillique; 4: acide caféïque; 5: Naringin; 6: Quercétine.

Tableau 13.Quantification des composés phénoliques individuels identifiés de l'extrait de *Tamarix gallica* à 268 nm en utilisant le système HPLC.

composés	Temps de Retention (min)	Courbe d'équation	Superficie	Superficie (%) en fraction	hauteur (uV)	Quantité (mg/g MS)
Acide Gallic	5.29	$y=54681x$	231429	1.019	10609	3.123 ± 0.01
Acide Chlorogenic acid Vanillic	13.39	$y=21665x$	108997	0.480	5856	5.531 ± 0.02
	18.53	$y=65077x$	531407	2.340	8786	9.264 ± 0.03
Acide Caffaic	17.27	$y=84066x$	525925	2.315	1883	7.596 ± 0.02
Vanillin	23.46	$y=58930x$	-	-	-	ND

acid p-Coumaric	25.81	$y=49495x$	-	-	-	ND
Rutin	28.37	$y=28144x$	-	-	-	ND
Naringin	35.78	$y=19377x$	151609	0.667	5599	8.124±0.02
Quercetin	45.05	$y=55378x$	159174	0.701	6891	3.364±0.01

L'analyse de ces résultats montre que dans l'extrait méthanoïque des feuilles de *Tamarix gallica* il y a : l'acide gallique (3.123 ± 0.01 mg / g MS), l'acide ascorbique caféique (7.596 ± 0.02 mg / g MS), l'acide chlorogénique (5.531 ± 0.02 mg / g MS), le Naringin (8.124 ± 0.02 mg / g MS) et la Quercétine (3.364 ± 0.01 mg / g MS). On remarque l'inexistence de vanilline, du p-acide coumarique et du rutin dans l'extrait méthanoïque des feuilles de *Tamarix gallica* et que l'acide vanillique est le plus représentatif. On remarque la présence de ces polyphénols avec des concentrations considérables. Notons qu'au cours de nos analyses tous les composés n'ont pas été identifiés par manque d'étalons adéquats.

II. 5.2. Chromatogrammes HPLC des extraits méthanoïques des feuilles de *Tamarix articulata* :

Le profil chromatographique d'extrait méthanoïque des feuilles de *Tamarix articulata* est représenté au niveau de la figure 43 tandis que le résultat des analyses quantitatives est donné dans le tableau 14.

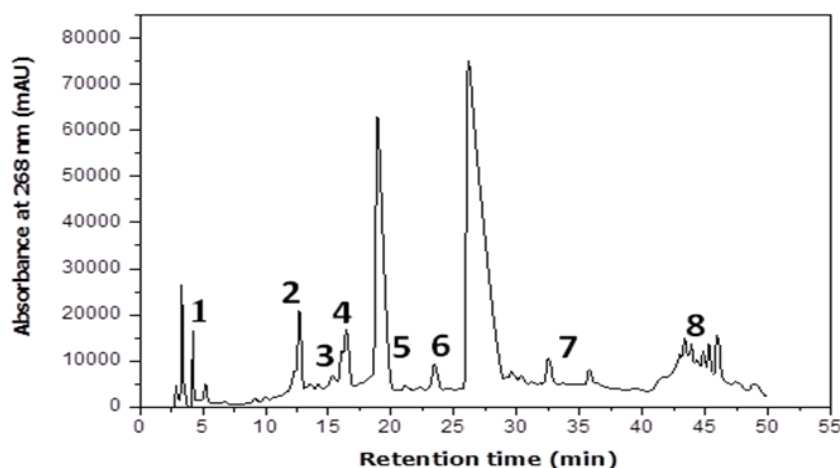


Figure 43: Chromatogramme HPLC de l'extrait méthanoïque de feuilles de *Tamarix articulata* à 268 nm.

1: acide gallique; 2: Acide chlorogénique; 3: Acide vanillique; 4: acide caféique; 5: Vanilline; 6: acide p-coumarique; 7: Naringin; 8: Quercétine.

Tableau 14. Quantification des composés phénoliques individuels identifiés de l'extrait de *Tamarix articulata* à 268 nm en utilisant le système HPLC

Composés identifiés	Temps de rétention (min)	Courbe d'équation	Superficie	Superficie (%) en fraction	Hauteur (uV)	Quantité (mg / g MS)
Acide gallique	5.29	$y=54681x$	136852	0.820	5449	2.574±0.01
L'acide chlorogénique	13.39	$y=21665x$	123706	0.741	3883	5.791±0.02
Acide vanillique	15.53	$y=65077x$	266213	1.595	5439	4.090±0.02
Acide caféique	16.27	$y=84066x$	461760	2.767	15150	5.492±0.01
Vanillin	21.46	$y=58930x$	134417	0.805	2599	2.280±0.01
p-Acide coumarique	23.81	$y=49495x$	282983	1.696	6903	5.717±0.02
Rutin	28.37	$y=28144x$	-	-	-	ND
Naringin	34.78	$y=19377$	33723	0.202	1364	1.740±0.01
Quercétine	45.05	$y=55378x$	254411	1.525	10985	5.606±0.02

Le profil chromatographique d'extrait méthanoïque des feuilles de *Tamarix articulata* est représenté au niveau de la figure 43. Les résultats des analyses quantitatives des composés phénoliques identifiés sont représentés dans le tableau 14. L'analyse de ces résultats montre que dans l'extrait méthanoïque du *Tamarix articulata* il y a quatre principaux pics qui ont été observés et élués avec des temps de rétention de 13,39, 16,27, 23,81 et 45,05 correspondant aux acides chlorogéniques, à l'acide caféique, à l'acide p-coumarique et à la quercétine. Un composé avec des temps de rétention de 28,37 n'a pas été identifié.

D'après ces résultats et du point de vue quantitatif, l'extrait méthanoïque des feuilles de *Tamarix articulata* est meilleur que l'extrait méthanoïque des feuilles de *Tamarix gallica*.

III. Résultats de dosage des activités antioxydantes *in vitro*

La mesure du potentiel antioxydant est réalisée en déterminant les produits résultant de l'oxydation ou en évaluant l'aptitude à piéger des radicaux de modèles réactionnels. En effet ces méthodes recherchent certains groupements fonctionnels (aldéhydes, cétones, dicarbonylés...) dans les dérivés des constituants d'origine. Le second relie la quantité de radicaux piégés à celle d'antioxydant utilisé.

Nous avons choisi parmi de nombreux modes d'expression de cette mesure d'utiliser le pourcentage d'inhibition (IP) et/ou l'équivalence en Vitamine C (VCE) obtenue par spectroscopie UV-Visible. Le pourcentage d'inhibition qui permet d'évaluer l'activité antioxydante d'un échantillon se calcule selon la formule suivante:

$$\% \text{ PI} = \frac{\text{Densité optique de blanc} - \text{Densité optique de l'échantillon}}{\text{Densité optique de blanc}} \times 100$$

L'évaluation de l'aptitude du composé (extrait) à piéger des radicaux libres consiste donc à mesurer sa capacité à piéger les radicaux libres et donc à ralentir ou inhiber la création de radicaux libres.

Dans le cas de l'évaluation de l'activité antioxydante en fonction de l'équivalence en acide ascorbique, la méthode consiste à comparer l'absorbance de nos échantillons à celle d'une droite d'étalonnage qui relie l'absorbance à la concentration en acide ascorbique.

Les cinq types de tests que nous avons utilisés pour évaluer l'activité antioxydante de nos extraits de plantes sont: la capacité antioxydante totale, le radical DPPH, le test FRAP, le test ABTS et le test de blanchiment du β -carotène.

III.1. Résultats de l'évaluation d'activité antioxydante totale

L'extrait méthanoïque des feuilles de *Tamarix articulata* a un pouvoir antioxydant le plus élevé avec 345.92 ± 8.45 mg AGE / g MS et l'extrait méthanoïque des feuilles de *Tamarix gallica* avec $298,64 \pm 7,72$ mg AGE / g MS (Tableau 10). Ce pouvoir antioxydant observé dans les deux extraits peut être dû essentiellement à la richesse des extraits en polyphénols particulièrement les flavonoïdes, et aussi en fonction des structures chimiques des molécules bioactives.

III.2. Résultats de l'évaluation d'activité antioxydante DPPH

La méthode du DPPH est indépendante de la polarité de substrat. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron. La forme non radicalaire DPPH-H est formée. Les graphes et le tableau 15 ci-dessous représentent la variation du pourcentage du pouvoir inhibiteur en fonction de la concentration de chaque extrait.

Tableau 15. Activité de piégeage de radical DPPH (IC₅₀ en $\mu\text{g} / \text{ml}$) et l'activité antioxydante totale (mg GAE / g DW) des extraits méthanoïques des feuilles de *Tamarix gallica* et *Tamarix articulata*.

	<i>Tamarix gallica</i>	<i>Tamarix articulata</i>
ATT (mg GAE/g MS)	298.64 ± 7.72	345.92 ± 8.45
DPPH (IC₅₀= µg/ml)	7,64 ± 0,042	5.71± 0.22

Les valeurs exprimées en (±SEM) avec trois répétitions

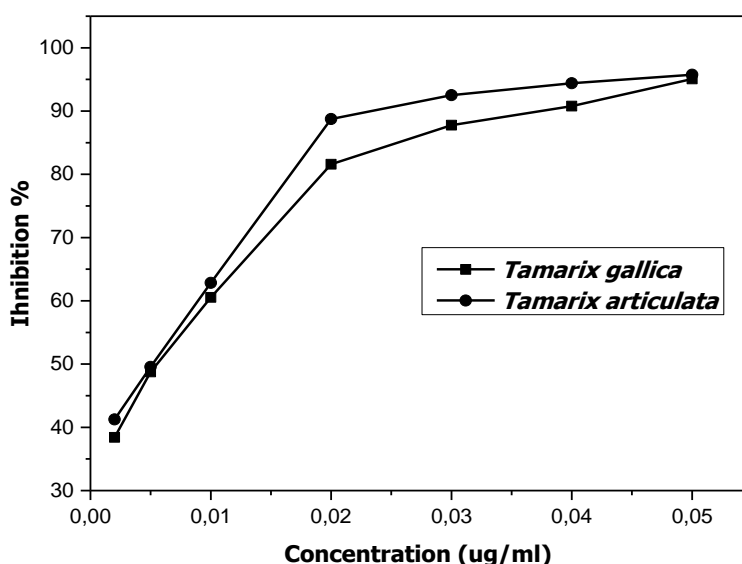


Figure 44: Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• des extraits testés
(Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD).

Nous constatons à partir des résultats obtenus dans le tableau 15 que l'extrait de feuilles méthanoïques de *Tamarix gallica* présentent les plus hauts radicaux DPPH avec CI₅₀ = 7,64 ± 0,042 µg / ml et que *Tamarix articulata* présente également le piégeage des radicaux DPPH (IC₅₀ = 5.71± 0.22 µg / ml). Les résultats ont montré que les teneurs élevées en polyphénols dans l'extrait méthanoïque avaient la capacité la plus puissante de piégeage des radicaux. De plus, les concentrations de composés phénoliques étaient plus élevées dans l'extrait, ce qui pourrait suggérer que la forte capacité antioxydante observée pourrait être attribuée principalement aux polyphénols. Cette capacité antioxydante à piéger le radical DPPH est liée à la forte teneur en polyphénols de nos extraits [236].

III.3. Pouvoir réducteur du fer (Test FRAP: Ferric Reducing Antioxydant Power)

L'activité antioxydante des extrais méthanoïques des plantes étudiées a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible. Il est universel et peut être appliqué aussi bien chez les plantes que pour les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux [237].

La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+} complexe ferricyanide à la forme ferreuse. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleue dans le milieu réactionnel à 700 nm [237]. Beaucoup de publications récentes ont indiqué qu'il y a une relation directe entre les activités antioxydantes et la puissance de réduction des composants de quelques plantes [238]. L'absorbance est mesurée à 595 nm. Pour la courbe d'étalonnage, FeSO_4 est préparé dans le méthanol 80% pour des concentrations de 0.1 à 0.7 mM et la quercétine utilisée pour la comparaison figure 45.

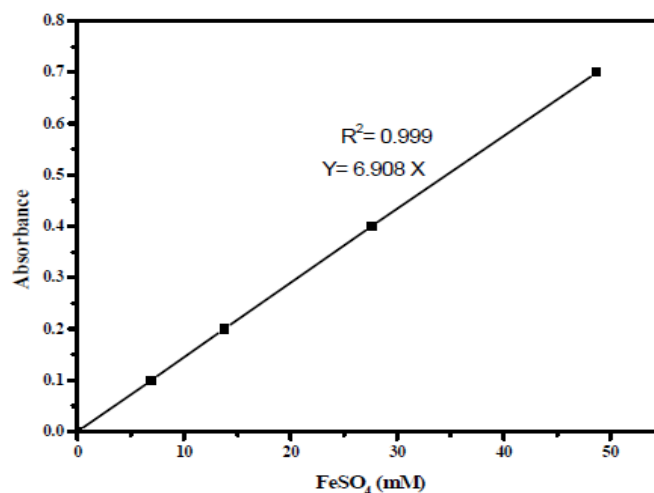


Figure 45. Courbe d'étalonnage de FeSO_4 de test FRAP

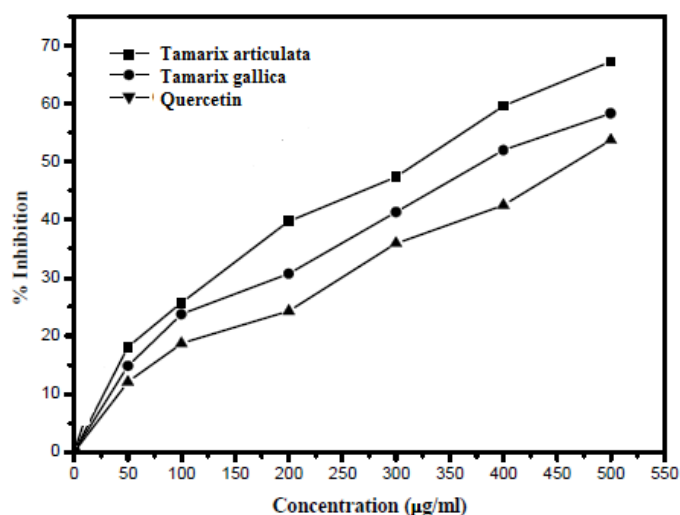


Figure 46. Activité de réduction ferrique de test FRAP des extraits des feuilles de plantes étudiées et le standards Quercétine

Les résultats sont exprimés en mg / ml de Fe (II) par l'utilisation de l'équation obtenue à partir de la courbe d'étalonnage de FeSO₄: R = 0.999, Y = 6.908 X.

L'activité antioxydante FRAP de l'extrait méthanolique de *Tamarix articulata* et *Tamarix gallica* a également montré une large gamme, l'activité la plus élevée, observée pour *Tamarix articulata* ($479.23 \pm 6.74 \mu\text{g/ml}$) est la plus faible chez *Tamarix gallica* ($462.41 \pm 7.28 \mu\text{g/ml}$). Les résultats ont été montrés dans le tableau 16. Après ce résultat, on peut considérer que les extraits des feuilles méthanoïques de *Tamarix gallica* et *Tamarix articulata* possèdent une activité de réduction ferrique très remarquable.

III.4. Résultats d'inhibition de radical ABTS

L'activité des extraits des feuilles de trois variétés sélectionnées est mesurée et comparée avec BHT vis-à-vis du piégeage du radical libre ABTS. La figure 47 montre que les deux extraits en question dans cette étude apparaissent avec une activité importante de piégeage de radical ABTS.

Tableau 16: Les activités antioxydantes des extraits méthanoïques des plantes étudiées pour le dosage FRAP et le dosage ABTS

	ABTS 50% ($\mu\text{g/ml}$)	FRAP (mg/g)
<i>Tamarix articulata</i>	385.76 ± 2.64	479.23 ± 6.74
<i>Tamarix gallica</i>	356.37 ± 4.21	462.41 ± 7.28

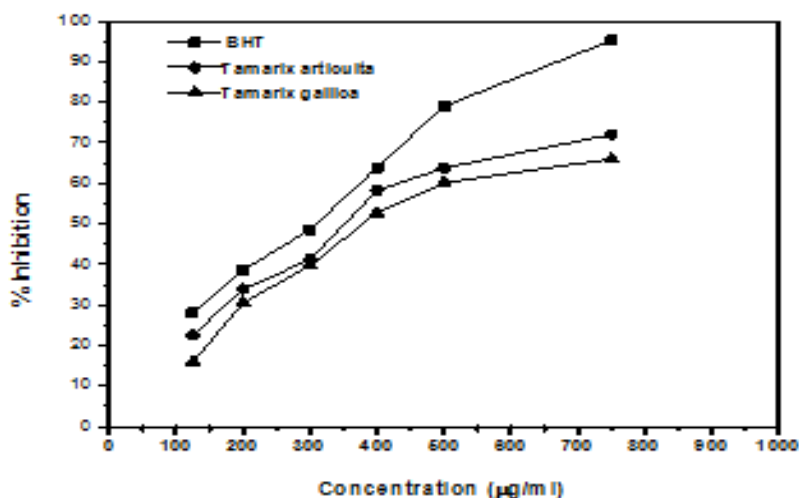


Figure 47. Effet des extraits des feuilles des variétés méthanoïques des plantes étudiées sur l'inhibition de radical ABTS

Les valeurs de IC₅₀ d'inhibition de radical de deux extraits variées entre $385.76 \pm 2.64 \mu\text{g} / \text{ml}$ et $356.37 \pm 4.21 \mu\text{g} / \text{ml}$, l'activité la plus élevée enregistrée dans l'extrait méthanoïque des feuilles de *Tamarix articulata*. On note que BHT est plus puissant que les extraits des feuilles des variétés sélectionnées. Les capacités de destruction des radicaux ABTS étaient dans l'ordre décroissant: BHT > *Tamarix articulata* > *Tamarix gallica*.

III.5. Résultats de l'évaluation d'activité antioxydante de test β -carotène

Pour le système β -carotène, le modèle des radicaux libres découle de l'oxydation de l'acide linoléique par l'attaque des molécules β -carotène hautement insaturés et provoque la diminution de l'absorbance à 470 nm.

Les résultats de l'activité inhibitrice (50%) de deux extraits ont été montrés dans le tableau 17, la valeur élevée obtenue dans *Tamarix gallica* (CI₅₀ = $48,55 \pm 1,24 \mu\text{g} / \text{mL}$) et l'inhibition la plus faible trouvée dans *Tamarix articulata* (CI₅₀ = $43.52 \pm 2.43 \mu\text{g} / \text{mL}$). L'interaction d'un puissant antioxydant avec le β -carotène dépend des extraits de concentrations. Les résultats indiquent et soutiennent que les polyphénols peuvent modérément empêcher la dégradation du β -carotène, causée par des réactions radicalaires.

Tableau 17: Activités de blanchiment du β -carotène des extraits de feuilles de *Tamarix gallica* et de *Tamarix articulata*. L'activité antioxydante était exprimée en% de valeurs IC₅₀ d'inhibition ($\mu\text{g} / \text{ml}$)

	concentration s ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Temps de réaction (min)		Activité Antioxydant IC ₅₀ = ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
		30	120	
<i>Tamarix gallica</i>	20	31.56 ± 1.20	16.35 ± 0.21	48.55 ± 1.24
	40	48.25 ± 1.57	32.35 ± 1.13	
	60	77.75 ± 2.09	64.97 ± 1.23	
<i>Tamarix articulata</i>	20	35.37 ± 0.32	19.47 ± 0.59	43.52 ± 2.43
	40	52.44 ± 1.31	41.08 ± 1.02	
	60	83.42 ± 2.02	68.54 ± 1.85	

Les valeurs exprimées en (\pm SEM) avec trois répétitions.

VI. Evaluation de l'activité antibactérienne

VI. 1. Activité antibactérienne des extraits bruts par la méthode des disques

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanoïque du *Tamarix articulata* et *Tamarix gallica* sont regroupés dans le tableau 18.

Tableau18: Diamètre de la zone d'inhibition des extraits méthanoïques des plantes étudiées en fonction de concentration (100 et 200 mg/ml).

Plants & Antibiotic	Zone d'inhibition (mm)					
	<i>S.aureus</i> , ATCC25923		<i>Micrococcus luteus</i>		<i>E. coli</i> , ATCC 35218 P	
	200 mg/ml	100 mg/ml	200 mg/ml	100 mg/ml	200 mg/ml	100 mg/ml
Tamarix articulata	12.5	9.5	11	9.00	13	9.5
Tamarix gallica	11	8.5	10.5	9.00	11	8.0
Gentamycin	15	12	17	16	17.5	17

Les résultats de l'évaluation d'activité antimicrobienne des extraits des feuilles des plantes étudiées sont repris ci-dessus (Tableaux 18). Dans ce tableau sont incluses les valeurs des zones ou diamètres d'inhibitions en (mm), représentant la grandeur du halo formé par les microorganismes détruits par l'activité antimicrobienne des extraits et de l'antibiotique. Pour l'ensemble des extraits, nous remarquons que l'extrait des feuilles de *Tamarix articulata* présente l'activité antibactérienne la plus élevée vis-à-vis de la souche *E. coli*, ATCC 35218 P à la concentration en extrait de 200 mg/ml avec de diamètre d'inhibition de 13mm et 9,5 mm à la concentration de 100 mg/ml, ce qui est en bonne corrélation positive avec leurs teneurs en phénols totaux. L'extrait de la même espèce était un pouvoir de croissance aux autres souches *Micrococcus luteus* et *S.aureus*, ATCC25923 avec des diamètres de zone d'inhibition de 11 et 12,5 mm à la concentration en extrait de 200 mg/ml et 9 et 9,5 mm à la concentration de 100 mg/ml respectivement(Schéma 08).Donc, on a noté que le pouvoir inhibiteur des extraits actifs a sensiblement diminué à la concentration de 100 mg/ml (1 mg/disque), ce qui signifie que l'activité antibactérienne des plantes étudiées est proportionnelle à la concentration en substances bioactives présentes dans les extraits. Il est clair que l'activité antibactérienne de nos extraits reste inférieure à celle de l'antibiotique de

référence: Gentamycin. Cependant, ces extraits exercent une activité antibactérienne dans la mesure où ils ne sont pas des produits purs mais des extraits bruts [239-240].



Schéma 08: l'effet antibactérien des extraits méthanoïques sur : (S) *S. aureus*;
(M) *Micrococcus luteus* et (E) *E. coli*
1 : *Tamarix gallica*, 2 : *Tamarix articulata*

VI.2. Détermination de la CMI et la CMB

Après la mise en évidence de l'activité antibactérienne de nos extraits bruts par la méthode des disques, nous avons essayé de déterminer les concentrations minimales inhibitrices CMI relatives aux extraits les plus actifs sur les bactéries à Gram (+). Par la suite, après avoir révélé les CMI, nous avons procédé à la détermination des concentrations minimales bactéricides CMB. Les résultats donnant les valeurs de CMI et CMB en mg/ml de chaque extrait, sont consignés dans le tableau 19 ci-dessus.

Tableau 19: Valeurs des concentrations minimales inhibitrices et concentrations minimales

Plantes	S.aureus, ATCC25923		Micrococcus luteus		E. coli, ATCC 35218 P	
	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)
Tamarix articulata	2	15.5	2	15	2	16.5
Tamarix gallica	2	15.1	2	15	2	15

Au vu des résultats du tableau 19, il est clair que les deux plantes ont montré de différentes valeurs CMB: 15.5, 15, 16.5 pour la plante *Tamarix articulata* et 15.1, 15, 15 pour la plante *Tamarix gallica* par contre pour CMI la même valeur de l'ordre de 2 mg/ml pour les trois souches testées. Un tel résultat nous donne à penser que cette plante pourrait constituer une source potentielle de substances à activité antibactérienne importante.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail a pour but de caractériser la composition phytochimique des extraits méthanoliques des feuilles de deux variétés d'espèce *Tamarix articulata* et *Tamarix gallica* et d'évaluer *in vitro* l'activité antioxydante et biologique des ces extraits en question. L'utilisation des plantes qui contiennent des composés bio-actifs est en progression constante. En effet, compte tenu de leur meilleure biocompatibilité on observe une croissance des produits d'origine naturelle.

Vu que l'étude bibliographique réalisée sur ces espèces a montré que l'on ne disposait que de peu d'informations de nature chimique et/ou biologique, et pour pallier à ce manque d'informations, notre étude s'est focalisée sur les analyses qualitatives et quantitatives de ces extraits. Les évaluations de la capacité antioxydant et les propriétés biologiques des extraits méthanoïques des feuilles des plantes étudiées ont montrés que:

- Les composés phénoliques existent en concentration considérable et que la *Tamarix articulata* est plus riche par rapport aux *Tamarix gallica*.
- L'activité antioxydante des extraits méthanoliques des feuilles *Tamarix articulata* et *Tamarix gallica* a été évaluée et comparée en utilisant les méthodes suivantes :

la méthode de détermination de l'oxydation du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), l'activité antioxydante totale, le pouvoir antioxydant du fer (FRAP), oxydation de radical hydroxyle ABTS test (2,20-azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate]) et β -carotène. On a pu calculer la concentration inhibitrice à 50%, et ainsi on a pu conclure que l'activité antioxydante des extraits des feuilles *Tamarix articulata* est plus forte que celle de *Tamarix gallica*. On a remarqué que l'activité antioxydante des deux variétés dépendait de leur concentration. Dans l'étude comparative, nous avons trouvé que l'activité antioxydante des extraits des *Tamarix articulata* et *Tamarix gallica* est plus puissante que celle des polyphénols standards synthétiques (BHT, BHA), et celle des polyphénols naturels (Querecetin, Acide ascorbique). De plus, avec une technique HPLC analytique puissante, l'identification et la quantification de 6 et 8 composés phénoliques ont été réalisées successivement pour *Tamarix Gallica* et *Tamarix articulata*.

L'activité antibactérienne des extraits méthanoïques des feuilles de deux variétés d'espèce *Tamarix articulata* et *Tamarix gallica* est évaluée par la méthode des disques contre les trois souches bactériennes suivantes:

Micrococcus luteus, *S.aureus* et *Escherichia coli*. Par la suite, les CMI et CMB ont été déterminées, par la méthode de dilution,

Les résultats donnent la valeur CMI la plus faible par rapport à toutes les souches qui sont de l'ordre de 2 mg/ml. L'extrait méthanoïque des feuilles *Tamarix articulata* a enregistré la plus forte inhibition pour ce qui est de la souche *Escherichia coli* avec un diamètre d'inhibition de 13 mm inférieure à celui de l'antibiotique standard la Gentamycin.

Les résultats obtenus sont très encourageants et prometteurs tant sur le plan d'activité antiradicalaire que sur le plan d'activité antibactérienne, notamment pour les extraits des deux plantes étudiées.

Cette étude valide scientifiquement l'usage traditionnel de ces plantes et révèle leur intérêt dans le cadre d'une exploitation en biotechnologie. Pour la suite, il serait intéressant d'isoler et de caractériser les composés phénoliques des extraits de deux variétés sélectionnés (et d'autres). Aussi, serait très souhaitable, pour une meilleure compréhension du mode d'action des dérivés polyphénoliques, d'évaluer *in vivo* l'activité anti-inflammatoires, antidiabétique et antimutagène de chacun de ces composés pris séparément.

Ce qui permettrait alors de mettre en évidence le principe actif des extraits des feuilles et/ou une éventuelle synergie entre les différents composés phénoliques, ce qui fera l'objet d'une autre étude.

***Références
bibliographiques***

Références bibliographiques

- [1] Boubaker J, Sghaier MB, Skandrani I, Ghédira K, Chekir-Ghedira L .(2012). Complementary and Alternative Medicine. *BMC*, 125- 135.
- [2] Newmann D. and Cragg GM.(2007). *Journal of Natural Products*; 70: 461-477.
- [3] Oyedemi S O, Afolayan A J.(2011). *Asian Pacific journal of tropical Medicine*; 4: 952-958.
- [4] Biyiti LF, Meko'o DJL, Tamzc V, Amvam Zollo.(2004). *Pharmaceutical Mediterranean traditional african*; 13: 11-20.
- [5] Morel S. Thèse de doctorat (2011) : Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae). Université d'Angers, N° 1031.
- [6] Verpoorte R, Cotin A, , Memelink J.(2002). *Phytochemistry Reviews*; 1 (1):13-25
- [7] Kilani-Jaziri S, Bhourri W, Skandrani I, Limem I, Chekir-Ghedira L, Ghedira K. *South.(2011). African Journal of Botany ; 77:767-776.*
- [8] Yangthong M, Hutadilok-Towatana N, Phromkunthong W.(2009). *Plant Foods Human Nutrition*; 64:218–223.
- [9] Oyedemi S O, Afolayan A J.(2011). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicin*,4: 952-958.
- [10] Karmakar I, Dolai N, Saha P, Sarkar N, Bala A , Kanti P.(2011). *Orient Pharmacology Experimental medicine*; 11:221–228
- [11] N. Balasundram, K. Sundram, S. Sammar. (2006). *Food Chem*, 1 191–203.
- [12] Mogode Debete Judith (2004), Thèse de pharmacie, Bamako, 67 pages
- [13] B. Halliwell .(1993). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicin* 23 (Suppl 1),118-126.
- [14] C. Ichai, H. Quintard, J.C. Orban .(2011). Springer-Verlag, France, p.427- 429
- [15] G.P. Novelli .(1997). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicin* 48(4):517-527.
- [16] A. Favier .(2003)..*Lavoisier TEC & DOC éditions Médicales Internationales*, 108-115
- [17] M. Gardès-Albert, Z. Abedinzadeh, D. Jore. (2003). *L'actualité chimique*, 269-270.
- [18] P.Bertrand (2008) Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse *Vicia faba*, p.17
- [19] J. Médart .(2009). 2 eme édition, Editions De Boeck Université, Bruxelles, p.2-51
- [20] B. A. Freeman, J. J. O'Neil .(1984). *Neurosci Res*, 56:51-60.
- [21] J.S. Bus, J.E. Gibson .(1984). *Environ Health Perspect*, 55:37-46.
- [22] R. H. Burdon, V. Gill, C. Rice-Evans. (1990). *Free Radic Res Commun*. 11(1-3):65-76.

- [23] R. P. Mason, P. M. Hanna, M. J. Burkitt, M. B. Kadiiska .(1994). *Environ Health Perspect*, 102 (Suppl 10):33-36.
- [24] T.Fukushima, T. Tawara, A. Isobe, N. Hojo, K. Shiwaku, Y. Yamane (1995),. *J Neurosci Res* ,42:385-390.
- [25] J.F. Toussaint, M. P. Jacob, L. Lagrost, J. Chapman .(2003). Paris, p. 269-290
- [26] L. Mabile, O.Meilhac, I. Escargueil-Blanc, M. Troly, M.T. Pieraggi, R. Salvayre, A. Thromb. (1997). *Vasc. Biol*, 17, 1575-1582.
- [27] Favier, A. (2003). *L'actualité Chimique*, 108 – 115.
- [28] Delattre, J., Beaudeau, J. L., & Bonnefont-Rousselot. (2005). Edition *Lavoisier TEC & DOC éditions Médicales Internationales, Paris*, p 14, 93,94.
- [29] Jacques, R. (2010). Edition *Springer- Verlag France, Paris*, p, 195.
- [30] Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J. et Telser, J. (2004). p 15, 92.
- [31] Evans, P. et Halliwell, B.(1999). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 884: 19-40.
- [32] Morena, M., Martin-mateo, M., Cristol, J. P. & Canoud, B. (2002). *Nephrology*, 23 (5), 201 – 208.
- [33] U. Solzbach, B. Hornig, M. Jeserich, H. Just .(1997). *Circulation*, 96(5):1513-1519.
- [34] E. A. Ostrakhovitch, I. B. Afanas'ev .(2001). *Biochem.Pharmacol*, 62 (6):743-746.
- [35] J. Miquel.(2002). *Ann N Y Acad Sci*, 959: 508-516.
- [36] A. A. Boldyrev .(2005). *Ann.N.Y.Acad.Sci*,1057: 193-205.
- [37] B. Halliwell, J. M. Gutteridge .(1995). *Free Radic Biol Med*, 18(1):125-126.
- [38] J. M. Gutteridge, B. Halliwell .(2000). *Ann N Y Acad Sci*, 899:136-147.
- [39] W.J. Bauer,R. Badoud,J. Löliger,A. Etournaud .(2010). Presses polytechniques et universitaires romandes, *Lausanne*, p.212
- [40] B.Poaty-Poaty .(2004). Modification chimique d'antioxydants pour les rendre lipophiles: application aux tannins, Thèse de Doctorat, Université de Nancy I, p.4,135
- [41] I. Tedesco, M. Russo, P.Russo, G. Iacomino, G. L. Russo, A.Carraturo, C.Faroulo, L. Moio, R. Palumbo.(2000). *J.Nutr.Biochem*. 11(2):114-119
- [42] K. A. Youdim, B. Shukitt-Hale, S. Mackinnon, W. Kalt, and J. A. Joseph.(2000). *Biochem et Biophys. Acta*, 1523(1):117-122
- [43] M. Sandoval, N. N. Okuhama, X. J. Zhang, L. A. Condezo, J. Lao, F. M. Angeles, R.A. Musah, P. Brobowski, M.J. Miller .(2002). *Phytomedicine* 9(4):325-337.
- [44] S. Benedetti, F. Benvenuti, S. Pagliarani, S. Francogli, S. Scoglio, F. Canestrari .(2004). *Life Sci*, 75:2353-2362.

- [45] S. Kitagawa, H. Sakamoto, H. Tano .(2004). *Chem.Pharm.Bull.*(Tokyo), 52(8):999-1001.
- [46] N.Balasundram, N. S. Agar, K. Sundram, S. Samman .(2004). *Asia Pac.J.Clin.Nutr.* 13:S75.
- [47] Grabmann, J., S. Hippeli, R. Spitzenberger, and E. F. Elstner .(2005). *Phytomedecine*, 12(6-7):416-423.
- [48] A. N. Colado Simao, A. A. Suzukawa, M. F. Casado, R. D. Oliveira, F. A. Guarnier, R. Cecchini .(2006). *Life Sci*, 78 (11):1202-1210.
- [49] Menvielle-Bourg, F. J. (2005). *Phytothérapie*, 118 – 121.
- [50] Cano, N., Barnoud, D., Schneidre, S., Vasson, M. P., Hasselmann, M., & Leverve, X. (2007). 3^{ème} édition. Edition *springer- Verlag*, p 254.
- [51] Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). *Revue Médicale de Liège*, 62, 628 – 638.
- [52] Goudable, J., & Favier, A. (1997). *Nutr Clin Mdtabol*, 11, 115 – 120.
- [53] Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A. (2007). *Revue du Rhumatisme*, 74, 636 – 643.
- [54] Niki, L., Reynaert, S. W., Aesif, T. M., Amy, B., Emiel, F. M., Wouters, C. G., Irvin, Yvonne, M. W., & Janssen-Heininger.(2007). *The journal of Immunology*, 178, 3814 – 3821.
- [55] Lindau-Sehpard, B., & Shaffer, J. (1993). *Free Rad Boil Med*, 8, 15 – 581.
- [56] Cantin, P. A. (1999). *Moss j. New York: Dekker*, 519 – 531.
- [57] Matés, J. M., Perez-Gomez, C., & Castro, N. I. (1999). *Clin Biochem*, 32, 595 – 603.
- [58] Lacolley, P., Babuty, D., Boulanger, C., Ghaleh, B., Loirand, G., Pinet, F., & Samuel, J.L. (2007). Edition *John Libbey Eurotext, Paris*, p 312, 316, 317.
- [59] Hagen, T. M., Wierzbicka, G. T., Sillau, A. H., Bowman, B. B., & Jones, D. P. (1990). *Am j Physiol*, 259, 524 – 590.
- [60] Lacolley, P., Babuty, D., Boulanger, C., Ghaleh, B., Loirand, G., Pinet, F., & Samuel, J.L. (2007). Edition *John Libbey Eurotext, Paris*, p 312 , 316 , 317.
- [61] Fisher, A. B., Dodia, C., Manevich, Y., Chen, J. W., & Feinstein, S. I. (1999). *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 21329 – 21334.
- [62] Beaudeau, J. L., & Geneviève, D. (2011). 2^{ème} édition. Edition *Lavoisier Chantal Arpino*, p 130, 131.
- [63] Stamler, J. S., & Slivka, A. (1996). *Nutrition Reviews*, 54 (1), 1 – 30.
- [64] Ravi, K., Ramachandran, B., & Subramanian, S. (2004). *Life Sciences*, 75, 2717 – 2731.
- [65] Gérard-Monnier, D., & Chaudière, J. (1996). *Path Biol*, 44, 77 – 85.

- [66] Lacolley, P., Babuty, D., Boulanger, C., Ghaleh, B., Loirand, G., Pinet, F., & Samuel, J.L. (2007). Edition *John Libbey Eurotext, Paris*, p 312 , 316 , 317.
- [67] Algeciras-Schimmich, A., Cook, W. J., Milz, T. C., Saenger, A. K., & Karon, B. S. (2007). *Clinical Biochemistry*, 40, 1311 – 1316.
- [68] Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2007). Fourth Edition *New York, Oxford University Press*, p 851.
- [69] Davide, G. W. (2015). Second edition. *Edition Mcfarland & Company, Inc, Publishers Jefferson, North Carolina*, p 166.
- [70] Packer, L., Kraemer, K., & Rimbach, G. (2001). *Nutrition*, 17 (10), 888 – 895.
- [71] Pasquier, C. (1995). *Revue Française des Laboratoires*, 276, 87 – 92.
- [72] Médart, J. (2009). 2^{ème} édition. *Edition de Boeck Université*, p 51, 52.
- [73] Stargrove, M. B., Treasure, J., & Mckee, D. L. (2008). Edition *Mosby Elsevier*, p 733.
- [74] Roberfroid, M. B., Coxam, V., & Delzenne, N. M. (2008). 2^{ème} édition. *Edition Lavoisier TEC & DOC*, p 209, 215
- [75] Canavy, B., Didier, J. C., & Jacquélet, F. (2014). Edition *Lulu Press*, p 116.
- [76] Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). *Nutrition Clinique & Métabolisme*, 20, 165 – 177.
- [77] Cuvelier, C., Dotreppe, O., & Istasse, L. (2003). *Ann.Méd .Véte*, 147, 315 – 324.
- [78] Schin, I. N., Yoshinori, N., & Kazou, M. (1998). *Chemical Physics Letters*, 287, 70 –74.
- [79] Evans, W. J. (2000). *Am J Clin Nutr*, 72, 647S– 652S.
- [81] Ohla, S. E., Opere, C. A., & Leday, A. M. (2005). *Mutation Research*, 579, 22 – 36.
- [82] Chandan, K., Sens, M. A., & Osmo, H. (1994). *Journal of Applied Physiology*, 77 (5), 2177 – 2187.
- [83] Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie: Edition Lavoisier Tec & Doc. Médicales Internationales, Paris*, p 261, 308, 571.
- [83] Harborne, J. B. (1967). *Phytochemistry*, 6 (11), 1569 – 1573.
- [84] Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). *Pharmacological reviews*, 52 (4), 673 – 751.
- [85] Nitsch, J.P., Nitsch, C. (1961). *Bull. Soc. Fr*, 26: 2237-2240.
- [86] Alibert, G., Ranjeva, R., Boudet, M.A. (1977). *Physiol. Veg*, 15 : 279-301.
- [87] Heimeur, N., Idrissi Hassani, L.M., Amine Serghini, M. (2004). *Reviews in Biology and Biotechnology*, 3 (1): 37-42.
- [88] Dubois, G.E., Grosbay, G.A., Saffron, P. (1977). *Science*, 195: 397-399.

- [89] HOFFMANN, L. (2003). Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Thèse de Doctorat : Université de LOUIS PASTEUR-STRASBOURG I.
- [90] Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2006). *Edt Blackwell Publishing Ltd* p 90.
- [91] AKROUM S. (2010). Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de Doctorat : Université MENTOURI de CONSTANTINE-ALGERIE.
- [92] Hoffmann, D. (2003). *Edition Inner Traditions / Bear & Co.*, p 90.
- [93] Pincemail, J., Degrune, F., Voussure, S., Malherbe, C., Paquot, N. & Defraigne, J.-O. (2007). *Nutrition clinique et métabolisme* 21, 66–75.
- [94] Macheix, J.-J., Fleuriet, F. & Jay-Allemand, C. (2005). *PPUR presses polytechniques*, p 134.
- [95] CHANFORAN, C. (2010). Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. Thèse de Doctorat : Université D'AVIGNON et des PAYS de VAUCLUSE.
- [96] De La Rosa, L. A., Alvarez-Parrilla, E. & Gonzalez-Aguilar, G. A. (2009). *Edition John Wiley and Sons*, p 73.
- [97] Crozier, A., Clifford, M. N. & Ashihara, H. (2008). *Edition John Wiley and Sons*, p 321.
- [98] BELKHEIRI, N. (2010). Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes. Thèse de Doctorat : Université de TOULOUSE.
- [99] JEAN-DENIS, J. B. (2005). Caractérisation de polyphénols stilbéniques et de dérivés induits ou constitutifs de la vigne impliqués dans sa défense contre l'agent pathogène du mildiou de la vigne, *Plasmopara viticola* (Berk. and Curt.). Thèse de Doctorat : Université de NEUCHÂTEL.
- [100] Sun, B., Ribes, A. M., Leandro, M. C., Belchior, A. P. & Spranger, M. I. (2006). Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Analytica Chimica Acta*, 382–390.
- [101] DEMELIN, E. (2012). Le raisin et ses applications thérapeutiques. Thèse de Doctorat : Université de LIMOGES.

- [102] Hopkins, W. G. (2003). *De Boeck Supérieur*, p 280.
- [103] Peterson, J., Dwyer, J., Adlercreutz, H., Scalbert, A., Jacques, P. & McCullough, M. L. (2010). *Nutr. Rev.* 68(10), 571–603.
- [104] Sainvitu, P., Nott, K., Richard, G., Blecker, C., Jérôme, C., Wathélet, J.-P., Paquot, M. & Deleu, M. (2012). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 16(1), 115-124.
- [105] MUANDA, F. N. (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de Doctorat : Université PAUL VERLAINE-METZ.
- [106] Descheemaeker, K. (2003). *Edition Garant*, page 12, 46.
- [107] Lacy, A. & O’Kennedy, R. (2004). *Current Pharmaceutical Design* 10, 3797-3811.
- [108] Ghedira, K. (2005). *Phytotherapie* 3(4), 162-169.
- [109] Tapas, A. R., Sakarkar, D. M. & Kakde, R. B. (2008). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7 (3), 1089-1099.
- [110] D’Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R. Giovannini, C. & Masella, R. (2007). *Ann. Ist. Super Sanità* 43(4) 348-361.
- [111] Sadasivam, S. & Thayumanavan, B. (2003). Molecular host plant resistance to pests. Volume 96 de Books in soils, plants and the environment. *CRC Press*, p221.
- [112] Fraga, C. G. (2009). *John Wiley & Sons Edition*, pp 5-13.
- [113] Portet, B. (2007). Recherche bioguidée de molécules antipaludiques d’une plante guyanaise *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. Thèse de Doctorat : Université de TOULOUSE.
- [114]Tomas-Barberan, F. A., Ferreres, F. & Gil, M. L. (2000).Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 23, p747.
- [115] Del Rio, D., Stalmach, A., Calani, L. & Crozier, A. (2010). *Nutrients* 2, 820-833.
- [116] BOUHEROUM, M. (2007). Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Rhantherium adpressum* et *Ononis angustissima*. Thèse de Doctorat : Université MENTOURI de CONSTANTINE-ALGERIE.
- [117] Kerio, L. C., Wachira, F. N., Wanyoko, J. K. & Rotich, M. K. (2012). *Food Chemistry* 131, 31–38.
- [118] Shipp, J. & Abdel-Aal, El-S. M. (2010). *The Open Food Science Journal* 4, 7-22.
- [119] Vierling, E. (2008). *Wolters Kluwer France Edition*, p 153.]
- [120] Havsteen, B.H. (2002). *Pharmacol. Therapeut*, 96: 67– 202
- [121]Hopkins, W. G. (2003). Physiologie végétale. 2ème édition. Edition *de Boeck Université*, p 268, 280.

- [122]Gazengel, J. M., & Orecchioni, A. M. (2013). 2^{ème} édition. Edition *Lavoisier TEC & DOC, Paris*, p 1174.
- [123] Alkurd, A., Hamed, T. R., & Al-Sayyed, H. (2008). *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, **4**, 265 – 274.
- [124] Merghem, R. (2009). Editions *Bahaeddine Algérie*, p 111, 123.
- [125] Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M. H., & Journet, M. (1995). Edition *Inra*, p 57.
- [126] Edeas, M. (2007). *Phytothérapie*, **5**, 264 – 270.
- [127]Moneb, A., Ibrahim, R. K., Roy, R., & Sarhan, F. (2011). *Phytochemistry*, **72**, 2294 – 2307.
- [128] Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006). *Le cahier des techniques de l’Inra*, 79 – 82.
- [129] Martin, S., & Andriantsitohaina, R. (2002). *Annales de Cardiologie*, **51**, 304 – 315.
- [130] Babar, M. A., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2007). *Molécules*, **12**, 607 – 621.
- [131]Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Bouraoui, N. K., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C. (2008). *C. R. Biologies*, **331**, 372 – 379.
- [132] Chew, M. H., Xu, G. G., Ho, P. W., & lee, C. W. (2009). *Annles de chirurgie vasculaire*, **23** (4), 17 – 21.
- [133] Sökmen, B. B., Aydın, S., & Kınalıoğlu, K. (2012). *IUFS Journal of Biology*, **71** (1), 43 –51.
- [134] Dai, J. & Mumper, R. J. (2010). *Molécules*, **15** (10), 7313 – 7352.
- [135] Fraga, C. G. (2007). *IUBMB Life*, **59** (4-5), 308 – 315.
- [136] Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., & Trinajstić, N. (2003). *Croatica Chemica Acta*, **76** (1), 55 – 61.
- [137] Tiwari, A. K. (2001). *Current science*, **81** (9), 1179 – 1181.
- [138] Yoshino, M., & Murakami, K. (1998). *Anal. Biochem*, **257**, 40 – 44.
- [139] Perron, N. R., & Brumaghim, J. L. (2009). *Cell Biochem. Biophys*, **53**, 75 – 100.
- [140] Heim, E. K., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). *The journal of Nutritional Biochemistry*, **13**, 572 – 584.
- [141] Pietta, P. G. (2000). *Journal of Natural Products*, **63**, 1035 – 1042.
- [142] Handique, J. G., & Baruah, J. B. (2002). *Reactive & Functional Polymers*, **52**, 163 – 188.
- [143] Rolo-Naranjo, A., Rebollido-Rios, R., Melchor-Rodriguez, K., & Codorniu-Hernández, E. (2009). *Applied Mathematics and Computation*, **215**, 156–167.

- [144] 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.
- [145] Y.Hanasaki, S. Ogawa, S. Fukui (1994), *Free.Rad.Biol.Med*, 16: 845-850.
- [146] M. Antolovich, P.D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, K. Robards (2002), *Analyst*, 127: 183-198.
- [147] I.I. Koleva , T.A. van Beek , J.P. Linssen , A. Groot , L.N. Evstatieva (2002), *Phytochemical analysis*, 13(1): 8-17.
- [147] Jane Hubert (2006). *Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja .Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, p.64.*
- [149]I. Hinneburg, H.J. Damie Dorman, R.Hiltunen (2006) , *Food Chem.*, 97:122-129.
- [150] Cowan, M. M. (1999). *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4), 564 – 582.
- [151] Scalbert, A. (1991). *Phytochemistry*, 30, 3875 – 3883.
- [152] Daglia, M. (2011). *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 1 – 8.
- [153]Ulanowska, K., Traczyk, A., Konopa, G & Wegrzyn, G. (2008). Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DND, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbiol*, 184 (5), 271 –278.
- [154] Gonzalez-Gallego, J., Sanchez-Campos, S., & Tunon, M. J. (2007). *Nutricion Hospitalaria*, 22 (3), 287 – 293.
- [155] Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., & Kang, S. S. (2004). *Journal of Pharmacological Sciences*, 96 (3), 229 – 245.
- [156]Tapas, A. R., Sakarkar, D. M., & Kakde, R. B. (2008). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1089 – 1099.
- [157] Suschetet, M., Siess, M. H., Le Bon, A. M. & Canivenc-Lavier, M. C. (1996).*Edition Inra*, p 165, 204.
- [158] Alberts, D. S., Colvin, O. M., Conney, A. H., Ernster, V. L., Garber, J. E & Greenwald P. (1999). *Cancer Res*, 59, 4743 – 4758.
- [159] Delmas, D., Lançon, A., Colin, D., Jannin, B & Latruffe, N. (2006). *Current Drug Targets*, 7 (4), 423 – 442.
- [160] Kundu, J. K., & Surh, Y. (2008). *Cancer Letters*, 269 (2), 243 – 261.
- [161] Visioli, F., Borsani, L., & Galli, C. (2000). *Cardiovascular Research*, 419 – 425.
- [162] Yamanaka, N., Samu, O., & Nagao, S. (1996). *Febs Lett*, 401, 230 – 234.

- [163] Rein, D., Paglieroni, T. G., Wun, T., Pearson, D. A., Schmitz, H. H., Gosselin, R., & Keen, C. L. (2000). *Am. J. Clin. Nutr.*, 72 (1), 30 – 35.
- [164] Mulvihill, E. E. & Huff, M. W. (2010). *Canadian Journal of Cardiology*, 26, 17A -21A.
- [165] Bahadran, Z., Mirmira, P., & Fereidoun, A. (2013). *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 12 (43), 1 – 9.
- [166] Kebièche, M., Lakroun, Z., Mraïhi, Z., Soulimani, R. (2011). *Phytothérapie*, 9, 274 – 282.
- [167] Sultanova, N., Makhmoor. T., Abilov Z. A., Parween Z., Omurkamzinova V. B., Atta-ur-Rahman., Iqbal Choudhary M., (2001). *Journal of Ethnopharmacology*, 78: 201-205.
- [168] Younous C., Soulimani R., Seddiqui N., Baduri O., Dicko A. (2005). *Phytothérapie*, 6 : 248-251.
- [169] Quezel P., Santa S.(1963). *CNRS, Paris*11 (20), 1 – 4.
- [170] Crins W. J.(1989). *J. Arboretum*, 70: 403-425.
- [171] Zhao D. B., Liu X. H., Cui S. Y., Wang H, Q. (2005). *Chromatographia*, 61: 643-646.
- [172] Pavlov N. V. (1963). *Nauk. Kaz, USSR*. 6 : 178188.
- [173] EL Rahffari L., Zaid A., (2004). *Pratique de la Phytotherapie dans le Sud-Est du Maroc (Taflilet)*, Labo, de Valorisation des plantes médicinales des zones aride et semi aride, faculté de Sci. Et Tec. Errachidia, Maroc.
- [174] Saidana D., MahjoubM., BoussaadaChriaaO. J., Che'raifL., Daami.M., Mighri Z., Helal A. N., (2008). *Microbiological Research*, 163: 445-455
- [175] Soltan M. M., Zaki A. Kamel.(2009). *Journal of Ethnopharmacology*, 126: 102-107.
- [176] Sultanova N., Makhmoor T., Abilov ZA., Parween Z., Om-urkamzinova VB., Rahman A et al., (2001). Antioxidant and antimicrobial activities of *Tamarix ramosissima*. *J Ethnopharmacol*, 78: 201–205.
- [177] Nawwar M. A. M., Hussein S. A. M. (1994). *Phytochemistry*, 36(4): 1035-1037.
- [178] Djurdjevic L., MitrovicM., Avlovic P., Gajic G., Ostic O. (2006). *Arch Environ Contam Toxicol*, 50(4):488–495.
- [179] Umbetova A. K., Esirkegenaova Sh. Zh., Chaudri I. M., Omurkamzinova V. B . Abilov Zh. A., (2004). *Phytochemistry*, 41 (6): 728-729.
- [180] Tomas-BarberanF.A., Iniesta-Sanmartin E., Ferreres F., Tomas-Lorente F., Trowitzsch-KienastW., Wray V. (1994). *Phytochemistry*, 29 (9): 3050-3051.
- [181] Nabil A. M. S., El-Sissi I. H., Nawwar A. M. M . (1975). *Phytochemistry*, 14: 312-313.
- [182] El Ansari M. A., Nawwar A. M. M., El Sherbeny A. A., El-Sissi I. H . (1976). *Phytochemistry*, 15:231-232.

- [183] Parmar V. S., Bish K. S., Sharma S. K., Taneja P., Singh S., Simonsen O., Boll P. M. (1994). *Phytochemistry*, 15(2): 231-232.
- [184] Bikbulatova T. N., Korul'kina L. M. (2001). *Chemistry of Natural Compounds*, 37(3): 216-218.
- [185] Nawwar A. M. M., Souleman A. M. A., Buddrus J., Linscheid M. (1984). *Phytochemistry*, 23(10): 2347-2349.
- [186] Pandey D. P., Karnatak K. B., Singh R. P., Rather M. A., Bachheti R. K., Chand S. (2010). *International Journal of Pharm Tech Research* 2(4): 2340-2342.
- [187] Parmar V. S., Rathore J. S., Singh S., Jain A. K., Gupta S. R., (1985). *Phytochemistry*, 24: 871-872.
- [188] Tyagi A., Dixit V. P., Joshi B. C., (1980). *Naturwissenschaften*, 67:104.
- [189] Ji L. Xu. Z., Pan J., Yang J., (1997). *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 22: 360-362.
- [190] Souleman A. M. A., Barakat H. H., Hussein S. A. M., El-Mousallamy A. M. D., Nawwar M. A. M. (1998). *Natural Product Sciences*, 4:245-252.
- [191] Nawwar M. A. M., Souleman A. M. A., Buddrus J., Bauer H., Linscheid M. (1984). *Tetrahedron Letters*, 25: 49-52.
- [192] Khanbabaee K., Grober M., (2002). *Tetrahedron*, 58: 1159-1163.
- [193] Souleman A. M. A. (1998). *Nat Prod Sci*, 4:215-220.
- [194] Hussein S. A. M. (1997). *Natural Product Sciences*, 3: 127-134.
- [195] Harborne J. B. (1975). *Phytochemistry*, 14: 1331-1337.
- [196] Barakat H. H., Nawwar M. A. M., Buddrus J., Linscheid M. (1987). *Phytochemistry*, 26: 1837-1838.
- [197] Souliman A. M. A., Barakat H. H., El-Mousallamy A. M. D., Marzouk M. S. A., Nawwar M. A. M. (1991). *Phytochemistry*, 30: 3763-3766.
- [198] Buckingham J., (2008). *Dictionary of Natural Products*, Chapman and Hall, London.
- [199] Jiang Y. Q., Zuo C. X. (1988). *Yao xue Xue bao*, 23 : 749-755.
- [200] Agrawal P. K. (1991). *Planta Med*, 57: 397.
- [201] Merfort I., Buddrus J., Nawwar M. A. M., Lambert J. (1992). *Phytochemistry*, 31: 4031-4032.
- [202] Sultanova N., Makhmoo T., Yasin A., Abilov Z. A., Omurkamzinova V, B., Attaur-Rahman., Choudhary M. I. (2004). *Planta Med*, 70: 65-67.
- [203] Umbetova A. K., Choudhary M. I., Sultanova N. A., Burasheva G. Sh., Abilov Zh. A. (2006). *Chemistry of Natural Compounds*, 42: 332-335.
- [204] Nelroy E. Jackson. (1996). *Planta Med*: 40-42.

- [205] Brotherson J. D., Field D., (1987). *New Mexico*, 3: 110-112.
- [206] Baker H. G., (1972). *Ecol*, 53 (6): 997- 1010.
- [207] Ksouri R., Megdiche W., Falleh H., Trabelsi N., Boulaaba M., Smaoui A., Abdelly C., (2008). *C.R. Biologies* 331: 865-873.
- [208] Drabu S., Chaturvedi S., Sharma M., (2012). *Asian J Pharm Clin Res*, 5(3): 17-19.
- [209] MEHANI M., 2006.- Diagnostic sur les essais d'introduction de quelques essences forestières dans la région d'Ouargla 69p Mém. Ing.eco. univ ouargla.
- [210] GUILLAUMIN A., 1964.- *Le bon jardinier* tome 1, Ed la maison Austique, Paris, 833p.
- [211] Kayser, M.D. F. H., Bienz, K. A., Eckert, Ph.D. J. et Zinkernagel, M.D. M. R. (2005). *Medical Microbiology*. Edition Thieme. 698.
- [212] Irving, W., Ala'Aldeen, D. et Boswell, T. (2005). *Medical Microbiology*. Collection Instant Notes. Taylor et Francis. 350.
- [213] Harborne, J. B. (1967). Comparative biochemistry of flavonoids-V: Luteolin 5-glucoside and its occurrence in the umbelliferae. *Phytochemistry*, 6 (11), 1569 – 1573.
- [214] Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Sudraud, P., & Ribéreau-Gayon, P. (1968). *Sciences et techniques du vin*. Tome 1. Edition. *Dunod, Paris*, p 671.
- [215] Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un forestier. *Le cahier des techniques de l'Inra*, 79 – 82.
- [216] Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC.(2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal*. 10(3): 178-182.
- [217] Merken, H. M., Beecher G. R.(2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, n° 3, pp. 577-599.
- [218] Kim, D.-O., Chun, O.K., Kim, Y.J., Moon, H.-Y. et Lee, C.Y. (2003). Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J. Agric. Food Chem*. 51: 6509-6515.
- [219] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. et Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol*. 28: 25-30.
- [220] Benzie, I.F.F. et Strain, J.J.(1997). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power the FRAP. *Anal biochem* 239:70-76.

- [221] Chen, J. H., et Ho, C. T. (1997). Antioxidant activities of caffeic acids and its related hydrocinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2374–2378.
- [222] Bougatef, A., Hajji, M., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food. Chem*, 114: 1198-1205.
- [223] Unten, L., Koketsu, M., Kim, M. (1997). Antidiscoloring activity of green tea polyphenols on β -carotene. *J. Agr Food. Chem*, 45: 2009-2019.
- [224] Sun, T., Ho, C-H. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chem*, 90: 743– 749.
- [225] Sharififar, F., Moshafi, M.H., Mansouri, S.H., Khodashenas, M. et Khoshnoodi, M. (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control* 18: 800–805.
- [226] Sikder, M. A. A., Kaiser, M. A., Parvez, M. M., Hossian, A.K.M., Akhter, F. et Rashid, M. A. (2011). Preliminary Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of Leaf Extracts of *Mesua nagassarium* (Burm.f.). *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 10(1): 83 – 87.
- [227] Perva-Uzunalic, A., Skerget, M., Knez, Z., Weinreich, B., Otto, F. et Grunner, S. (2006). Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chemistry* 96(4): 597-605.
- [228] Mohammedi, Z. et Atik, F. (2011). Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) Karst. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2 (1) : 609-615.
- [229] Mosca, L., De Marco, C., Visioli, F. et Cannella, C. (2000). Enzymatic assay for the determination of olive oil polyphenol content: assay conditions and validation of the method. *J. Agric. Food Chem*. 48: 297-301.
- [230] Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-product: antioxidant activity, occurrence; and potential uses. *Food Chemistry*, 9, 191 – 120.
- [231] Ryan, M. T., Muller, H., & Pfanner, N. (1999). Functional staging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane. *J BiolChem* , 274 (29), 20619 – 20627.

- [232] Packer, L., Kraemer, K. et Rimbach, G. (2001). Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition* 17(10): 888-895.
- [233] Sousa, R., Dias, S., & Antunes C. (2006). Spatial subtidal macrobenthic distribution in relation to abiotic conditions in the Lima estuary, NW of Portugal. *Hydrobiologia*, 559, 135-148.
- [234] Conde, E., Cara, C., Moure, A., Ruiz, E., Castro, E. & Dominguez, H. (2009). Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chemistry*, 114 (3), 806 – 812.
- [235] Kumari D, Madhujith T, Chandrasekara. (2017). Comparison of phenolic content and antioxidant activities of millet varieties grown in different locations in Sri Lanka. *Food Sci Nutr*; 5(3):474-485.
- [236] Bougandoura, A., D'Abrosca, B., Ameddah, S., Scognamiglio, M., Mekkiou, R., Fiorentino, A., Benayache, S. et Benayache, F. (2016). Chemical constituents and in vitro anti-inflammatory activity of *Cistanche violacea* Desf. (Orobanchaceae) extract. *Fitoterapia* 109:248-53.
- [237] Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z., & Boucherit, K. (2014). Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de béchar en algérie. *Phytothérapie*, 12, 364 – 371.
- [238] Sanogo, R., Diallo, D., Diarra, S., Ekoumon, C. et Bougoudougou, F. (2006). Activité antibactérienne et antalgique des deux recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite au Mali. *Mali Medical* 1: 18-24.
- [239] Werner, F., Paul, O.O. et Rainer, A. (1998). Antibacterial activity of East African medicinal plants. *J. of Entomology and Pharmacology*, 60: 79-84.