

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de La Recherche Scientifique



Université de Ghardaïa

N° d'ordre :
N° de série :

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre
Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Par : SEBROU Imane

HOUARI Nadia

Thème

**Evaluation de l'activité anti-oxydante et
antibactérienne des différents extraits d'*Anvillea
radiata* récoltée dans la région de Ghardaïa**

Soutenu publiquement le : 23/06/2018

Devant le jury :

Mr. BOURAS Noureddine	Professeur	Univ. Ghardaïa	Président
Mlle. TELLI Alia	Maître de conférences B	Univ. Ghardaïa	Encadreur
Mlle. DAREM Sabrina	Doctorante	Univ. Annaba	Co- Encadreur
Mme. BEN SANIA Wafa	Maître Assistante A	Univ. Ghardaïa	Examinatrice

Année universitaire 2017/2018

« Le chercheur doit être libre de tenter des expériences audacieuses, de soutenir des théories révolutionnaires, voire paradoxales. Il doit disposer du droit à l'erreur »

Pierre Joliot, La Recherche Passionnément

Dédicace

A Mes Très Chers Parents

pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour.

Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie

A ma chère sœur Safia, belle-sœur Khadidja et frères Yacine et Abdelaziz

*Zui m'ont toujours donné le sourire dans les moments difficiles,
qui ont toujours su raviver en moi cette flamme de l'espoir pour qu'elle ne s'éteigne jamais*

*A leurs enfants : Tasnim, Saleh, Bochra, Maria et Adem
Je vous souhaite du succès et d'atteindre ce niveau et plus inchallah*

A tous mes enseignants

pour votre soutien permanent pendant mes longues années d'études

A toutes mes chères amies, proches et collègues

Ainsi que tous ceux qui aiment la science

Je dédie ce modeste mémoire

Imane

Remerciements

En premier lieu, nous remercions Allah tout puissant de m'avoir donné le courage, santé et la patience pour réaliser cette étude

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance et nos vifs remerciements à notre encadreur **TELLI Alia**, pour avoir encadré patiemment ce travail, pour leurs précieuses remarques constructives et leur suivi pour mener à terme ce travail.

Nous remercions chaleureusement Mr. le professeur **BOURAS Noureddine**, pour l'honneur qu'il nous a fait d'avoir accepté la présidence du jury de soutenance ; on le remercie aussi pour sa grande gentillesse et ses vastes informations au cours de la longue vie universitaire. Votre rigueur scientifique, votre humilité et vos qualités humaines ne font l'ombre d'aucun doute. Veuillez accepter cher professeur, nos sentiments de sincère reconnaissance.

Nos vifs remerciements aussi à Mme. **BEN SANIA Wafaa**, pour avoir acceptée d'examiner ce mémoire. Vraiment, c'est un immense plaisir que vous nous faites en acceptant de participer à l'amélioration de la qualité de ce modeste travail ; aussi nous voulons la remercier pour son aide tous ces années universitaires ; elle reste l'une des enseignantes que nous aimons et respectons beaucoup.

On ne pourrait remercier jamais assez Mlle. **DAREM Sabrina**, qui nous a ouvert ses bras pour accueillir tous nos questions malgré toutes ses nombreuses occupations. Nous la remercions très vivement.

Nos remerciements vont également à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail, notamment à : Mme **HAMID OUDJANA Aïcha**, pour la collaboration fructueuse, assistée de Mlle **KEBILI Zohra**. Leurs qualités scientifiques et humaines et leurs conseils judicieux nous ont été profitables au plus haut point.

Nous exprimons notre reconnaissance à Mr. **DJELLID Youcef** et Mr. **MOHAMMEDI Aladdin**, pour nous avoir bien accueillis, leur disponibilité et aide dans la réalisation de quelques tests et analyses statistiques d'activité antibactérienne : nos sincères remerciements. Merci également à Mr. **BENBAKHTI Zin eddin** pour son encourage, ses conseils et sa sympathie qui furent une source constante de motivation. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

Nous tenons aussi nos vifs remerciements aux techniciens des laboratoires de l'université : **DJEBRIT Imane**, **ZAHOUANI Ahlam**, **MESSITFA Nouredine**, **BEN HAMMADI Hicham** et **MOULAY Ali**.

Enfin, on ne voudrait pas oublier tous nos collègues que nous avons côtoyés au laboratoire. Merci pour tous les bons moments passés ensemble au laboratoire. Particulièrement à notre chère collègue **OULED LAID Fella**. Nos plus vifs remerciements pour ton aide, ta gentillesse au quotidien, tous tes encouragements et ton soutien dans les moments difficiles.

Evaluation de l'activité anti-oxydante et antibactérienne de différents extraits d'*Anvillea radiata* récoltée dans la région de Ghardaïa

Résumé

Dans le cadre de la valorisation de notre patrimoine naturel, on a intéressé à une espèce de la famille d'Asteraceae « *Anvillea radiata* » provenant de la région de Ghardaïa, ayant un fort potentiel d'activité du fait de leurs usages traditionnels largement répandus. La démarche poursuivie dans la réalisation de cette mémoire consiste à faire des extractions avec des solvants de polarité différente (méthanolique, butanolique, acétate éthylique et dichlorométhanique) de la partie aérienne, suivie par des analyses qualitatives et quantitatives de différents composés chimiques doués des activités anti-oxydantes et antibactériennes. Les résultats de criblage phytochimique confirment la richesse de la plante en composés phénoliques (tanins, flavonoïdes, coumarines, quinones libres...etc.), azotés (alcaloïdes) et terpéniques (saponosides et stéroïdes). Le méthanol a été le meilleur extracteur des polyphénols totaux et flavonoïdes avec des teneurs de $39,11 \pm 9,52$ mg EAG/g et $17,60 \pm 1,78$ mg ER/g respectivement. La teneur en acides phénols la plus importante est enregistrée pour l'extrait d'acétate d'éthyle ($283,87 \pm 30,54$ µg EAC/g). L'extrait de n-butanol est le plus riche en tanins condensés ($4,63 \pm 5,85$ mg EC/g). L'évaluation de l'activité anti-oxydante des différents extraits a été réalisée par deux tests (ABTS et FRAP). Le pouvoir inhibiteur du radical cation ABTS•+ le plus important est obtenu avec l'extrait méthanolique, avec une CI_{50} égale à $0,178 \pm 0,04$ mg/ml, qui est supérieure à celle de l'antioxydant standard (Trolox). Les extraits d'acétate d'éthyle ($CI_{50} = 0,251 \pm 0,02$ mg/ml), de dichlorométhane ($CI_{50} = 0,417 \pm 0,02$ mg/ml) et de butanol ($CI_{50} = 0,461 \pm 0,01$ mg/ml) ont une forte capacité réductrice de fer plus importante que celle de Trolox. L'activité antibactérienne qui a été évaluée par la méthode de diffusion sur milieu solide montre que l'extrait dichlorométhanique a le meilleur effet inhibiteur vis-à-vis la majorité des souches pathogènes testées. Par ailleurs, l'extrait butanolique a la forte activité vis-à-vis de *S. aureus* et *E. coli* avec des CMI inférieures à $7,03$ µg/ml. En conclusion, les résultats obtenus peuvent justifier l'utilisation traditionnelle de cette espèce pour traiter les maladies inflammatoires et infectieuses.

Mots clés : *Anvillea radiata*, criblage phytochimique, polyphénols, activité anti-oxydante, activité antibactérienne

Evaluation of antioxidant and antibacterial activity of different extracts of *Anvillea radiata* collected in Ghardaïa region

Abstract

In order to valorise our natural patrimony, we are interested in a species of the family of Asteraceae “*Anvillea radiata*” collected in region of Ghardaia, having a high potential of activity because of their widespread traditional uses. The approach pursued in the realization of this memory consists of making different extractions (methanolic, butanol, ethyl acetate and dichloromethane) of the aerial part, followed by qualitative and quantitative analyzes of various chemical compounds endowed with antioxidant and antibacterial activities. The results of phytochemical screening confirm the richness of this plant in phenolic compounds (tannins, flavonoids, coumarins, free quinones...), nitrogen (alkaloids) and terpene (saponins and steroids). Methanol was the best extractor of total polyphenols and flavonoids with contents of 39.11 ± 9.52 mg EAG/g and 17.60 ± 1.78 mg ER/g respectively. The highest phenolic acid content is recorded for the ethyl acetate extract (283.87 ± 30.54 µg EAC/g). The n-butanol extract is the richest in condensed tannins (4.63 ± 5.85 mg EC/g). The evaluation of the antioxidant activity of the various extracts was carried out by two tests (ABTS and FRAP). The most important inhibitory power of the ABTS^{•+} cation radical is obtained with the methanolic extract, with an IC₅₀ equal to 0.178 ± 0.04 mg/ml, which is greater than that of the standard antioxidant (Trolox). The ethyl acetate (IC₅₀ = 0.251 ± 0.02 mg/ml), dichloromethane (IC₅₀ = 0.417 ± 0.02 mg/ml) and butanol (IC₅₀ = 0.461 ± 0.01 mg/ml) extracts have a high iron reducing capacity which are more important than that of Trolox. The antibacterial activity, which was evaluated by the solid medium diffusion method, showed that the dichloromethane extract has the best inhibitory effect against the majority of pathogenic strains tested. In addition, butanolic extract has the highest activity against *S. aureus* and *E. coli* with MIC below 7.03 µg/ml. In conclusion, the obtained results may justify the traditional use of this species to treat inflammatory and infectious diseases.

Keywords: *Anvillea radiata*, phytochemical screening, polyphenols, antioxidant activity, antibacterial activity

تقييم الفعالية المضادة للأكسدة والبكتيريا لمستخلصات مختلفة لنبته النقد " *Anvillea radiata* " المحصودة من منطقة غرداية

الملخص

في إطار تقييم موروثنا الطبيعي، إختارنا العمل على نبته النقد (*Asteraceae*) *Anvillea radiata* المحصودة من منطقة غرداية، لما لها من فوائد عديدة تبعا لاستعمالاتها التقليدية المتنوعة. للشروع في العمل، تم تحضير أربعة مستخلصات بمذيبات مختلفة القطبية (الميثانول، البوتانول، خلات الايثيل وثنائي كلورو ميثان) للجزء الهوائي للنبته. ثم تم القيام بتحليل نوعية وكمية لمجموعة من المركبات الكيميائية المتوقع أنها المسؤولة عن النشاط المضاد للأكسدة والبكتيريا. كشف التحليل النوعي لمختلف المستخلصات عن وجود مركبات فينولية (عصص، فلافونويد، كوماران، كينون حرة. إلخ). آزوتية (ألكالويد)، وتربينية (صابونين، ستيرويد). بينما نتائج التحليل الكمية أظهرت أن معدل إجمالي البوليفينول والفلافونويد الأعلى قد سجل بالنسبة لمستخلص الميثانول (بوليفينول $39,11 \pm 9,52$ مغ/EAG. الفلافونويد $17,60 \pm 1,78$ مغ/ER). وأن أعلى تركيز للأحماض الفينولية كان في مستخلص خلات الايثيل بمعدل $283,87 \pm 30,54$ ميكروغرام/EAC. أما العفص المكثف فكان بنسبة أكبر في مستخلص البوتانول ($4,63 \pm 5,85$ مغ/EC). فيما يخص الفعالية المضادة للأكسدة، فقد تم تقييمها باستخدام إختباري (ABTS. FRAP). أين سجل مستخلص الميثانول أعلى تثبيط للجذور الحرة بنسبة $CI_{50} = 0,178 \pm 0,04$ مغ/مل، حتى أفضل من تلك الخاصة بالمضاد للأكسدة القياسي (Trolox). مستخلص خلات الايثيل $0,251 \pm 0,02$ مغ/مل، ثنائي كلورو الميثان ($0,417 \pm 0,02$ مغ/مل) والبوتانول ($0,461 \pm 0,01$ مغ/مل) أظهروا قدرة إرجاعية أعلى من المرجع (Trolox). إن النشاط المضاد للبكتيريا المحقق بطريقة الإنتشار كشف أن مستخلص ثنائي كلورو الميثان يمتلك أفضل فعالية لغالبية السلالات المختبرة. بالمقابل، فإن مستخلص البوتانول من كشف عن نشاط عالي ضد (*S. aureus*). *E. coli* بقيم أقل من $CMI=7,03$ ميكروغرام/مل. كل هذه النتائج تؤكد فعالية النبته في معالجة العديد من الأمراض الالتهابية والمعدية.

الكلمات المفتاحية : *Anvillea radiata*، نبته النقد، الفحص الكيميائي النباتي، بوليفينول، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للبكتيريا.

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
2	Différents tests de criblage phytochimique	14
3	Résultats de rendements d'extraction des différents extraits d' <i>A. radiata</i>	21
4	Résultats de criblage phytochimique des différents extraits d' <i>A. radiata</i> .	23
5	Valeurs de CI ₅₀ de l'activité anti-oxydante des différents extraits d' <i>A. radiata</i> déterminée par le test ABTS	34
6	Valeurs de CI ₅₀ du test FRAP de différents extraits d' <i>A. radiata</i> .	36
7	Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des antibiotiques (témoin positif).	40
8	Valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) (en µg/ml) des différents extraits d' <i>A. radiata</i> .	43

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	<i>Anvillea radiata</i>	10
2	Fleur et feuilles d' <i>A. radiata</i>	10
3	Mécanisme réactionnel intervenant entre le radical «ABTS•+» et un antioxydant.	17
4	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe ³⁺ -TPTZ et un anti-oxydant (AOH).	18
5	Teneur en polyphénols totaux des différents extraits d' <i>A. radiata</i>	26
6	Teneur en flavonoïdes des différents extraits d' <i>A. radiata</i>	28
7	Teneur en acides phénols des différents extraits d' <i>A. radiata</i>	30
8	Teneur en tanins condensés des différents extraits d' <i>A. radiata</i>	31
9	Diamètres des zones d'inhibition (en mm) de la croissance des souches testées par différents extraits d' <i>A. radiata</i> .	39
10	Inhibition de la croissance de trois souches testées par différentes concentrations des extraits d' <i>A. radiata</i> .	43

Liste des abréviations

- **ABTS** : Acide 2,2-Azino-Bis-3-ethylbenzoThiazoline-6-Sulfonique
- **AE** : Acétate d'éthyle
- **ATCC** : American Type Culture Collection
- **BHT** : Butylated hydroxytoluène
- **BuOH** : Butanol
- **CI₅₀** : Concentration inhibitrice de 50%
- **CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice.
- **DCM** : Dichlorométhane
- **EAC** : Equivalent d'acide caféique
- **EAG** : Equivalent d'acide gallique
- **EC** : Equivalent de catéchine
- **ER** : Equivalent de rutine
- **FRAP** : Ferric Reducing Antioxidant Power
- **H₂SO₄** : Acide sulfurique
- **HCl** : Acide chlorhydrique
- **MéOH** : Méthanol
- **TPTZ** : 2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-s-triazine
- **UFC** : Unité Formant Colonie

Table des matières

Dédicace	
Remerciements	
Résumé	
Abstract	
المخلص	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
<i>Introduction</i>	1
<i>Chapitre I : Matériel et méthodes</i>	
I.1. Matériel	10
I.1.1. Matériel végétal	10
a. Choix de la plante	10
b. Description botaniques et systématique	10
c. Ecologie et répartition géographique.....	11
d. Usage thérapeutique	11
e. Récolte	12
f. Séchage et broyage	12
I.1.2. Souches bactériennes testées	12
I.2. Méthodes	12
I.2.1. Extraction	12
I.2.2. Détermination du rendement d'extraction	13
I.2.3. Analyses chimiques	13
I.2.3.1. Criblage phytochimique.....	13
I.2.3.2. Quantification de certaines classes des composés phénoliques.....	14
a. Dosage des polyphénols totaux.....	14
b. Dosage des flavonoïdes	15
c. Dosage des acides phénols.....	15
d. Dosage des tanins condensés	15
I.2.4. Evaluation des activités biologiques	16
I.2.4.1. Activité anti-oxydante.....	16
a. Test ABTS	16
b. Test FRAP	17
I.2.4.2. Activité antibactérienne	18

a. Méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé	18
b. Méthode de micro-dilution en milieu liquide.....	19
I.2.4. Analyses statistiques.....	19
<i>Chapitre II : Résultats et discussion</i>	
II.1. Rendement d'extraction	21
II.2. Criblage phytochimique.....	22
II.3. Quantification de certaines classes phénoliques	25
II.3.1. Teneur en polyphénols totaux	25
II.3.2. Teneur en flavonoïdes	28
II.3.3. Teneur en acides phénols	29
II.3.4. Teneur en tanins condensés.....	31
II.4. Activités biologiques	33
II.4.1. Activités anti-oxydantes.....	33
II.4.1.1. Piégeage du radical-cation ABTS ^{•+}	34
II.4.1.2. Pouvoir réducteur de fer (FRAP).....	36
II.4.2. Activité antibactérienne	38
II.4.2.1. Zone d'inhibition	38
II.4.2.2. Concentration inhibitrice minimale (CMI).....	43
<i>Conclusion et perspectives.....</i>	<i>47</i>
<i>Références bibliographiques</i>	<i>49</i>
<i>Annexes</i>	

Introduction

Depuis la nuit des temps, les hommes ont toujours utilisé les plantes pour se soigner, se nourrir et se parer (Catier et Roux, 2007). Ils sont guidés par l'expérience pour se soigner avec les plantes qu'ils avaient à leur disposition (Chevallier, 2001).

Toutefois, malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne (Développement du médicament de synthèse et le progrès de la pharmacologie) (Chevallier, 2001), plus de 70% des médicaments produits actuellement sont d'origine végétale (Chaabi, 2008). En effet, il est difficile d'imaginer le monde sans la quinine employée contre la malaria (dérivée du genre *Cinchona*), sans la digoxine (du genre *Digitalis*), un traitement du cœur, ou encore l'éphédrine (du genre *Ephedra*), principes actifs essentiels dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes (Chevallier, 2001).

Pourquoi se soigner par les plantes ? Parce que se soigner par les plantes, c'est se soigner de manière naturelle, synonyme de « sans danger », en respectant le corps et surtout le cerveau ; parce que cela est plus doux et plus profond à la fois (Scimeca, 2006), et en raison d'une conscience croissante des effets secondaires négatifs infligés par les drogues modernes, beaucoup de personnes cherchent les remèdes sans effets secondaires et bien sûr moins chers que la médecine conventionnelle (Saoud, 2016). Au XIX^e siècle, les médecins se contentaient, pratiquement, de puiser dans la « pharmacie du bon Dieu » pour soulager les maux de leurs contemporains (Chevallier, 2001). C'est ce que l'on entend aujourd'hui sous le terme de phytothérapie : c'est une thérapeutique qui utilise les plantes ou formes galéniques dérivées de plantes (du grec *phyto* : plante et *therapeia* : soin), excluant les principes (actifs) d'extraction purs isolés et les plantes toxiques (sur listes) (Catier et Roux, 2007). Elle est l'art de se soigner par les plantes ; mais pas n'importe quelles plantes, les plantes médicinales. Ce sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles.

Selon l'OMS (2000), la phytothérapie est la somme des connaissances, compétences et pratiques qui reposent sur les théories, croyances et expériences propres à une culture et qui sont utilisées pour maintenir les êtres humains en bonne santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, traiter et guérir des maladies physiques, mentales ou le déséquilibre social. Elle est reliée à une expérience pratique et à des observations faites de génération en génération, et transmises de façon orale ou écrite.

La phytothérapie est profonde, douce et respectueuse du corps. L'action de la plante selon Scimeca (2006) est : pharmacologique et rationnelle, car c'est par la présence de molécules très

complexes que la plante agit ; systémique et holistique, car une plante n'agit pas sur un seul organe ou une seule cellule mais sur un organisme entier ; et globale par cette notion de *totum* qui est le terme propre à la phytothérapie pour indiquer que dans une plante, tout agit. La plante entière a toujours une action plus douce, plus large et plus profonde que la substance dite active isolée (Belbachir, 2017). Ainsi, des chercheurs ont démontré que les principes actifs de nombreux végétaux, agissent de manière complexe et combinée pour produire un effet thérapeutique global (Chevallier, 2001).

La drogue végétale est la substance de plante fraîche ou desséchée. On retrouve parfois la plante entière, mais le plus souvent ce sont des parties de plantes comme les fleurs, les fruits, les feuilles, les racines et l'écorce. On retrouve également les exsudats comme le latex, le baume et la gomme, mais qui ne doivent avoir subi aucun traitement. Leur qualité est garantie si les conditions de culture, récolte, séchage et stockage sont respectées (Adouane, 2016). Les préparations à base de drogues végétales se présentent en extraits, huiles, poudres, sucs exprimés par pression. Leur production met en œuvre des opérations de fractionnement, purification ou concentration. Cependant, les constituants isolés chimiquement définis ou leur mélange ne sont pas considérés comme des préparations à base de drogues végétales. Des substances, telles que des solvants, diluants et conservateurs peuvent entrer dans la composition des préparations à base de drogue végétale, la présence de ces substances doit être indiquée (Adouane, 2016). La phytothérapie comporte différents types :

- L'aromathérapie : C'est une thérapeutique qui utilise les huiles essentielles, qui sont des produits complexes à utiliser souvent à travers la peau (Libbey, 2012 ; Belbachir, 2017).
- La gemmothérapie : Qui consiste en l'utilisation d'extraits embryonnaires végétaux (bourgeons et jeunes pousses). Elle permet un drainage de l'organisme alors que notre corps est de plus en plus gorgé de substances chimiques (médicaments, alimentation, pollution) (Halfon, 2011).
- L'herboristerie : C'est la méthode la plus classique. Elle se sert de la plante fraîche ou séchée, soit entière, soit une partie de celle-ci (écorce, fruits, fleurs). La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion, macération. Elle existe aussi sous forme plus moderne de gélules, de poudre, de plante sèche que le sujet avale (Libbey, 2012).
- L'homéopathie : elle est basée sur le trépied conceptuel d'Hahnemann : similitude, globalité, infinitésimalité. Il s'agit de l'administration à des doses très faibles ou infinitésimales de substances susceptibles de provoquer, à des concentrations différentes chez l'homme en bonne

santé (pathogénésie), des manifestations semblables aux symptômes présentés par le malade (Sarembaud et Poitevin, 2011). Les trois quarts de principe actif sont d'origine végétale, le reste étant d'origine animale et minérale (Strang, 2006 *In* Belbachir, 2017).

- Phytothérapie pharmaceutique : ou la pharmacognosie, une pratique basée sur les avancées et preuves scientifiques recherchant les extraits actifs des plantes qui, une fois identifiés sont standardisés pour avoir une action soutenue et rapide (Daoudi *et al.*, 2015). Ils sont présentés sous forme de sirop, gouttes, gélules et lyophilisats (Belbachir, 2017).

L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes. Depuis le XVIII^e siècle, au cours duquel des savants ont commencé à extraire et à isoler les substances chimiques qu'elles contiennent, on considère les plantes et leurs effets en fonction de leurs principes actifs (Chevallier, 2001). Ces remèdes naturels sont bien souvent très efficaces avec moins d'effets secondaires que les médicaments de synthèse, mais peuvent néanmoins être mortels ou toxiques pour l'organisme lorsqu'ils sont mal utilisés (Bougandoura, 2011)

Comme tous les médicaments, les plantes médicinales doivent être employées avec précaution. Il est recommandé de n'utiliser une plante que sur les conseils d'un spécialiste. Toutefois, lorsqu'un traitement à base de plantes est suivi correctement, les risques d'effets secondaires sont fort limités (Chevallier, 2001).

D'après la FAO (1996), le professeur Auguste Chevalier premier explorateur botaniste du Burkina Faso déclare qu'il n'y a pas une plante sur la terre qui n'ait quelques rapports avec les besoins de l'homme et ne serve quelque partie à sa table, à son vêtement, à son toit, à ses plaisirs, à ses remèdes ou au moins à son foyer. Cette affirmation prouve qu'il est nécessaire de comprendre les relations des populations avec l'environnement et plus précisément avec les plantes.

C'est dans cette optique que s'inscrit ce travail qui vise essentiellement la mise en évidence de l'importance relative liée à l'utilisation des plantes spontanées Sahariennes en pharmacopée traditionnelle dans la région de Ghardaïa.

En première approximation, on peut définir le Sahara comme la région limitée au Nord par les rides méridionales de l'Atlas (Anti-Atlas marocain, Atlas saharien d'Algérie) et au Sud par une ligne allant de l'embouchure du Sénégal au lac Tchad en passant au nord de la boucle du Niger. La bande désertique ainsi définie prend en écharpe tout le continent africain d'Ouest en Est, c'est-à-dire qu'elle va du littoral atlantique jusqu'à celui de la mer Rouge (Ozenda, 1977).

Le Sahara est le plus grand des déserts, mais également le plus extrême, c'est à dire celui dans lequel les conditions désertiques atteignent leurs plus grandes âpretés (Ozenda, 1977). La végétation des zones arides est très clairsemée ; leur aspect est en général nu et désolé. Les arbres y sont aussi rares que dispersés, et les herbes n'y apparaissent que pendant une brève période de l'année, quand les conditions deviennent favorables (Chopra *et al.*, 1960).

Selon Ozenda (1991), le mode d'adaptation à la sécheresse des plantes sahariennes permet de différencier deux catégories : Plantes éphémères, appelées encore "achebs", n'apparaissent qu'après la période des pluies et effectuent tout leur cycle végétatif avant que le sol ne soit desséché. La longueur de ce cycle est très variable d'une espèce à une autre et est généralement d'un à quatre mois et plantes permanentes ou vivaces, où l'adaptation met ici en jeu, à côté de phénomènes physiologiques encore mal connus, un ensemble d'adaptation morphologiques et anatomiques qui consistent surtout en un accroissement du système absorbant et une réduction de la surface évaporante (Chehema, 2006).

Les ressources végétales spontanées comptent environ 500.000 espèces de plantes sur terre, dont 80.000 possèdent des propriétés médicinales (Quyou, 2003 *In* Bouziane, 2017 ; Cowan, 1999). Le Sahara septentrional, avec sa grande superficie, compte environ 500 espèces de plantes spontanées supérieures (Ozenda, 1991). Parmi les plantes du Sahara algérien énumérées par M. Cosson, un peu plus du tiers consiste en espèces endémiques (environ 36 pour 100) (Grisibach, 1878). Ces plantes médicinales sont très peu étudiées du point de vue ethnobotanique (Bouallala *et al.*, 2014) et pharmacologique.

Les plantes médicinales constituent une banque de molécules caractérisées par des structures riches, complexes et fort variées que les chimistes auraient bien du mal à synthétiser dans leurs laboratoires (Graham et Depovere, 2002 *In* Beddou, 2015). Environ 170 000 molécules bioactives ont été identifiées (Chaabi, 2008), qu'ils sont d'intérêt multiple mis à profit dans l'industrie, alimentation, cosmétologie et en dermatopharmacie (Bahorun, 1997). A côté des métabolites primaires classiques, glucides, protides, lipides, ils accumulent fréquemment des métabolites secondaires (Macheix *et al.*, 2005). Le pouvoir de guérison des plantes provient des effets de ces métabolites (Cowan, 1999), qui ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultent de réactions chimiques ultérieures. Ils se trouvent dans toutes les parties des plantes mais ils sont distribués selon leurs rôles défensifs. Cette distribution varie d'une plante à l'autre (Seghiri, 2009).

Leurs rôles sont encore mal connus, mais il est clair qu'ils interviennent de manière interactive dans les relations entre la plante et son environnement : molécules servant à la défense contre des prédateurs ou des agents pathogènes, à la prédation, à l'adaptation de la plante à son environnement (ex : les molécules piégeant les métaux lourds pour que la plante puisse pousser sur un terrain minier), à la communication, etc. Ils sont les éléments essentiels de la coévolution des êtres vivants ce qui explique leur très grande diversité et leur intérêt particulier pour la recherche de nouveaux médicaments (Beddou, 2015). Certains d'entre eux assurent une protection contre les radiations solaires et d'autres encore facilitent la dispersion du pollen et des graines. Ils sont en revanche très nombreux et variés (>100.000) mais produits souvent en très faibles quantités (Hopkins, 2003 *In* Baba Ouyoub, 2017).

Ils peuvent être classés en plusieurs grandes familles dont les plus importantes en termes de nombre de structures connues (Beddou, 2015) sont les composés aromatique ou polyphénols (Hopkins, 2003), les composés azotés, avec en particulier les alcaloïdes, et les composés terpéniques (Beddou, 2015). Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (Mansour, 2009).

Le corps humain est le siège constant de la synthèse d'espèces oxygénées réactives dont la production contrôlée est indispensable au bon fonctionnement de l'organisme. (Van Antwerpen *et al.*, 2006). Ils sont générés en permanence, en quantités limitées, soit en tant que coproduits de la respiration mitochondriale, soit pour remplir une fonction bien précise (Holevinsky et Nelson, 1995). Ils préviennent la maladie par l'implication du système immunitaire, médiation de la signalisation cellulaire, jouant un rôle essentiel dans l'apoptose (Fang *et al.*, 2002), la fécondation de l'ovule, le fonctionnement de certains neurones... etc. (Favier, 2003).

Cependant dans de nombreuses pathologies, il arrive qu'une production exagérée et/ou incontrôlée de ces espèces aboutisse à des dégâts oxydatifs (Van Antwerpen *et al.*, 2006). Quand l'homéostasie de l'oxygène n'est pas maintenue, l'environnement cellulaire devient oxydativement stressé (Singal et Petkau, 1988 *In* Chaabi, 2008). La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui

malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque chimique (Favier, 2003).

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies chroniques humaines comme facteur déclenchant ou associé à des complications, telle que le cancer, le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires et neurodégénérative, inflammation, et vieillissement (Bidie *et al.*, 2011), et les ischémies (Baba Ouyoub, 2017).

La protection contre les effets délétères induits par ces radicaux oxygénés s'effectue à l'aide de trois types d'agents différents : les protéines non enzymatiques, Les enzymes tels que les superoxyde-dismutases et les glutathion-peroxydases et enfin les antioxydants d'origine nutritionnelle tels que les caroténoïdes, les tocophérols (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C) et les polyphénols qui sont des antioxydants essentiels pour l'homme (Bouhadjra,2011)

L'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus (Chevallier, 2001). Récemment, l'acceptation de la médecine traditionnelle comme forme alternative de santé et de développement de la résistance microbienne à l'antibiotique disponible a mené des auteurs à étudier l'activité antimicrobienne des plantes médicinales (Nostro *et al.*, 2000), cherchant à traiter la faiblesse qui favorise l'apparition de la maladie en essayant de la resituer dans le contexte général de la vie du patient. Les herboristes identifient plusieurs facteurs responsables de la maladie. Ils ne prennent pas seulement les symptômes physiques comme indicateurs principaux, mais aussi les facteurs alimentaires, émotionnels, voire spirituels (Chevallier, 2001).

En général, l'activité antimicrobienne des plantes est inférieure à celle exercée par les antibiotiques d'origine microbienne (Tegos *et al.*, 2002). Mais ils ont développé plusieurs stratégies pour contrôler les infections bactériennes. La synthèse d'un grand nombre de molécules faiblement actives, plutôt que de puissants antibiotiques, en fait partie. Elle semble d'ailleurs utilisée pour diminuer la pression sélective, qui favorise le développement des résistances. Toutefois, l'activité de ces antibactériens peut être potentialisée lorsqu'ils agissent en synergie avec d'autres molécules (Stermitz *et al.*, 2000)

Parmi les milliers de plantes médicinales recensées à ce jour, ceux de la famille des Asteraceae (composées) (Seghiri, 2009), Le mot « Aster » du grec signifie étoile, en relation avec la forme de la fleur. Ils sont une famille appartenant aux dicotylédones comprenant plus de

1500 genres et plus de 25000 espèces décrites dont 750 endémiques (Crete, 1965 *In* Saoud, 2016). Une famille cosmopolite, distribuées principalement dans les zones tempérées du globe (Barkely *et al.*, 2006). En Algérie, il en existe 109 genres et 408 espèces (Makhloufi, 2010); et en France 111 genres et 638 espèces (Berra, 2015). Les Astéracées sont économiquement importantes, vu que plusieurs de ses plantes sont cultivées pour leur valeur alimentaire (le tournesol, le topinambour, la laitue, la chicorée, la camomille, etc.) ou comme plantes décoratives (les dahlias, les asters, les rudbeckies, les gaillardes, etc) (Mahdjar, 2013).

Cette famille présente des caractères morphologiques divers : végétaux à port extrêmement varié constitués d'arbustes et parfois d'arbrisseaux. Généralement, ce sont des herbes annuelles ou bisannuelles plus ou moins pérennes. Ils possèdent des lianes herbacées grimpantes ou rampantes. Les feuilles très polymorphes petites sont sans stipules, alternes ou opposées et en rosettes. Elles sont simples, entières ou dentelées et parfois divisées en plusieurs segments plus ou moins grands. En revanche, cette famille est très homogène au niveau de ses inflorescences très caractéristiques : le capitule. Les fleurs serrées les unes à côté des autres, sans pédoncules, placées sur l'extrémité élargie d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des bractées florales appelée involucre.

Le fruit est un akène généralement surmonté d'un pappus provenant du calice après la fécondation. Son rôle est de favoriser la dispersion des graines par le vent (anémochorie) (Barkely *et al.*, 2006), avec souvent des racines charnues : rhizomateuses, tubéreuses ou pivotantes (Saoud, 2016). Le genre *Anvillea* contient deux espèces présentes en Afrique du Nord et au Moyen-Orient. *Anvilleina* Maire est réduit à un synonyme d'*Anvillea* et les deux nouvelles combinaisons suivantes sont faites : *A. platycarpa* (Maire) et *A. garcinii* ssp. *radiata*. Le nombre de chromosomes $2n = 14$ de *Garcinii* ssp. *radiata* est signalé (Anderberg, 1982).

Anvillea radiata a fait l'objet de quelques études phytochimique et pharmacologique. Ces auteurs ont mis en évidence la présence de quelques groupes chimiques des différents extraits et fractions de la plante. Ceci a été confirmé par une analyse quantitative basée sur le dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes, des flavonols et des tanins condensés. Suivant par l'évaluation, *in vitro*, de l'activité antioxydante, antimicrobienne et antifongique par différentes méthodes. Ainsi qu'antidiabétique, allélopathique, cytotoxique, antitumoral, anti-inflammatoire et anticancéreuse. En plus, une identification de certains composés phénoliques par chromatographie (El Hanbali *et al.*, 2006 ; Beddou, 2015 ; Saoud, 2016 ; Moghtet *et al.*, 2017)

Avant tout ça, une large étude botanique a été réalisée par Anderberg (1982) sur les différentes parties de l'espèce. En 2004, El Hassany et son équipe ont isolé de sa partie aérienne provenant du Maroc un nouveau parthénolide (C₁₅H₁₈O₄), avec deux autres germacranolides déjà connues : parthénolid-9-one et 9- α -hydroxyparthénolide. Ce dernier a été démontré qu'il possède une activité cytotoxique significative contre cinq lignées de cellules cancéreuses humaines et un pouvoir antimicrobien contre *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* et *Streptococcus C*.

Enfin, la caractérisation de l'huile essentielle extraite de la partie aérienne a fait l'objet d'une seule étude (El Hanbali *et al*, 2007). L'analyse chimique par CPG/SM de cette huile révèle une prédominance en 6-oxocyclonérolidol (66.6%) et en 6-hydroxycyclonérolidol (11.4%). Ces auteurs rapportent également que ces huiles essentielles possèdent une excellente activité antibactérienne vis-à-vis des microorganismes testés.

C'est dans ce cadre d'augmenter les chances d'isoler de nouvelles molécules et/ou de nouvelles voies d'application thérapeutiques (ou cosmétiques), il est plus judicieux de choisir des espèces qui ont été peu ou pas étudiées jusque-là. Cependant, le scientifique averti pourra également faire des découvertes dignes d'intérêt en investiguant une plante largement étudiée sous un angle nouveau : autre organe ou extrait, technique analytique nouvelle, cible biologique différente, etc. Dans tous les cas, une recherche de littérature approfondie devra précéder le début des processus d'extraction.

Pour le présent travail, en tenant compte de tous ces critères, on a sélectionné la plante médicinale saharienne « *Anvillea radiata* » nouvellement étudié dans la région de Ghardaïa, ayant un fort potentiel d'activité du fait de leurs usages traditionnels largement répandus. Comme on ne dispose d'aucun travail qui différencie l'activité biologique de la partie aérienne de différents extraits (méthanolique, buthanolique, acétate éthylique et de dichlorométhane) de cette espèce végétale. On a choisi de mener notre étude sur celui-ci, ainsi qu'on a attaché à utiliser les différentes méthodologies développées ultérieurement.

Après cette première partie consacrée à la description botanique de la famille d'Asteraceae, à des notions sur la phytothérapie, le stress oxydatif et la résistance antimicrobienne, ce travail s'articule aux deux chapitres :

Le premier est consacré à la présentation de la méthodologie du travail qui renferme le choix et la description botanique du matériel végétal étudié, les techniques d'extraction et d'analyses utilisées ainsi que les protocoles des tests biologiques.

Le deuxième chapitre sera réservé à la présentation de tous les résultats obtenus dans notre étude et de leur discussion.

Une conclusion générale viendra achever le présent travail dans laquelle différentes perspectives de recherches seront évoquées.

Chapitre I :
Matériel et méthodes

I.1. Matériel

I.1.1. Matériel végétal

a. Choix de la plante

L'espèce choisie dans cette étude est *Anvillea radiata*, qui est une espèce endémique du nord-africain, utilisée par la population locale dans le traitement plusieurs maladies en particulier l'hypertension, les troubles digestifs et certaines infections. Comme cette espèce n'est pas ou très peu étudiée, l'objectif de ce travail vise à évaluer certaines activités biologiques des principes actifs extraits par des solvants de polarité différente.

b. Description botaniques et systématique

Anvillea radiata est un arbrisseau buissonnant de 40 à 60 cm de haut (Figure 1), à tiges dressées et très rameuses, ligneuses à la base (Ozenda, 1991). Cette plante est reconnue par ses feuilles de couleur bleu-verte sous la forme d'un triangle allongé et avec bord denté, ses inflorescences disposées en larges capitules jaune-orange et entouré de feuilles radieuses (Figure 2), qui passent progressivement aux bractées résistantes et épicées (Moghtet *et al.*, 2017). La période de floraison est en avril à mai (Chehma, 2006). Elle dégage, comme la plupart des plantes de la famille des Asteraceae, une forte odeur aromatisée (Quézel et Santa, 1963).



Figure 1 : *Anvillea radiata* (Dobignard, 2008).



Figure 2 : Fleur et feuilles d'*A. radiata* (Dobignard, 2008).

D'après Quézel et Santa (1963), la classification qu'occupe *Anvillea radiata* Coss. & Dur. est la suivante :

Règne :	Plantae
Embranchement :	Spermatophytes
Sous Embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Ordre :	Asterales
Famille :	Asteraceae
Genre :	<i>Anvillea</i>
Espèce :	<i>Anvillea radiata</i> Coss. & Dur.

Nom vernaculaire en Arabe : Noug, Arfej, Herf, Ain Bagra et chadjeret el-dhab, en langues berbères : kramoch, Tahtit et Aktkal, et en Targui : Akadkad (Halimi, 1997 ; IUCN, 2005 ; Qadah, 2013)

c. Ecologie et répartition géographique

Cette plante vivace à longue vie accepte une grande variété de conditions de sol. Elle pousse sur des sols graveleux d'oueds, sur les regs environnants (plateaux rocheux parsemés de petits cailloux) et dans les dayas (petites dépressions sablo-argileuses). Il prospère dans des conditions climatiques sévères avec moins de 100 mm précipitations par année (IUCN, 2005).

C'est une plante endémique de Sahara (IUCN, 2005), distribué dans les steppes de l'Afrique du Nord particulièrement en Maroc et Algérie (El Hanbali *et al.*, 2006 ; Hamada et Ladjel, 2015). En Algérie, cette espèce est trouvée dans les régions de Ouargla (Oueld El Had *et al.*, 2003), El Djelfa, Bechar, Naâma (Djellouli, 2013 ; Beddou, 2015 ; Saoud, 2016), El Golia (El Hassany *et al.*, 2004), Ghardaïa (Chehma, 2006) et les monts Tassili (IUCN, 2005).

d. Usage thérapeutique

Elle est largement utilisée en médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies. L'infusion de cette espèce est utilisée pour traiter la diarrhée, les troubles gastro-intestinaux, le diabète et la faiblesse cardiaque (Halimi, 1997 ; Chehma, 2006 ; Azzouz, 2007 ; Djellouli, 2013). Les graines broyées mélangées avec l'huile d'olive, du miel ou des dattes broyées (pour masquer l'amertume) sont excellentes pour le rhume (IUCN, 2005).

Cette espèce peut être utilisée sous forme des suppositoires en mélange avec le nigelle, le cresson et le *Maerua crassifolia* dans le traitement de l'influenza aussi. Cette préparation est déconseillée aux enfants et aux femmes enceintes (IUCN, 2005). D'autre part, l'infusion de la partie aérienne (feuilles et tiges) est utilisée dans le traitement des pathologies broncho-pulmonaires (Maiza *et al.*, 1993 *In* Beddou, 2015). En plus, cette espèce est considérée comme bon pâturage, en particulier lorsqu'elle est à la floraison, car elle améliore la performance zootechnique et favorise la croissance. Elle est considérée par les bergers comme tonique et stimulant (IUCN, 2005). Azzouz (2007) a signalé également l'utilisation et l'efficacité d'*Anvillea radiata* dans le traitement de piqûre de scorpion.

e. Récolte

La récolte du matériel végétal (partie aérienne) a été effectuée durant le mois d'avril 2017 dans la région d'El Guerrara. L'identification botanique d'*Anvillea radiata* est faite en utilisant : *Flore et végétation du Sahara* (Ozenda, 2004).

f. Séchage et broyage

Le matériel végétal fraîchement collecté a été séché à l'air libre et à l'abri de soleil et d'humidité pendant trois semaines, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules et de garder toutes les propriétés thérapeutiques. Puis, ce matériel a été broyé à l'aide d'un broyeur électrique pour obtenir une poudre fine. Cette poudre ainsi récupérée a été conservées dans des flacons en verre, en vue de procéder aux différentes manipulations.

I.1.2. Souches bactériennes testées

Pour évaluer l'activité antibactérienne des différents extraits de la plante, trois souches bactériennes sont testés : *E. coli* (ATCC.25922), *S. aureus* (ATCC.25923) et *P. aeruginosa* (ATCC.27853) ont été fournies par le laboratoire d'analyses médicales d'hôpital de Metlili (Ghardaïa).

I.2. Méthodes

I.2.1. Extraction

L'extraction des principes actifs est effectuée par macération. Elle consiste à laisser le matériel végétal en contact prolongé avec le solvant. Quatre solvants de polarité différente sont

utilisés pour l'extraction, qui sont le méthanol, le n-butanol, l'acétate d'éthyle et le dichlorométhane. Une quantité de 10 g du matériel végétal (MV) est mise en contact de façon discontinue avec ces solvants à un rapport solide/liquide de 1/10 : p/v pendant 24 heures.

Après filtration sur papier Whatmann N°1, les extraits obtenus sont concentrés par le rotavapor (Heidolph) aux températures 40 °C, 65 °C, 35 °C et 35 °C pour le méthanol, le n-butanol, l'acétate d'éthyle et le dichlorométhane respectivement. Les extraits concentrés sont conservés à +4 °C jusqu'à leur utilisation.

I.2.2. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement de l'extrait brut est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenu et la masse de MV. Il est calculé via l'équation suivant :

$$\mathbf{R\ (\%) = (PSe / PSmv) * 100}$$

R (%) : Rendement d'extraction en (%)

PSe : Poids sec d'extrait (g)

PSmv : Poids sec de matériel végétal (g)

I.2.3. Analyses chimiques

I.2.3.1. Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique est un ensemble des tests qui consistent à mettre en évidence la présence ou l'absence des différentes classes des métabolites en se basant sur les propriétés physico-chimiques de ces métabolites (Annexe 1). Le tableau 1 illustre les différents groupes chimiques recherchés et les réactifs spécifiques utilisés ainsi que les résultats positifs.

Tableau 1 : Différents tests de criblage phytochimique

Groupes chimiques	Réactifs et résultats positifs
Tanins	-Galliques : FeCl_3 → Coloration bleue-noire/ bleue-verte (Trease et Evans, 1987). -Catéchiqes : Réactif de Stiasny → Précipité de couleur rose claire.
Flavonoïdes	-Anthocyanes : $\text{HCl-NH}_4\text{OH}$ → Couleur rouge-bleue. -Flavonoïdes libres : Réaction à la cyanidine → Couleur rose/rouge. -Leucoanthocyanes/ Catéchols : Réaction à la cyanidine sans Mg → Couleur rouge/brune (Mibindzou Mouellet, 2004).
Coumarines	-NaOH (10%) → Couleur jaune (Diallo, 2000).
Quinones libres	-NaOH (1%) → Couleur vire au jaune, rouge ou violet (Dohou, 2004).
Alcaloïdes	-Méthode 1 : Réactif de Mayer → Précipité brun/blanc. -Méthode 2 : Réactif de Wagner → Précipité blanc/brun (Benzahi, 2001 ; Chaouch, 2001).
Terpènoïdes	-Méthode 1 : Test de Libermann-Burchard → Couleur mauve/violette. -Méthode 2 : Test de Slakowski → Interphase marron (Kablan <i>et al.</i> , 2008).
Stéroïdes	-Anhydride acétique- H_2SO_4 → couleur violette vire au bleu puis vert (Harborne, 1998).
Saponosides	-Détermination de l'indice de mousse (Im^*) : test positif si $\text{Im} > 100$ (Dohou <i>et al.</i> , 2003).
Composés réducteurs	-Réactif de Fehling → Précipité rouge brique (Trease et Evans, 1987)

Im^* : est le degré de dilution d'un décocté aqueux de la drogue végétale qui, dans les conditions déterminées, donne une mousse persistante

I.2.3.2. Quantification de certaines classes des composés phénoliques

a. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été fait par la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par Singleton et Rossi (1965). Ce réactif est formé d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_4$) et d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) qui est réduits par l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_3) (Saoud, 2016).

Chaque extrait (40 μl) ou l'acide gallique (0-800 $\mu\text{g/ml}$) est mélangé avec 1,8 ml de réactif Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois). Après un repos de 5 min, 1,2 ml de la solution de

Na_2CO_3 (7,5 %) est ajouté au mélange. Après une homogénéisation vigoureuse puis un repos de 60 min à l'obscurité, à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 765 nm par un spectrophotomètre UV-Visible. Les résultats sont exprimés en mg en équivalent d'acide gallique EAG/g de poids sec (PS) de matériel végétal (Shui et Leong, 2006).

b. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes est effectuée selon la méthode de Kim *et al.* (2003). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium (AlCl_3) et la soude (NaOH), entraînant ainsi la formation d'un complexe rose qui absorbe à 510 nm (Beddou, 2015).

Après la dilution quatre fois de 1 ml de l'extrait, 0,3 ml de solution de nitrite de sodium NaNO_2 (5%) est ajouté. Après 5 min, 0,3 ml de solution d' AlCl_3 (10%) est ajouté. Le mélange est laissé au repos pendant 5 min, puis 2 ml de solution de NaOH (1 M) sont additionnés. Le volume de ce mélange est complété à 10 ml avec de l'eau distillée. Après agitation, l'absorbance est mesurée immédiatement. La gamme étalon est préparée avec la rutine (0,05-0,5 mg/ml) et les résultats sont exprimés en mg équivalent de rutine ER/g de poids sec de matériel végétal.

c. Dosage des acides phénols

L'estimation des acides-phénols est effectuée selon la méthode d'Arnov (Szafer-Hadjrych, 2004). Un volume de 1 ml d'échantillon est mélangé à 5 ml de l'eau distillée, puis 1 ml d' HCl (0,5 M), 1 ml de réactif d'Arnov (solution aqueuse de molybdate de sodium 10 (p/v) et nitrite de sodium 10% (p/v)) et 1 ml d'hydroxyde de sodium (1 M) ont été additionnés. Le volume du mélange réactionnel est complété à 10 ml avec de l'eau distillée. La lecture de l'absorbance est faite à 490 nm par un spectrophotomètre UV-Visible. L'acide caféique a été utilisé comme référence pour la préparation de la courbe d'étalonnage avec des concentrations allant de 0 à 200 $\mu\text{g/ml}$. Les résultats sont exprimés en μg équivalent d'acide caféique EAC/g de poids sec de matériel végétal.

d. Dosage des tanins condensés

La méthode décrite par Sun *et al.* (1998) est celle de la vanilline- HCl . La méthode consiste à dépolymériser les tanins en milieu acide, et après réaction avec la

vanilline, à les transformer en anthocyanidols de couleur rouge facilement analysables à 510 nm (Beddou, 2015).

A 0,2 ml de l'extrait, 1 ml de la solution fraîchement préparée de vanilline 1% (p/v) en acide acétique glacial et HCl (98 : 2, v/v) est ajouté. Après incubation à 30 °C pendant 20 min, l'absorbance est mesurée. L'étalonnage est réalisé avec de la catéchine (de 0 à 1 mg/ml) et le taux des tanins condensés est calculé en mg en équivalent de catéchine EC/g de poids sec de matériel végétal (Telli, 2017).

I.2.4. Evaluation des activités biologiques

L'efficacité des différents extraits d'*Anvillea rdaiata* est déterminée par l'évaluation de deux activités biologiques ; activité anti-oxydante et activité antibactérienne.

I.2.4.1. Activité anti-oxydante

L'efficacité d'un anti-oxydant peut-être définie comme sa capacité à fixer les radicaux libres, donc à arrêter la propagation de la réaction en chaîne (Boulkroune, 2012). En effet, Les anti-oxydants peuvent réduire les radicaux primaires par deux mécanismes : transfert d'électron ou d'atome d'hydrogène (Belkheiri, 2010).

Dans ce travail, l'activité antioxydante des différents extraits d'*A. radiata* est évaluée en utilisant deux méthodes, à savoir : le test à l'ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), et celui de FRAP (ferric reducing antioxidant power).

a. Test ABTS

En effet, cette méthode joue sur le transfert d'électron et d'atome d'hydrogène à la fois, c'est selon la structure des anti-oxydants ou la nature du milieu réactionnel, où le radical « ABTS^{•+} » doit être généré par une réaction enzymatique ou chimique. Parce que ce test est simple, il est utilisé dans beaucoup de laboratoires. L'ABTS^{•+} réagit rapidement avec les anti-oxydants et peut être utilisé sur une large gamme de pH. Il est soluble dans l'eau et les solvants organiques et n'est pas affecté par la force ionique, il peut donc déterminer la capacité anti-oxydant lipophile et hydrophile (Belkheiri, 2010 ; Beddou, 2015)

Le radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ est formé par arrachement d'un électron à un atome d'azote de l'ABTS. En présence de Trolox (ou d'anti-oxydant donneur de H^\bullet), l'atome d'azote concerné piège un H^\bullet , conduisant à l' ABTS^+ , ce qui entraîne la décoloration de la solution (Figure 3).

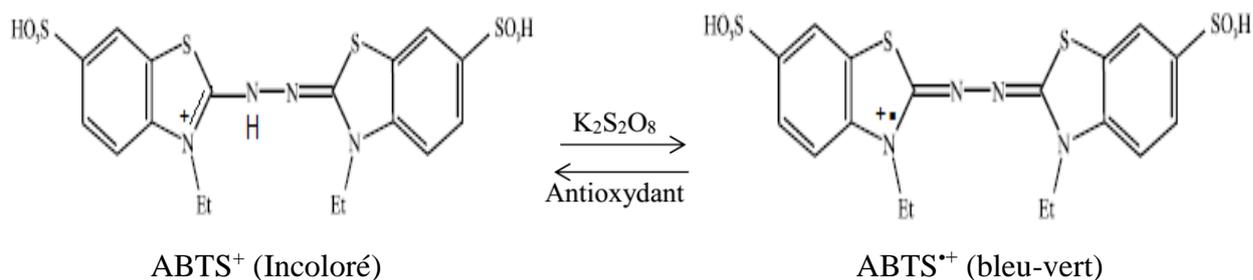


Figure 3 : Mécanisme réactionnel intervenant entre le radical « $\text{ABTS}^{+\bullet}$ » et un antioxydant (Marc *et al.*, 2004).

La génération du radical cation d' $\text{ABTS}^{+\bullet}$ est effectuée par réaction chimique entre une solution d'ABTS 7 (mM) et une solution de persulfate de potassium $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (2,45) mM incubées à 23°C pendant 12 à 16 heures, à l'obscurité. La solution d' $\text{ABTS}^{+\bullet}$ est diluée avec l'éthanol (80%) jusqu'à l'obtention une absorbance égale à $0,700 \pm 0,020$ à 734 nm (Cai *et al.*, 2004). L'inhibition du radical cation d' $\text{ABTS}^{+\bullet}$ par différents extraits d'*A. radiata* est réalisée en mélangeant 3,9 ml de la solution d' $\text{ABTS}^{+\bullet}$ avec 0,1 ml de l'échantillon testé préparé à différentes dilutions varie entre 1/10 à 1/200. Le mélange est agité vigoureusement. Après un repos de 6 min à 23 °C, l'absorbance est mesurée à 734 nm. La courbe d'étalonnage est obtenue en utilisant une solution éthanolique de Trolox (acide carboxylique 6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroman) à différentes concentrations (0 à 500 μM). Les résultats sont exprimés en concentration d'inhibition de 50% (CI_{50}) (Telli, 2017).

b. Test FRAP

Le pouvoir réducteur est la capacité qu'a un extrait à donner un électron et à réduire le fer (Boulkroune, 2012). C'est un test direct, rapide et reproductible, utilisé pour mesurer le pouvoir anti-oxydants non enzymatiques (Benzie et Strain, 1996 ; Saoud, 2016).

La présence des réductants dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+} /TPTZ à la forme « ferreux ». Par conséquent, La quantité de Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu-vert dans le milieu réactionnel à 593 nm. En d'autre terme, le système FeCl_3 /TPTZ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination des concentrations des polyphénols, qui participent à la réaction redox (Figure 4)

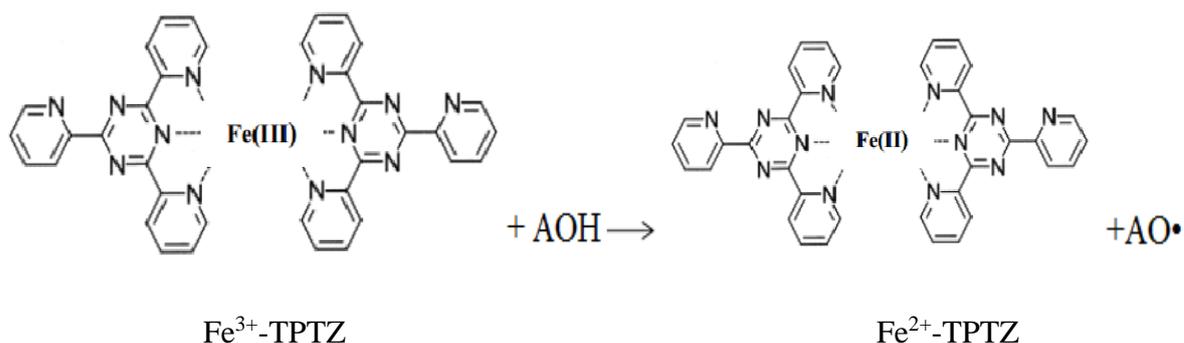


Figure 4 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique $\text{Fe}^{3+}\text{-TPTZ}$ et un anti-oxydant (AOH) (Djahra, 2014).

En utilisant la méthode décrite par Benzie et Strain (1996) avec de légères modifications (Jaitak *et al.*, 2010), le réactif FRAP est préparé à partir de tampon acétate (0,3 M, pH 3,6), de TPTZ 10 mM en solution dans de l'HCl 40 mM et d'une solution de FeCl_3 (20 mM) en proportion de 10 : 1 : 1 (v/v) respectivement. Un volume de 50 μl des extraits de différentes concentrations (1/50 à 1/400) sont ajoutés à 1,5 ml de réactif FRAP. L'absorbance du mélange réactionnel est ensuite mesurée après 4 min par rapport à l'eau distillée. Le Trolox a été utilisé comme standard (0 à 800 μM) et les résultats sont exprimés concentration d'inhibition de 50% (CI_{50}) (Telli, 2017).

I.2.4.2. Activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne est faite par deux méthodes, une qualitative (diffusion sur milieu gélosé) est basée sur la mesure du diamètre de la zone d'inhibition et l'autre quantitative (micro-dilution) permet la détermination de la CMI (concentration minimale inhibitrice).

Une pré-culture des souches est préparée afin d'obtenir une phase exponentielle de croissance. La turbidité est ensuite ajustée par spectrophotomètre à 0,5 McFarland, ce qui correspond à $1,5 \times 10^8$ UFC/ml ($\text{DO}=0,08$ à $0,1$ à 625 nm).

a. Méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé

La surface de l'agar est inoculée avec l'inoculum normalisé de microorganisme testé. Une fois que les disques chargés en quantité bien déterminée de l'extrait sont déposés sur la surface de gélose inoculée, les boîtes Petri sont incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Le diamètre de chaque zone d'inhibition est mesuré en mm (NCCLS, 2004a). Des antibiotiques ont

été utilisés comme témoin positif : acide nalidixique (AN), amoxicilline (AX) et ampicilline (AMP) et gentamycine (CN). Le résultat peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches (Ponce *et al.*, 2003).

- Non sensible ou résistante : diamètre < 8mm
- Sensible : diamètre compris entre 9 à 14 mm
- Très sensible : diamètre compris entre 15 à 19 mm
- Extrêmement sensible : diamètre > 20 mm

b. Méthode de micro-dilution en milieu liquide

L'iodonitrotétrazolium chloride (INT) est un indicateur de la croissance microbienne après sa réduction en formazane de couleur rouge rosé. Ce test est réalisé en utilisant une microplaque de 96 puits selon la méthode décrite par Perumal *et al.* (2012). Tous les puits sont remplis avec 100 µl de bouillon de Muller Hinton stérile. Un volume de 50 µl de la gamme de dilution de l'extrait testé (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32) est ajouté dans les puits des lignes B jusqu'à G. Les colonnes de 1 à 4 sont utilisées pour les souches *P. aeruginosa*, les suites pour *S. aureus* et les restes pour *E. coli*. Les puits de la ligne H ont servi pour les témoins positifs (Gentamycine de 5 mg/ml). La rangée A ne renferme aucun extrait ni agent antimicrobien. Enfin, 100 µl de la suspension bactérienne contenant 10⁸ UFC/ml sont additionnés à tous les puits et bien mélangés. Les microplaques sont incubées à 37 °C pendant 24 heures. La CMI est détectée après l'ajout de 50 µl d'une solution d'INT (0,2 mg/ml) à tous les puits et incubés à 37 °C pendant 30 min. La croissance bactérienne est déterminée en observant le changement de la couleur d'INT (rouge rosée de formazane quand il y a croissance et une solution claire et quand il n'y a pas de croissance). (NCCLS, 2004b ; Perumal *et al.*, 2012 ; SFM, 2014 ; Telli, 2017). Hamada et Ladjel (2015) ont proposé une classification de l'extrait de plante sur la base de leurs valeurs de CMI :

Forte inhibition : CMI < 500 µg / ml

Inhibition modérée : 600 µg / ml < CMI < 1500 µg / ml

Faible inhibition : CMI > 1600 µg / ml.

I.2.4. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne ± écart type de trois répliques analytiques. L'ANOVA a été réalisée pour évaluer la variabilité entre les paramètres étudiés. La régression linéaire a été utilisée comme model afin de déterminer CI₅₀. Le coefficient de

corrélation de Person a été calculé pour déterminer la corrélation entre les méthodes de l'activité anti-oxydante et l'influence de différents solvants. Toutes les analyses ont été réalisées avec XLSTAT 2009.

Chapitre II :
Résultats et discussion

II.1. Rendement d'extraction

Parmi les différentes étapes que constituent l'analyse et l'identification des molécules bioactives, l'étape d'extraction, qui a pour but de la désorption des molécules d'intérêt des sites actifs de la matrice végétale, est primordiale puisqu'elle déterminera la nature et la quantité des molécules extraites et par conséquent le succès des étapes suivantes (Michel, 2011).

Les rendements des différents extraits d'*Anvillea radiata* sont calculés et les résultats sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 1 : Résultats de rendements d'extraction différents extraits des d'*A. radiata*.

Extraits	Poids sec de l'extrait (g)	Rendement (%)
MéOH	3,35	33,5
BuOH	2,55	25,5
AE	1,45	14,5
DCM	4,15	41,5

Il ressort de ces résultats que l'extrait DCM a le rendement le plus élevé (41,5%) par rapport au poids total de plante sèche, suivi par l'extrait méthanolique (33,5%) et butanolique (22,5%). Le rendement le plus faible est enregistré pour l'extrait d'AE (14,5%).

L'utilisation des solvants de différente polarité permet de séparer les composés selon leur degré de solubilité dans le solvant, c'est ce qu'on appelle par le proverbe "qui se ressemble s'assemble". Donc, tant que le dichlorométhane est un solvant apolaire, on estime que la plante est plus riche en matières grasses en comparaison avec les résultats obtenus avec les solvants polaires (MéOH et BuOH) et moyennement polaire (AE).

Plusieurs méthodes d'extractions ont été utilisées sur différentes parties de cette espèce. Toutefois, il est difficile de comparer les résultats du rendement avec ceux de la bibliographie (Mohammedi, 2006 *In* Baba Ouyoub, 2017), car le rendement n'est que relatif et semble être lié à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de de la récolte et de stockage ainsi qu'aux méthodes d'extraction appliquées (Saoud, 2016). D'autres facteurs peuvent avoir une influence sur le rendement d'extraction, tel que le pH, la température, le ratio solide/liquide, et le nombre et l'intervalle de temps des étapes d'extraction individuelles (Macheix *et al.*, 2005).

Dans la présente étude, la méthode utilisée est la macération qui a été effectuée durant trois jours au total, permet d'extraire le maximum des composés bioactives. Mais, il a pu être démontré que des temps plus longs d'extraction n'amélioreraient pas forcément le rendement d'extraction (Michel, 2011).

L'étude réalisée sur *Anvillea radiata* par Beddou (2015) a montré une grande variabilité de rendement d'extraction en fonction de l'organe utilisé. Cette étude a aussi montré que le rendement d'extraction de l'eau chaude est plus élevé à celui de l'extrait hydrométhanolique

De même, Telli (2017) a trouvé que l'infusion qui donne le rendement le plus élevé pour la partie aérienne d'*A. radiata*. Cela peut s'expliquer par le simple fait que l'eau est un solvant fortement polaire connu pour extraire une large gamme de molécules dont une quantité importante de composés non phénoliques comme les glucides et les protéines.

II.2. Criblage phytochimique

La recherche des principes actifs extraits des plantes est d'une importance capitale car elle a permis la mise au point de médicaments essentiels (Chevallier, 2001). Dans ce but, on a effectué un criblage phytochimique par la mise en place d'un ensemble de réactions de caractérisation de différents composés chimiques à savoir : les composés phénoliques (tanins, flavonoïdes, coumarines et quinones libres), les composés terpéniques (terpénoïdes, stéroïdes et saponines) et les composés azotés (alcaloïdes).

Les tests ont été réalisés sur les différents extraits préparés à partir de la partie aérienne d'*A. radiata* en utilisant des solvants de polarité différente et des réactifs spécifiques de révélation. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 3 et exprimés selon le type de réaction suivant, qui sont en relation avec l'intensité du précipité ou de coloration, cela est proportionnelle à la quantité de la substance recherchée :

+++ : Présence importante. ++ : Présence moyenne. + : Présence faible et (-) : Absence

Tableau 2 : Résultats de criblage phytochimique des différents extraits d'*A. radiata*.

Composés	MéOH	BuOH	AE	DCM
Tanins	+++ Noirâtre	++	+++	++
	Verdâtre			
	(-)	(-)	(-)	(-)
Flavonoïdes	(-)	(-)	(-)	(-)
	+++ (Flavone) Rose orangée	(-)	(-)	(-)
	+++ (Catéchol) Brune	(-)	(-)	(-)
Coumarines	+++ Jaune	(-)	++ Vert-jaune	++
Quinones libres	+++ Jaune	(-)	(-)	++ Vert-jaune
Alcaloïdes	+++	+++	+++	+++
	Précipité brun			
	+++ Précipité blanc	+++ Précipité blanc-brun	+++ Précipité gris	+++ brun-
Terpènoïdes	(-)	(-)	(-)	(-)
	++	++	++	++
Interphase marron				
Stéroïdes	(-)	++	++	++
Saponosides	+++ Im > 100 dans plusieurs tubes (Annexe2)			
Composés réducteurs	(-)	(-)	(-)	(-)

La recherche des tanins catéchiques, des anthocyanes et des composés réducteurs s'est montrée négative dans tous les échantillons analysés. Mais celle des tanins galliques, flavonoïdes libres (flavones), catéchol, coumarines et quinones libres, alcaloïdes, terpènoïdes, stéroïdes et saponines, a été positive avec des intensités variables.

Il est à noter que les flavones et les catéchols sont présents en forte quantité que dans l'extrait méthanolique mais sont absents dans les autres extraits. Les coumarines sont totalement absentes dans l'extrait butanolique. De même, les quinones libres sont négativement caractérisées dans l'extraits butanolique et d'AE. Pour les stéroïdes sont ainsi absence dans l'extrait méthanolique. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Djellouli *et al.* (2013) et Saoud (2016).

La présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques hydroxylés chez tous les composés phénoliques est responsable de certaines propriétés communes utilisées pour extraire à partir du matériel végétal. Cependant, il faut noter que ces propriétés peuvent s'exprimer différemment selon la complexité de la molécule concernée, et le nombre de groupement hydroxyles portés par chacun des cycles benzéniques (Macheix *et al.*, 2005). Par conséquent, il est très difficile de développer un procédé d'extraction approprié à l'extraction de tous les composés phénoliques de la plante (Garcia-Salas *et al.*, 2010).

Nombreux sont les auteurs qui ont critiqué l'influence des méthodes de caractérisation et les conditions d'extraction des composés chimiques. Pour les anthocyanidines, le méthanol acidifié (1% HCl) et l'acétone (70%) sont les solvants les plus fréquemment utilisés (Collin et Crouzet, 2011). À l'heure actuelle, Un rapport de 70% de méthanol est utilisé généralement dans l'extraction des flavonoïdes (catéchines ou épicatechines), les acides-phénols et leurs dérivés et plusieurs autres sous-groupes des flavonoïdes (flavanones, flavones, flavone-glycosides, méthoxyflavones et flavones dimères ...) (Escribano-Bailón et Santos-Buelga, 2003 In Beddou, 2015 ; Boulkroune, 2012).

D'autre part, les solvants apolaires sont par contre recommandés pour récupérer sélectivement les acides tanniques de haut poids moléculaire. C'est ainsi qu'en utilisant l'acétate d'éthyle, il est possible de concentrer un extrait de gallotannins à raison de plus de 50% avec les fractions contenant plus de sept unités galloyles (Tian *et al.*, 2009 In Collin et Crouzet, 2011).

La nature des principes chimiques mis en évidence par le criblage phytochimique laisse prévoir des activités pharmacologiques intéressantes de la plante étudiée. La détermination en détail de l'action d'une plante est très difficile, sinon impossible - même si son effet médical est, en revanche, bien connu. L'étude pharmacologique des plantes entières indique qu'elles fonctionnent comme un puzzle incomplet. En outre, bien qu'il soit utile de connaître les principes actifs d'une plante, cette information peut être trompeuse : ainsi, la rhubarbe de Chine (*Rheum palmatum*), dont l'action irritante des dérivés anthracéniques sur la paroi intestinale stimule les selles, est fréquemment employée comme purgatif. Mais elle n'est efficace qu'à hautes doses. A petites doses, d'autres de ses constituants comme les tanins ont un effet plutôt astringent sur les muqueuses intestinales. La rhubarbe de Chine produit donc des effets contradictoires selon la quantité absorbée : elle est laxative à des doses modérées ou importantes, antidiarrhéique à de faibles doses.

Cet exemple démontre que l'expérience du praticien combinée à celle du patient est souvent le guide le plus sûr pour connaître l'effet thérapeutique des plantes entières ; ensuite, que la valeur d'une plante médicinale ne peut être limitée à la liste de ses principes actifs (Chevallier, 2001). En plus, Le totum de plante permet d'utiliser des doses moindres qu'avec un principe actif isolé pour un même niveau d'activité, évitant ainsi les effets secondaires spécifiques des fortes doses (Carillon, 2009).

Mis à part les coumarines et les quinones, le reste des composés (tanins, flavonoïdes, stéroïdes et saponines et des alcaloïdes) sont conformes à ceux des travaux de Moghtet (2017). Egalement, Beddou (2015) a signalé l'absence des composés réducteurs, des coumarines et des dérivés quinoniques et la présence des restes composés dans les différentes parties de la plante. Par ailleurs, les tests phytochimiques réalisés par Telli (2017), a montré que la partie aérienne de la plante est riche en tanins, flavonoïdes, alcaloïdes, stéroïdes, terpénoïdes et saponines.

II.3. Quantification de certaines classes phénoliques

Les différents extraits ont été analysés quantitativement par spectrophotomètre UV-visible pour leur contenu en composés phénoliques qui sont constitués de trois grandes catégories : les acides phénols, les flavonoïdes et les tanins (Ba *et al.*, 2009). La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés anti-oxydantes et antibactériennes des plantes leur sont attribués.

Des droites d'étalonnages ont été tracées pour cet objectif, qui sont réalisées avec des solutions d'étalons à différentes concentrations (Annexe 3. 4. 5. 6). Les quantités des composés phénoliques ont été rapportées en milligramme/microgramme d'équivalents de l'étalon utilisé par gramme d'extrait.

II.3.1. Teneur en polyphénols totaux

Les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits d'*A. radiata* sont présentées dans la figure 5, exprimés en terme d'équivalents acide gallique.

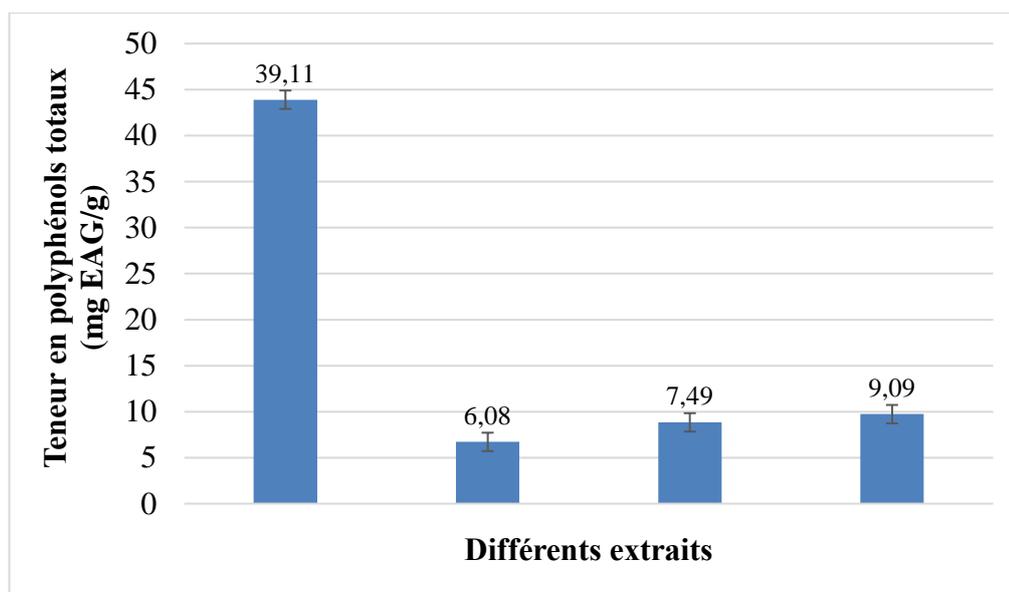


Figure 5 : Teneur en polyphénols totaux des différents extraits d'*A. radiata*.

L'examen de ces résultats montre que les teneurs en polyphénols totaux varient considérablement entre les différents extraits et en relation étroite avec la nature du solvant d'extraction utilisé. La teneur la plus élevée est enregistré dans l'extrait MéOH, elle est de l'ordre de $39,11 \pm 9,52$ mg EAG/g de matière végétale sèche. Les autres extraits ont des teneurs très faibles en comparaison avec l'extrait méthanolique allant de $9,09 \pm 1,44$ mg EAG/g pour l'extrait DCM, à $7,49 \pm 2,37$ mg EAG/g pour l'extrait AE. Le taux le plus faible des polyphénols totaux est enregistré pour l'extrait BuOH ($6,08 \pm 1,39$ mg EAG/g).

L'analyse de variance effectuée a montré qu'il y a des différences hautement significatives entre les différents extraits ($P < 0,05$) (Annexe 9).

La partie utilisée dans cette étude est la partie aérienne (feuilles et tiges). La richesse de cette partie en composés phénoliques peut être expliquée par le fait que ces composés interviennent dans la protection de cette partie vis-à-vis différents types de stress (lumineux, hydrique, thermique, salin. etc.) car cette partie est le siège de la photosynthèse (Telli, 2017).

Par ailleurs, les conditions d'extraction et les solvants utilisés ont des effets remarquables sur le taux des composés phénoliques extraits (Telli, 2017). Le taux très élevé des polyphénols dans l'extrait méthanolique peut être dû à leur grande solubilité dans les solvants polaires par l'augmentation de la basicité et de l'ionisation des polyphénols (formation d'un ion phénolate). Alors que les taux faibles qui présentent dans les extraits apolaires peuvent être dus à l'affaiblissement des liaisons d'hydrogène dans les extraits (Baba Ouyoub, 2017).

En réalité, il n'existe aucune méthode permettant de doser de manière satisfaisante et simultanée l'ensemble des composés phénoliques présents dans un extrait végétal non purifié. Néanmoins, une estimation rapide (et souvent très fortement sur évaluée) de la teneur en phénols totaux peut être obtenue par différentes méthodes, la plus utilisée est celui de Folin-Ciocalteu (Aitfella, 2010) qui, en milieu alcalin, se réduit en mélange d'oxyde bleus de tungstène et de molybdène (Benkhedimallah et Kismon, 2014 ; Beddou, 2015).

Dans notre étude, le choix du meilleur solvant ne se fait pas à partir du dosage de phénols totaux, car cette méthode est peu spécifique malgré qu'elle est simple à mettre en œuvre, puisque beaucoup d'autres composés réducteurs peuvent interférer lors de l'extraction, telles que les sucres (glucose, fructose ...), les acides aminés tyrosines et tryptophane des protéines, l'acide ascorbique, l'acide tartrique et les sulfites et les pigments (Macheix *et al.*, 2005 ; Boizot et Charpentier, 2006).

En termes de comparaison, ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus par Beddou (2015) avec des valeurs allant de $95,513 \pm 7,908$ mg EAG/g jusqu'à $198,951 \pm 21,505$ mg EAG/g pour les différents organes de la plante de l'extrait hydrométhanolique (70%). Mais, Djeridane *et al.* (2010) ont montré que l'extrait méthanolique a une teneur en composés phénoliques égale à 14,36 mg EAG/g de poids sec (Telli, 2017). On constate également que nos résultats sont proches aux résultats obtenus par Telli (2017) pour les extraits issus des macérations aqueuse et acide.

Saoud (2016) a révélé que les composés polyphénoliques sont abondants dans la partie aérienne de l'*A. radiata*. Cette abondance est caractéristique de la famille des Asteraceae. Cela pourrait être relié aux facteurs extrinsèques (tels que des facteurs géographiques et climatiques, sécheresse, nature du sol, pollution, agressions et maladies) et les facteurs intrinsèque (génétiques), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires comme les polyphénols (Falleh *et al.*, 2008). Mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une influence (Djenidi, 2012 ; Baba Ouyoub, 2017).

Boulkroune (2012) a noté que les teneurs obtenues avec les solvants purs sont faibles par rapport à celles obtenues avec les solvants dilués, qui pourrait s'expliquer par la faible solubilité des composés phénoliques dans les solvants purs.

II.3.2. Teneur en flavonoïdes

Les taux des flavonoïdes des extraits ont été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage de la rutine, exprimant en milligramme équivalent de rutine par gramme de matière sèche (mg ER/g). Les résultats de la quantification des flavonoïdes des différents extraits sont représentés dans la figure 6.

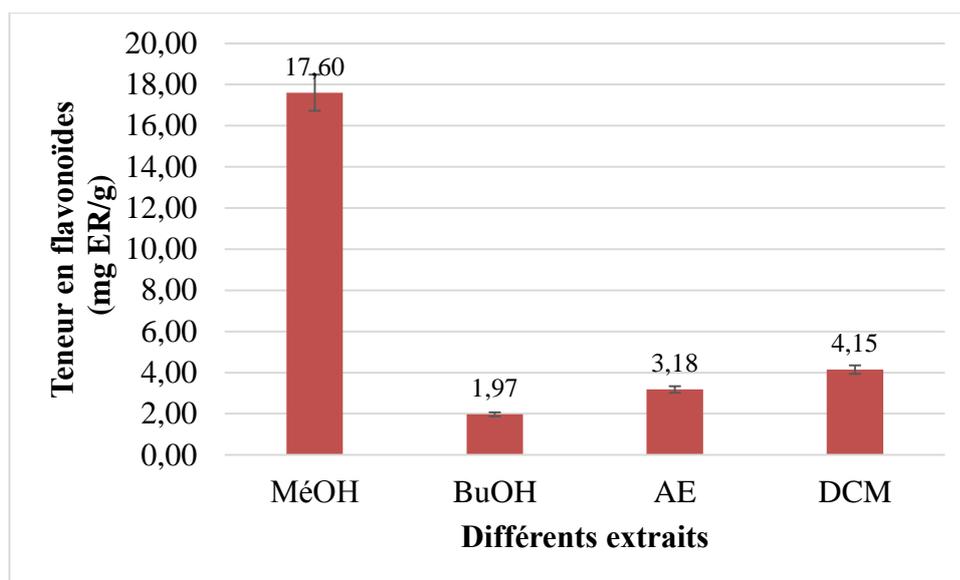


Figure 6 : Teneur en flavonoïdes des différents extraits d'*A. radiata*.

D'après ces résultats, on constate une variabilité des teneurs en flavonoïdes qui toujours dépendent de la polarité du solvant d'extraction, et que cette teneur suit la même évolution que les taux des polyphénols totaux. En effet, les teneurs les plus élevées sont obtenues avec l'extrait méthanolique, qui a un taux égal à $17,60 \pm 1,78$ mg ER/g, suivi par ceux d'extrait DCM d'extrait AE qui sont de l'ordre de $4,15 \pm 0,74$ mg ER/g et $3,18 \pm 0,86$ mg ER/g respectivement. La teneur la plus faible est enregistrée pour l'extrait BuOH, qui est égale à $1,97 \pm 0,27$ mg ER/g.

Les analyses statistiques réalisées ont montré qu'il y a des différences significatives ($P \leq 0,05$) en teneur en flavonoïdes entre les différents extraits (Annexe 10).

Nos résultats laissent apparaître que les flavonoïdes représentent environ la moitié de la quantité des polyphénols totaux pour la majorité des extraits investigués. Cela nous guide qu'ils constituent la principale sous classe des composés phénoliques.

Les variations des spectres d'absorption des flavonoïdes sont en fonction des modifications chimiques : hydroxylation, méthylation, glycosylation, condensation avec d'autres

molécules, phénoliques ou non. De plus, les caractéristiques physicochimiques du milieu sont également des causes de modifications profondes des spectres d'absorptions : PH, teneurs en métaux, interférence avec d'autres composés (Aitfella, 2010), et à la solubilité qui dépend non seulement de la polarité du solvant d'extraction mais aussi du nombre et de la position des groupements hydroxyles libres, au poids moléculaire (Telli, 2017) et même du nombre, du type et de la position de la liaison des glucides avec les flavonoïdes (Boukroune, 2012).

La glycosylation des flavonoïdes par exemple, peut changer la polarité de la molécule et joue un rôle très important, en rendant les flavonoïdes moins réactifs, et plus soluble dans l'eau (Ayad, 2008), alors que les taux très élevés dans l'extrait méthanolique peut être due à la présence des flavonols car ce dernière présente d'un groupement OH dans la position C3 (Baba Ouyoub, 2017), ou à la présence de l'isoflavonoïdes glycosides et anthocyanidines glucosides à polyhydroxy (cyanidine-3-glucoside) (Ayad, 2008).

Le taux faible des flavonoïdes dans l'extrait AE peuvent être dus à la présence des flavonoïdes aglycones comme les anthocyanidines aglycones car l'AE est utilisé pour extraire des aglycones de polarité moyenne (Ayad 2008 ; Boudjellal, 2009). D'autre étude montre que les solvants les plus apolaires conviennent à l'extraction de certains flavonoïdes apolaires, par exemple ceux liés aux stérols, ou ceux présents dans les exsudats de bourgeons ou sur les tissus externes foliaires (Aitfella, 2010)

Ces résultats sont en concordance avec les travaux de Telli (2017) pour les extraits issus de la macération aqueuse et la macération acide. Et supérieurs à ceux trouvés par Saoud (2016) pour l'extrait hydrométhanolique ($14,91 \pm 0,5$ mg d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait). Ces variations sont probablement liées à un facteur écologique qui concerne, le sol, le climat et les périodes de récolte.

II.3.3. Teneur en acides phénols

La quantité des acides phénols dans les différentes préparations est évaluée et les résultats exprimés en équivalents d'acide caféique à l'aide d'une courbe étalon, sont présentés dans la figure 7.

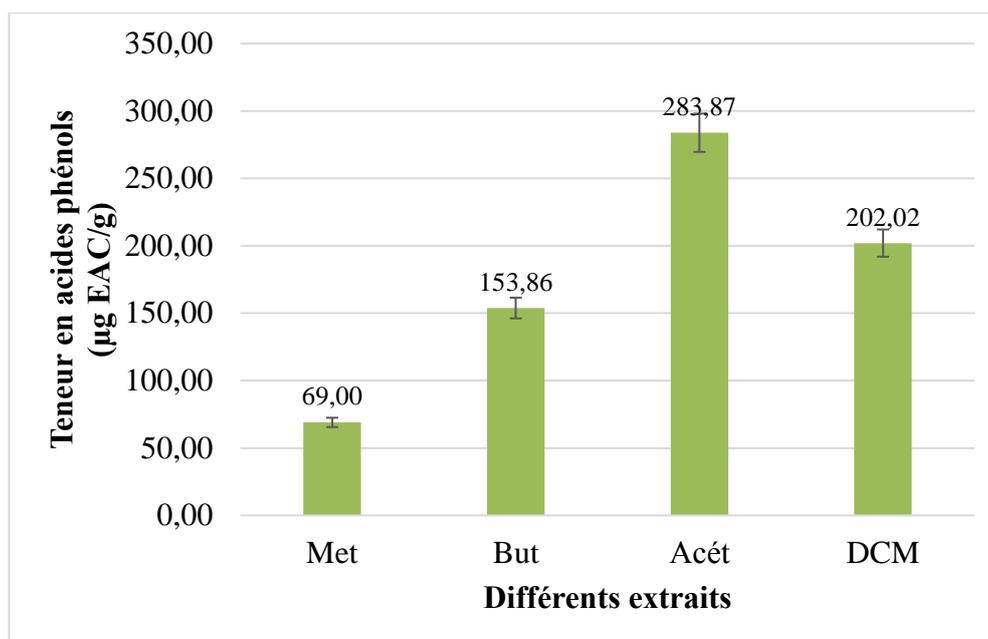


Figure 7 : Teneur en acides phénols des différents extraits d'*A. radiata*.

Les résultats présentés dans la figure 7 montrent bien que ces composés sont présents dans tous les extraits avec des concentrations variantes selon le solvant utilisé pour l'extraction. L'extrait AE possède la teneur la plus importante en acides phénols avec un taux de $283,87 \pm 30,54$ µg EAC/g, suivi par celles des extraits de DCM ($202,02 \pm 49,09$ µg EAC/g) et BuOH ($153,86 \pm 25,27$ µg EAC/g), tandis que l'extrait MéOH a la teneur la plus faible en acides phénols, qui est de l'ordre de $69 \pm 3,14$ µg EAC/g.

Les analyses de variance de ces résultats montrent que les extraits ont des effets pas significatifs sur le taux des acides phénols des différents extraits ($P > 0,05$) (Annexe 11).

La solubilité des acides phénols dépend de leur nature chimique dans la plante, qui varie de composés simples à fortement polymérisés. Cette diversité structurale est responsable de la grande variabilité des propriétés physico-chimiques influençant sur l'extraction (Telli, 2017).

Les taux faibles enregistrés dans l'extrait méthanolique et butanolique peuvent être dus à l'estérification de différentes fonctions alcools des acides phénols ce qui diminue leur polarité. Bruneton (2009) a confirmé que l'extraction de ces composés, conduite de préférence sur du matériel frais, est généralement obtenue à l'aide d'un alcool (méthanol) ou d'acétate d'éthyle voire, pour extraire moins de substances lipophiles et éviter une estérification partielle des acides phénols, avec une solution hydro-alcoolique.

En plus, les acides phénols extrêmement polaires (acides benzoïques et cinnamique) ne peuvent pas être entièrement extraits par ces solvants organiques purs. Des mixtures d'alcools-eau ou acétone-eau sont recommandées (Aitfella, 2010 ; Boulkroune, 2012).

Cependant, les acides phénols dérivés de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique peuvent être méthylés (Bruneton, 2009), ce qui conduit à la diminution de la polarité de ces composés, ce qui par conséquent peut justifier la richesse de l'extrait AE.

Nos résultats sont très faibles en comparaison avec celui de Telli (2017) qui a reporté que la teneur en acides phénols pour la décoction d'*A. radiata* a les teneurs les plus importantes ($3016,13 \pm 264,92 \mu\text{g EAC/g}$). Tandis que les extraits de macération acide ont enregistré des valeurs moins de nos résultats. De nombreux chercheurs rapportent la possibilité d'oxydation des composés phénoliques pendant les extractions à long terme qui peuvent mener aux faibles teneurs (Boulkroune, 2012).

II.3.4. Teneur en tanins condensés

La figure 8 présente la variabilité des concentrations des tanins condensés ou proanthocyanidines pour les différents extraits d'*A. radiata*. Les résultats sont exprimés en mg équivalents de catéchine à l'aide d'une courbe étalon :

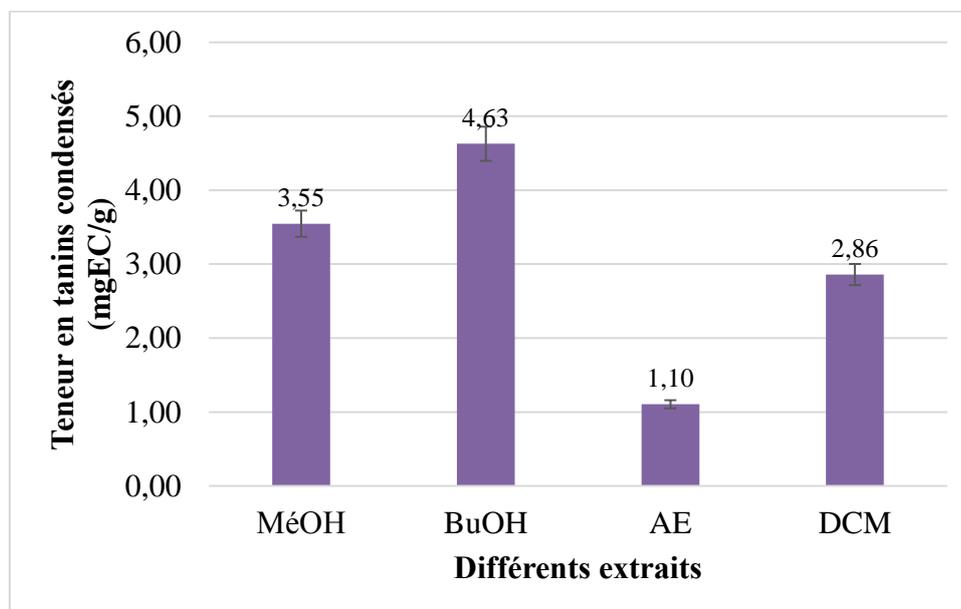


Figure 8 : Teneur en tanins condensés des différents extraits d'*A. radiata*.

Il ressort des résultats présentés dans la figure 8 que l'extrait butanolique a la teneur la plus importante en tanins condensés qui est égale à $4,63 \pm 5,85$ mg EC/g, suivi par les extraits MéOH et DCM qui ont des teneurs de $3,55 \pm 0,33$ mg EC/g et $2,86 \pm 1,74$ mg EC/g respectivement. La concentration la plus faible des tanins condensés est obtenue pour l'extrait AE avec un taux de $1,10 \pm 1,18$ mg EC/g.

Les analyses statistiques réalisées ont montré qu'il y a des différences significatives ($P \leq 0,05$) en teneur en tanins condensés entre les différents extraits (Annexe 12).

Les tanins condensés sont des oligomères ou des polymères de flavane-3-ols (éventuellement de flavane-3,4-diols) dérivés de la (+)-catéchine ou de ses nombreux isomères (Macheix *el al.*, 2005). Selon la nature des constituants impliqués et selon le type de condensation, ils sont des composés plus en moins complexes (Bruneton, 1993). Leur extraction dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé et des auditions de l'extraction.

La solubilité des composés phénoliques est influencée par le type de solvant utilisé et le degré de leurs polymérisations. Cependant, ces derniers sont le plus souvent combinés à d'autres substances (protéines, polysaccharides, terpènes, chlorophylle, lipides, composés inorganiques, ...) (Boulkroune, 2012).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la quantification des tanins condensés, pour le présent travail, on a suivi la méthode de vanilline-HCl qui possède des avantages et des inconvénients. Le cycle A d'anthocyanidines réagit avec un aldéhyde aromatique (vanilline). Cette méthode est rapide mais elle manque de reproductibilité due au type du solvant utilisé, la nature et la concentration de l'acide, le temps de la réaction, la concentration de la vanilline et le type de standard utilisé. Ceci a été signalé par Telli (2017) qui a fait le dosage des tanins condensés par deux méthodes, il s'agit de : méthode de Vanilline-HCl et méthode de butanol-HCl. Les taux les plus élevés des tanins condensés d'*Anvillea radiata* sont obtenus avec la méthode de butanol-HCl dépassant $21,21$ mg EC d/g (Telli, 2017).

Plusieurs facteurs peuvent être affectés l'estimation de la quantité des tanins condensés chez les plantes. La quantité de l'eau dans le mélange réactionnel est critique dans la formation de la couleur rouge. Aussi, le nombre des groupements hydroxyle sur les cycles A et B affecte la longueur d'onde de l'absorbance maximale et le coefficient d'extinction des anthocyanidines (Telli, 2017).

Par traitement acide à chaud, elles se transforment en pigments rougeâtres, et pour cette raison, elles sont dénommées « proanthocyanidines ». (Pascal et Véronique, 2006). Les tanins condensés se dégradent par HCl en milieu alcoolique (Aitfella, 2010 ; Baba Ouyoub, 2017). Par cette réaction qu'on peut justifier la teneur en tanins condensés maximum dans l'extrait BuOH et MéOH. D'autre part, on peut dire que la faible solubilité des tanins condensés dans l'extrait AE due à la présence des liaisons covalents de type C-C entre les unités flavan-3-ols (Baba Ouyoub, 2017).

Selon Bruneton (2009), l'extraction des tanins est, en règle générale, réalisée par un mélange d'eau et d'acétone. Quand le méthanol est utilisé, il est déconseillé d'y ajouter de l'eau. Jerumanis (1969) suspecte une dépolymérisation des proanthocyanidines en présence de méthanol. En outre, le poids moléculaire élevé des tannins condensés les rend solubles dans les solvants moins polaires, qui sont recommandés pour récupérer sélectivement les acides tanniques de haut poids moléculaire (Collin et Crouzet, 2011 ; Boulkroune, 2012). Cela a été confirmé par les travaux de Beddou (2015), où il a constaté que quelque soit l'organe étudié d'*A. radiata*, l'acétone aqueux possède les teneurs les plus élevées en tanins condensés, suivi du méthanol et de l'infusé aqueux.

Au vu des résultats présentés ci-dessus, il ressort que l'extraction des composés phénoliques est une étape cruciale pour la valorisation des principes actifs, qui dépend du solvant d'extraction. Pour cela, la sélection d'un système de solvant approprié reste l'une des étapes les plus importantes dans l'optimisation d'extraction des polyphénols, des flavonoïdes et d'autres composés anti-oxydants (Zhao *et al.*, 2006b In Beddou, 2015).

II.4. Activités biologiques

L'efficacité des différents extraits d'*Anvillea radiata* est déterminée par l'évaluation de deux activités biologiques ; activité anti-oxydante et activité antibactérienne.

II.4.1. Activités anti-oxydantes

L'activité anti-oxydante des différents extraits d'*Anvillea radiata* est évaluée par l'utilisation de deux tests qui sont : ABTS et FRAP.

II.4.1.1. Piégeage du radical-cation ABTS^{•+}

La capacité des différents extraits d'*A. radiata* ainsi que l'antioxydant standard (Trolox) à inhiber le radical-cation ABTS^{•+} est évaluée et les résultats exprimés en CI₅₀ sont présentés dans le tableau 04.

Tableau 3 : Valeurs de CI₅₀ de l'activité anti-oxydante déterminée par le test ABTS des différents extraits d'*A. radiata*.

	MéOH	BuOH	AE	DCM	Trolox
CI ₅₀ (mg/ml)	0,178±0,04	2,301±0,83	1,357±0,29	6,353±1,22	0,39±0,45

La CI₅₀ faible signifie que l'antioxydant est très efficace et puissant dans l'inhibition ou le piégeage du radical. Vu aux résultats illustrés dans le tableau 5, nous constatons que l'activité inhibitrice du radical cation ABTS^{•+} varie considérablement entre les différents extraits. Elle est comprise entre 0,178±0,04 et 6,353±1,22 mg/ml. Parmi les quatre extraits d'*A. radiata* testés, l'extrait MéOH représente une excellente capacité inhibitrice du radical cation ABTS^{•+} avec une CI₅₀ de 0,178±0,04 mg/ml, qui est inférieure à celle de Trolox (0,39±0,45 mg/ml). En ce qui concerne les autres extraits, il est à noter que le potentiel antioxydant est moins important surtout pour les extraits d'AE et de BuOH (CI₅₀ = 1,357±0,29 mg/ml et 2,301±0,83 mg/ml respectivement). Cependant, l'extrait apolaire (DCM) s'avère incapable de libérer facilement des protons, ce qui justifie la valeur élevée de sa CI₅₀.

D'après les résultats de l'analyse de variance (Annexe 13), nous observons des variations hautement significatives (P<0,05) de la capacité anti-radicalaire entre les différents extraits d'*A. radiata*.

Selon la matrice de corrélation entre le pouvoir antioxydant ABTS et les teneurs en composés phénoliques, en calcule le coefficient de corrélation de Pearson (annexe 15-18), révèlent qu'aucune corrélation existe entre ces deux variables.

Les résultats d'analyse phytochimique révèlent que l'activité antioxydante dans les différents solvants ne pas attribuée à sa richesse en composés phénoliques. Ceux-ci peuvent être dus à la présence des autres composés ayant la capacité de donner des électrons, tels que les terpénoïdes (monoterpène et sesquiterpène) (Mohammedi, 2006 *In* Baba Ouyoub, 2017). Une étude faite par

Kang *et al.* (2003) a suggéré que les molécules polaires présentes dans les extraits végétaux contribuent à l'augmentation de l'activité antiradicalaire.

Pour nos extraits, l'absence de la corrélation ne signifie pas forcément que les composés phénoliques ne sont pas participés dans l'inhibition de l'ABTS•+ ou peut être les fonctions hydroxyle donneuses d'électrons sont engagées dans des liaisons glycosidiques (O- glycosides, C-glycoside), ester ou éther. Cependant, dans cette étude, nous n'avons pas pu déterminer les concentrations de ces antioxydants dans nos extraits. Néanmoins, nos résultats démontrent clairement qu'*A. radiata*, possède des propriétés antioxydantes très remarquables.

D'une manière générale, ces résultats sont en accord avec la littérature qui suggère que l'activité anti-oxydante des extraits des végétaux dépend du type du solvant d'extraction et de sa polarité, dont la distribution des substances à activité anti-oxydante entre les différents extraits dépend de polarité des extraits (Baba Ouyoub, 2017 ; Boulkroune, 2012).

Telli (2017), a rapporté que les extraits aqueux (décoctés et infusés) ont montré la grande efficacité antiradicalaire vis-à-vis le radical d'ABTS•+ par rapport les standards utilisés (Trolox et BHT), ce qui est en accord avec les résultats du présent travail. Parallèlement, Beddou (2015) a constaté que l'extrait hydrométhanolique des fleurs est celui qui représente la meilleure capacité à neutraliser le radical ABTS•+ avec un effet antiradicalaire de $0,486 \pm 0,038$ mg/ml moins que l'anti-oxydant de référence (Trolox).

Mais de façon général, les meilleurs résultats sont observés pour la partie aérienne. Ceci peut être dû à l'influence de la répartition des métabolites secondaires dans la plante (aux niveaux tissulaires, niveaux cellulaires et subcellulaires). Les phénols insolubles sont les composants des parois cellulaires, tandis que les composés phénoliques solubles sont cloisonnés dans les vacuoles des cellules végétales. Au niveau tissulaire et les couches externes, les plantes contiennent plus de composés phénoliques que celles situées dans leurs parties intérieures (NACZK et SHAHIDI, 2004 *In* Khenfer, 2016)

Par contre Saoud (2016) a indiqué une excellente activité anti-oxydante de tous les extraits qui sont plus actifs que l'anti-oxydant standard ($0,05 \pm 0,01$ mg/ml), où l'extrait d'acétate d'éthyle était dans la première place, suivi par l'extrait butanolique et méthanolique. L'extrait chloroformique est celui qui a enregistré la moins activité. Cela peut être justifié par la glycosylation des flavonoïdes qui réduit l'activité anti-oxydante de nos extraits, où les fonctions hydroxyle donneuses d'électrons sont engagées dans des liaisons glycosidiques (O- glycosides,

C-glycoside) et même ester ou éther (Baba Ouyoub, 2017 ; Rice-Evans *et al.*, 1996). In Boulkroune, 2012)

Selon Cai *et al.* (2004), il existe une relation entre le pouvoir anti-oxydant et la structure des composés phénoliques (nombre et position des groupements hydroxyles sur le noyau aromatique de la molécule, glycosylation et présence d'autres groupements donneurs de protons).

En effet, Il est difficile d'expliquer la relation existant entre les anti-oxydants et l'activité anti-oxydante d'un végétal en se basant sur la seule analyse quantitative, du fait qu'il existe une relation non seulement avec le taux d'anti-oxydants mais aussi de l'interaction entre eux et avec d'autres constituants, d'où il est important de caractériser ces composés (Boulkroune, 2012 ; Beddou, 2015).

II.4.1.2. Pouvoir réducteur de fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur de fer des différents extraits d'*Anvillea radiata* a été évalué et les résultats, exprimés en CI_{50} , sont illustrés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Valeurs de CI_{50} du test FRAP de différents extraits d'*A. radiata*.

	MéOH	BuOH	AE	DCM	Trolox
CI_{50} (mg/ml)	2,104±0,15	0,461±0,01	0,251±0,02	0,417±0,02	1,271±0,13

Il ressort des résultats regroupés dans le tableau 6 que les extraits d'AE, de DCM et de BuOH présentent un puissant pouvoir réducteur de fer avec des valeurs de CI_{50} allant de 0,417±0,02 mg/ml à 0,461±0,01 mg/ml et qui sont inférieures à celle de l'antioxydant standard ($CI_{50} = 1,271±0,13$ mg/ml). La capacité réductrice de fer la plus faible est enregistrée pour l'extrait méthanolique d'*Anvillea radiata* ($CI_{50} = 2,104±0,15$ mg/ml).

Les résultats de l'analyse de variance ANOVA, montrent que les différents extraits ont un effet pas significatif ($P > 0,05$) de pouvoir réducteur du fer entre les différents extraits (Annexe 14).

La matrice de corrélation entre le pouvoir antioxydant FRAP et les teneurs en composés phénoliques, présenté par le coefficient de corrélation de Pearson, révèle qu'il y a une corrélation

positive entre le test FRAP et les flavonoïdes contenus dans l'extrait DCM (Annexe 18) et négative avec les tanins condensés de l'extrait BuOH (Annexe 16).

Plusieurs études ont montré que les flavonoïdes sont considérablement plus anti-oxydants que la vitamine C et la vitamine E, qui contribuent très probablement à la lutte contre le stress oxydant auquel l'espèce est soumise, en raison de son environnement particulier (Chevallier, 2001 ; Chaabi, 2008).

La corrélation négative enregistré avec les tanins condensés peut être justifié par la liaison des groupements hydroxyles avec des autres molécules, soit par la O-méthoxylation. En effet, la fixation du groupement méthyle, par exemple 4'-O-méthylation de la structure 3',4'-catechol réduit l'activité anti-oxydante (Ayad, 2008), ou par O-glycosylation (glucose, rhamnose, xylose, galactose et arabinose), soit par C-méthylation (Baba Ouyoub, 2017)

L'activité excellente des trois extraits peut être aussi dus à la présence des autres composées ayant la capacité de donner des électrons, tels que les terpénoïdes (monoterpène et sesquiterpène). Ainsi que les coumarines sont capables de piéger les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes, importants dans la prévention de la peroxydation des lipides membranaires, ils ont une activité antiperoxydante (Igor, 2002)

Aussi, malgré les teneurs de nos extraits en composés phénoliques sont moins importantes, ces résultats sont dus à la synergie des composés phénoliques dans les extraits et que l'activité anti-oxydante dépend non seulement de la quantité des composés phénoliques mais aussi de leur qualité (en point de vue structure) (Attou, 2011 ; Belyagoubi, 2012)

Les relations structure-activité anti-oxydante des flavonoïdes et des composés phénoliques ont montré que l'activité anti-oxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation (Attou, 2011), de même le groupe carboxylique augmente légèrement cette activité. La présence d'un ester de groupe carbonyle (acide chlorogénique) améliore l'activité anti-oxydante (Biskup et al., 2013 In Baba Ouyoub, 2017)

Ces résultats sont en accord avec ceux de Bougandoura (2011) qui a constaté que les extraits AE possèdent une bonne action vis-à-vis de Fe^{3+} suivie des extraits méthanoliques et butanoliques, alors que les extraits aqueux ne sont actifs qu'à partir des concentrations élevées. Ainsi que Saoud (2016) est confirmé que l'extrait AE d'*A. radiata* est doté d'une capacité réductrice encourageante, suivi par l'extrait butanolique, méthanolique et dans la dernière classe, l'extrait chloroformique.

De l'autre part, Beddou (2015) a trouvé que l'extrait hydro-méthanolique des fleurs d'*A. radiata* présente le potentiel le plus important même mieux que les extraits aqueux, mais reste tous moins importante que les anti-oxydants standards. Tandis que Telli (2017), a montré que les extraits aqueux sont les meilleurs solvants pour extraire les anti-oxydants réducteurs de fer d'*A. radiata*.

A travers nos recherches bibliographiques et compte tenu de la complexité des processus d'oxydation-réduction avec les types de radicaux libres oxygénés (RLO) et azotés (RLA), comme HO• et ONOO•-, il apparaît clairement qu'une seule méthode n'est pas suffisante pour caractériser le potentiel anti-oxydant d'un échantillon et qu'aucune méthode prise séparément n'est capable de fournir une idée globale du profil anti-oxydant d'un échantillon (Parejo et al., 2002 ; Prior et al., 2005). Il faut donc combiner les réponses obtenues à l'aide de tests différents et complémentaires (Chaabi, 2008 ; Belkheiri, 2010 ; Beddou, 2015). Donc, des études approfondies sont nécessaire pour évaluer le potentiel antianxydant réel d'*A. radiata*.

II.4.2. Activité antibactérienne

Lors de cette étude, on a testé l'action de nos extraits vis-à-vis de trois souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Cela a été réalisé par deux méthodes communément employées (de diffusion et de microdilution).

II.4.2.1. Zone d'inhibition

La figure 9 présente l'effet inhibiteur des différents extraits d'*Anvillea radiata* sur la croissance des souches testées. Les résultats obtenus ont montré que ces extraits ont une activité antibactérienne notable contre les trois bactéries testées.

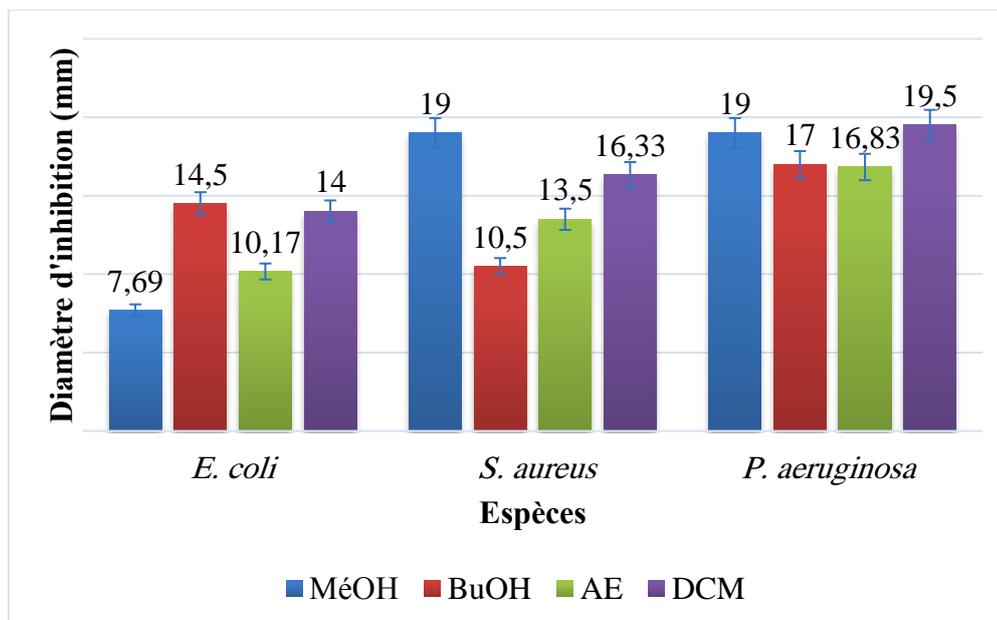


Figure 9 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) de la croissance des souches testées par différents extraits d'*A. radiata*.

Ces résultats révèlent que *P. aeruginosa* est la souche la plus sensible à l'action des différents extraits d'*A. radiata* avec des diamètres d'inhibition allant de 16,83±3,75 mm pour l'extrait AE à 19,50±4,44 mm pour l'extrait DCM. Il apparaît que *S. aureus* est sensible à l'action des extraits de AE (13,5±0,71 mm), DCM (16,33±2,44 mm) et MéOH (19±3 mm) d'*A. radiata*, alors que l'extrait BuOH présente une action faible sur cette souche (10,5±0,71 mm).

Les extraits de MéOH et AE d'*A. radiata* présentent une activité inhibitrice faible sur *E. coli* avec des diamètres de 7,69±1,52 mm et 10,17±1,26 mm respectivement. En présence des extraits de BuOH et DCM d'*A. radiata*, l'inhibition de la croissance d'*E. coli* est plus importante avec des zones d'inhibition de 14,5±0,5 et 14±4 mm respectivement.

Il est à noter que les extraits méthanolique et de DCM sont les plus actifs suivi par les extraits de BuOH et AE.

L'activité des quatre antibiotiques est évaluée sur les souches testées et les résultats sont présentés dans le tableau 6, où les diamètres des zones d'inhibition sont compris entre 6 et 29 mm.

Tableau 6 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des antibiotiques (témoin positif).

Souches	AN	AX	AMP	CN
<i>E. coli</i>	27	10	7	29
<i>S. aureus</i>	7	13	7	20
<i>P. aeruginosa</i>	23	29	6	19

AN : Acide nalidixique, AX : Amoxicilline, AMP : Ampicilline et CN : Gentamycine

Les résultats des antibiotiques standards utilisés dans les mêmes conditions montrent que la plus forte activité a été obtenue par la gentamycine et l'amoxicilline avec des diamètres des zones d'inhibition de croissance de 29 mm, ceux-ci contre *E. coli* et *P. aeruginosa* respectivement. Aussi, l'inactivité de MéOH (témoin négatif) utilisé dans la solubilisation des résidus des extraits est testé (Annexe 19). Où ses résultats n'ont révélé aucune activité inhibitrice.

Plusieurs études ont prouvé que les composés phénoliques existant dans les extraits polaires (selon les études quantitatives préliminaires), agissaient en perturbant les mécanismes enzymatiques impliqués dans la production d'énergie (Djenidi, 2012). Les flavonoïdes et les tanins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis les microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrolases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999). Ils sont même des puissants inhibiteurs *in vitro* de l'ADN gyrase (Djenidi, 2012). Ces molécules sont également responsables de l'inhibition des microbes résistants aux antibiotiques (Boutalbi, 2014).

En outre, l'extraction des principes actifs par un solvant comme le DCM augmente l'activité antibactérienne (Diallo, 2005). L'efficacité de cet extrait dans l'inhibition de la croissance des souches testées peut être due à la présence des terpénoïdes (carvacrol, thymol), des stérols ainsi que des flavonoïdes aglycones.

Chabot *et al.*, (1992) a rapporté que les composés les moins polaires comme les flavonoïdes manquant le groupement hydroxyle sur leur cycle B sont plus actifs vis-à-vis des microorganismes que ceux portant le groupe OH. Par contre, Mori *et al.* (1987) ont trouvé que les flavonoïdes trihydroxylés 3',4',5' sur le cycle B et substitués 3-OH sont nécessaires pour l'activité antimicrobienne.

De plus, Ghédira (1995) a montré qu'un alcaloïde présente une activité antibactérienne significative, sans négliger l'effet synergique des autres molécules à effet antimicrobien (Djemai zoughlache, 2009). Aussi, les quinones sont connues par leur capacité de se complexer de manière irréversible avec des acides aminés nucléophiles dans les protéines, conduisant souvent à l'inactivation de la protéine et à la perte de sa fonction. Pour cette raison, la gamme potentielle d'effets antimicrobiens de quinone est grande. Les cibles probables dans la cellule microbienne sont les adhésines exposées à la surface, les polypeptides de la paroi cellulaire et les enzymes liées à la membrane. Les quinones peuvent également rendre les substrats indisponibles pour le micro-organisme (Cowan, 1991).

Il apparait aussi de nos résultats que les bactéries à Gram+ (*S. aureus*) sont plus sensibles en comparaison avec celles à Gram- (*E. coli*), ce qui peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH et les extraits naturels due à l'absence de la membrane externe (Balentine *et al.*, 2006 *In* Athamena, 2010). En effet, les bactéries à Gram positif sont constituées d'une paroi épaisse de peptidoglycane (muréine) associée à des quantités moindres d'autres polymères tels que les acides teichoïques, teichuroniques et lipotéichoïques. En revanche, les bactéries à Gram négatif sont caractérisées par une paroi de peptidoglycane beaucoup plus fine mais celle-ci est recouverte d'une membrane externe dans laquelle peuvent s'insérer des liposaccharides et des lipoprotéines (Henri, 1995 *In* Thomas, 2011)

En plus, certaines quinones présentent un effet bactériostatique sur les bactéries à Gram positif mais pas vis à vis des bactéries à Gram négatif (Djenadi, 2011). Ces composés sont présents que dans l'extrait MéOH et DCM selon les études phytochimiques réalisées précédemment.

Une inhibition de même sens a été détectée par Telli (2017), où elle a constaté que les *P. aeruginosa* suivi par les *S. aureus* sont les souches les plus sensibles à tous les extraits investigués d'*A. radiata* en comparaison avec *E. coli*.

Nos résultats sont en accord aussi avec ceux obtenus par Hamada et Ladjel (2015) qui ont démontré que l'extrait méthanolique était efficace contre les *S. aureus*. Mais une faible activité voire une résistance absolue a été observée contre les souches à Gram-négative (*P. aeruginosa* et *E. coli*). Ces légères différences peuvent expliquer la variation de l'activité antibactérienne d'un germe à l'autre.

Parallèlement, El Hanbali *et al.* (2006) a trouvé que les *P. aeruginosa* sont les souches les plus résistantes à l'action d'*A. radiata* par rapport à *E. coli*, où ils ne sont obtenus aucune zone d'inhibition. En outre, Saoud (2016) a été détectée une inhibition contre les *S. aureus* et *E. coli* par l'extrait chloroformique d'*A. radiata* avec des diamètres de 15,9 mm et 12,4 mm respectivement. *P. aeruginosa* s'apparaît comme la souche la plus résistante selon cette étude (Saoud, 2016).

En outre, Qadah (2013) a révélé que l'extrait méthanolique d'*A. radiata* présente une activité inhibitrice de la croissance bactérienne sur *S. aureus* et *E. coli* en comparaison avec celle de l'extrait chloroformique. Beddou (2015), qui a étudié l'activité antibactérienne des différentes parties d'*A. radiata*, a trouvé que l'extrait AE des feuilles est le plus efficace contre tous les bactéries gram positifs en particulier *S. aureus*, même mieux que l'extrait chloroformique. Cependant, aucune activité inhibitrice de ces extraits contre *E. coli* et *P. aeruginosa*.

En se basant sur toutes ces études, on peut dire que cette méthode est discutable et la lecture des boîtes reste subjective. L'un des raisons principales de ces différences est le détail de manipulation, surtout la quantité des extraits déposée sur les disques. Cela à part que le film bactérien soit très faible et à peine visible. En effet, les souches utilisées se sont révélées ne pas être extrêmement pures, quelque fois contaminées et certaines ne poussaient pas correctement lors de l'incubation à 37°C (Annexe 20).

Le diamètre de zone d'inhibition diffère d'une souche bactérienne à une autre et d'un extrait à un autre. Ces différences peuvent être attribuées à plusieurs facteurs tels que les facteurs inhérents ; variété, conditions ambiantes, facteurs écologiques, variations saisonnières, méthodes d'extraction, préparation d'extrait, sensibilité des bactéries et organe de plante utilisé. De même, l'effet du solvant à extraire les compositions chimiques (Adouane, 2016). Ceci a été remarqué pour nos extraits.

Au terme de cette étape, on peut dire que malgré cette méthode est rapide et simple à mettre en œuvre. Cependant, il serait judicieux de mettre en place des tests antibactériens avec la méthode de dilution, afin d'avoir des résultats plus rigoureux, plus homogènes et plus objectifs.

II.4.2.2. Concentration inhibitrice minimale (CMI)

Les concentrations minimales inhibitrices de la croissance bactérienne des différents extraits d'*Anvillea radiata* vis-à-vis les souches testées ont été déterminées et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) (en µg/ml) des différents extraits d'*Anvillea radiata*.

Souches	MéOH	BuOH	AE	DCM
<i>E. Coli</i>	83,75	<7,03	9,06	103,75
<i>S. aureus</i>	41,875	<7,03	9,06	51,875
<i>P. aeruginosa</i>	167,5	56,25	9,06	103,75

Sur la base de la classification mentionné dans le chapitre précédent, nous constatons que tous nos extraits ont exercé une forte activité inhibitrice vis-à-vis toutes les souches testées. Où les concentrations minimales inhibitrices obtenues varient de moins de 7,03 à 167,5 µg/ml pour les bactéries à gram négatif et à 51,875 µg/ml pour les bactéries à gram positif (Figure 10).

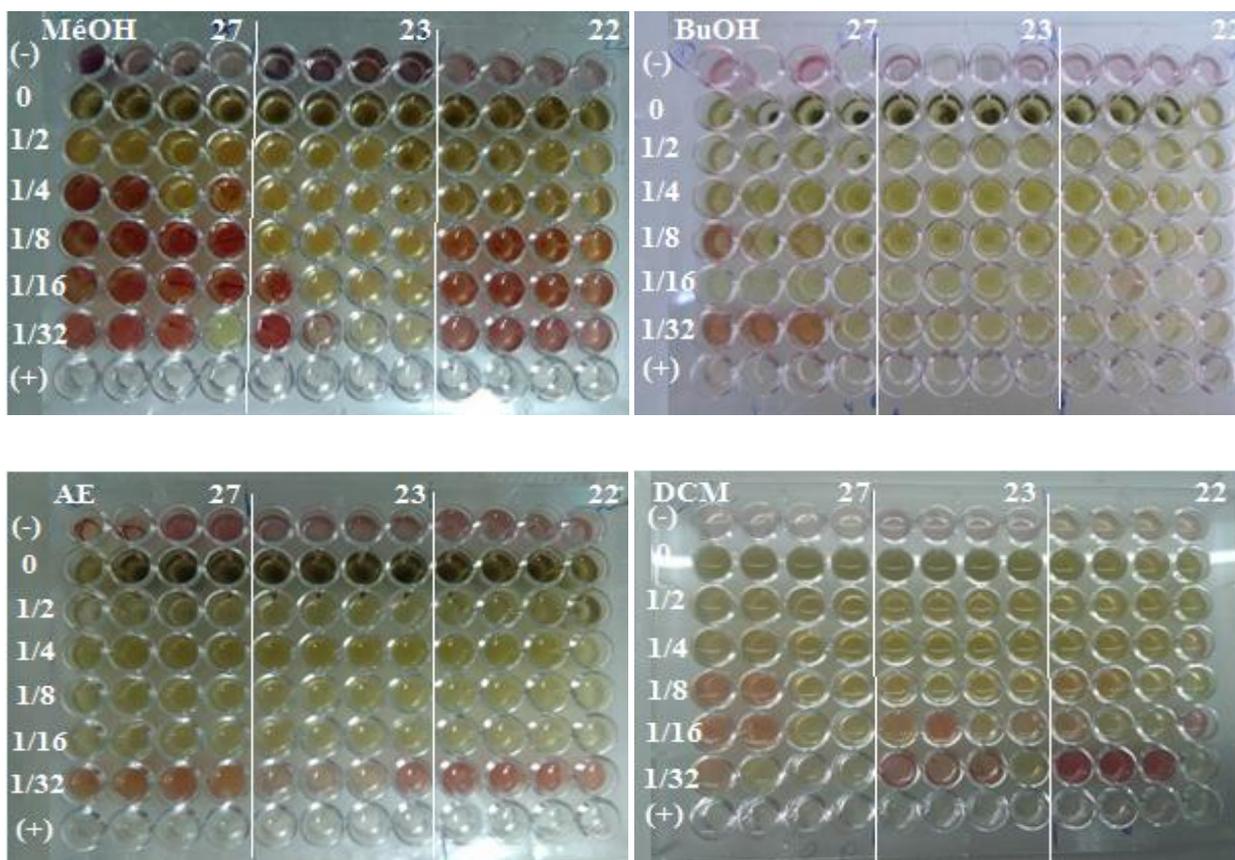


Figure 10 : Inhibition de la croissance de trois souches testées par différentes concentrations des extraits d'*A. radiata* (27 : *P. aeruginosa*, 23 : *S. aureus* et 22 : *E. coli*).

Une interprétation globale des résultats montre que la majorité des valeurs des CMI concordent d'une manière générale avec celles des diamètres d'inhibition ; les extraits ayant induit une importante zone d'inhibition présentent des petites CMI sur les souches correspondantes. Il est à noter aussi que l'extrait BuOH est celui qui a enregistré l'activité excellente contre les *S. aureus* et *E. coli*. L'extrait AE vient en deuxième position concernant son action sur les trois souches testées, et l'extrait MéOH avec le DCM contre les *S. aureus*.

L'effet excellent de l'extrait BuOH peut justifier par son richesse en tanins condensés (proanthocyanidines), analysés dans les tests précédemment. Ces molécules biologiquement actives, douées d'activités antibactériennes remarquables : *Klebsiella pneumonia*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*. etc.). Ils sont vulnérables à la polymérisation dans l'air par des réactions d'oxydation. Par conséquent, la taille de la polymérisation est un facteur important de leur toxicité (Baba Ouyoub, 2017).

Une de leurs actions moléculaires est de complexer les protéines par des forces dites non spécifiques telles que la liaison hydrogène et les interactions hydrophobes, ainsi que par la formation de liaisons covalentes. Aussi, leur mode d'action antimicrobienne peut être lié à leur capacité à inactiver les adhésines microbiennes, les enzymes, les protéines de transport de l'enveloppe cellulaire. etc. Ils se complexent également avec le polysaccharide (Cowan, 1999).

En effet, L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée (synergie, ou addition) de différents composés. L'effet antibactérien de l'extrait AE peut être attribué aux acide gras et au phyto-estrogène, ou aux deux s'il y a synergie entre leur activité antibactérienne, par perforation de la membrane bactérienne et le flux rapide des composants cytosoliques (Ben Abbas, 2011). Rodriguez *et al.* (2007) ont rapporté que la fraction propénoïque des acides hydroxycinnamiques, moins polaire peut entrer en interaction avec la membrane lipidique cellulaire et neutraliser son potentiel électrique et ainsi affecter son métabolisme (Baba Ouyoub, 2017). De plus, certains phénols supérieurs comme l'acide ellagique et l'acide gallique pourrait être responsable de son activité antimicrobienne (Mahboub *et al.*, 2012).

En général, le site (s) et le nombre de groupes hydroxyle des composés phénoliques sont liés à leur toxicité relative vis-à-vis des microorganismes. De plus, certains auteurs ont trouvé que les phénols fortement oxydés sont des puissants inhibiteurs (Cowan, 1999).

En effet, les flavonoïdes sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries tel que *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (Babayi *et al.*, 2004). Les bactéries testées sont de Gram+ et Gram-, ce qui indique que les flavonoïdes n'agissent pas sur la paroi bactérienne mais plutôt sur un mécanisme interne. D'après un travail déjà réalisé dans ce sens, ces composés sont supposés agir sur l'ADN, ARN et la synthèse protéique (Ulanawska *et al.*, 2006 In Adouane, 2016).

L'enveloppe des bactéries à Gram positif ne possède pas de récepteurs spécifiques ou de perméases facilitant ainsi la pénétration des biocides dans les cellules. Alors que la nature de la membrane externe de la paroi des bactéries à Gram négatif peut jouer un rôle de barrière vis-à-vis des agents chimiques.

L'étude réalisée par Beddou (2015) a montré que les extraits hexaniques des différentes parties (feuilles, fleurs et tiges) d'*Anvillea radiata* n'ont aucune activité inhibitrice sur la croissance des souches testées. Par contre, les extraits d'AE et de chloroforme des feuilles d'*Anvillea radiata* ont enregistré la même valeur de CMI (312 µg/ml) sur *S. aureus*.

Parallèlement, Hamada et Ladjel (2015) ont obtenu une CMI de l'extrait MéOH d'*Anvillea radiata* égale à 150 µg/ml contre *S. aureus* et *P. aeruginosa*, mais une résistance absolue est constatée pour *E. coli*. De même, Telli (2017) a trouvé que l'extrait de l'hexane a une CMI égale à 3.03 µg/ml pour *E. coli*.

Les différences constatées pour les valeurs de CMI sont en relation étroite avec la zone géographique de la récolte de la plante, le type d'extrait et les conditions de séchage et stockage ainsi que d'extraction.

En réalité, la méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne influe aussi sur les résultats. Cimanga *et al.* (2002) ont constaté que la méthode de diffusion en milieu gélosé permet de suggérer que la taille de la zone d'inhibition ne reflète pas la réelle efficacité antibactérienne d'un composé (Telli, 2017). L'un des raisons, c'est que la quantité de produit déposé sur les disques est plus faible que dans la méthode de dilution, où il y a un contact direct avec les souches différemment que la première méthode.

Les résultats obtenus nous ont permis également de mettre en évidence les propriétés antibactériennes des extraits d'*A. radiata*, qui révèlent la présence de principes actifs antibactériens dans la partie aérienne ce qui justifie certains usages ethnopharmacologiques, surtout pour les troubles gastro-entériques, les maladies infectieuses et pulmonaires induits par ces

souches. Mais, il serait par conséquent intéressant d'entreprendre des études de toxicité des extraits purifiés de cette plante afin de déterminer les doses thérapeutiques et les doses létales car les remèdes traditionnels souffrent beaucoup du problème de dosage (Qadah, 2013 ; Beddou, 2015).

*Conclusion et
perspectives*

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Dans ce contexte, on s'est intéressé à l'étude phytochimique et biologique (anti-oxydante et antibactérienne) des différents extraits à polarité différentes de la partie aérienne d'*Anvillea radiata*, plante largement utilisée dans la médecine traditionnelle, récoltée dans la région d'El-Guerrara-Ghardaïa.

Pour ce faire, un criblage préliminaire des différentes familles de métabolites secondaires a été effectué. Les résultats ont révélé que cette plante possède un éventail de substances potentiellement bioactives susceptibles d'être exploités à plusieurs échelles (pharmaceutique, alimentaire, cosmétique. etc), à savoir : les composés phénoliques (tanins, les flavonoïdes libres (flavones), les catéchols, coumarines et les quinones libres), azotiques (alcaloïdes) et terpéniques (stéroïdes et saponosides) avec des intensités variables.

Les analyses quantitatives des composés phénoliques testés montrent que l'extrait méthanolique accuse les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux et en flavonoïdes avec des valeurs en respectives de $39,11 \pm 9,52$ mg EAG/g et $17,60 \pm 1,78$ mg ER/g de matière végétale sèche. Par ailleurs, on a révélé que l'extrait d'acétate éthylique est le meilleur extracteur des acides phénols ($283,87 \pm 30,54$ µg EAC/g), tandis que le butanol possède la capacité la plus importante à extraire les tanins condensés ($4,63 \pm 5,85$ mg EC/g).

L'évaluation de l'activité anti-oxydante a indiqué que tous les extraits exercent un effet considérable. La meilleure inhibition de radical cation ABTS•+ a été enregistrée par l'extrait méthanolique avec CI_{50} égale à $0,178 \pm 0,04$ mg/ml qui est inférieure à celle de l'antioxydant standard (Trolox). La capacité réductrice du fer la plus importante est obtenue avec les extraits d'AE, de DCM et de BuOH. Les valeurs de CI_{50} de ces extraits sont inférieures à celle de Trolox, allant de $0,251 \pm 0,02$ mg/ml à $0,461 \pm 0,01$ mg/ml.

L'étude de l'activité antibactérienne nous a montré également que tous nos extraits ont des effets remarquables vis-à-vis les trois souches testées. L'extrait dichlorométhane a révélé la bonne activité par la méthode de diffusion sur milieu gélosé. La méthode de microdilution permet de montrer que l'extrait butanolique a la forte activité vis-à-vis de *S. aureus* et *E. coli* avec des CMI inférieures à $7,03$ µg/ml.

A la lumière de ces résultats, on remarque que l'utilisation traditionnelle de cette plante pour le traitement de certaines maladies inflammatoires et infectieuses parfaitement justifiable

comme l'ont révélé les tests biologiques, qui trouvent une importante application dans l'industrie pharmaceutique comme elle peut trouver aussi dans l'industrie alimentaire.

L'ensemble de ces résultats obtenus ne constitue qu'une première étape dans la recherche de sources naturelles des substances biologiquement actives. Des études approfondies sont nécessaire afin d'isoler et d'identifier les molécules responsables à ces deux activités.

*Références
bibliographiques*

1. Adouane, S. (2016). Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région méridionale des Aurès. Mémoire de Magister. Université Mohamed Khider de Biskra, Algérie. pp 210
2. Aitfella, R. (2010). Méthodes d'études des composés phénoliques. 1^{ère} année Magister. Université Farhat Abbas de Stif, Algérie. pp 39
3. Alilou, H. (2012). Etude phytochimique et antifongique de deux plantes du Sud du Maroc : *Asteriscus graveolens* subsp. *Odorus* (Schousb.) Greuter et *Asteriscus imbricatus* (Cav.) DC. Thèse de Doctorat. Université Ibn Zohr, Agadir. P 10
4. Amadou, S. (2004). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Gombretum glutinosum* Perr. Ex DC (COMBRETACEAE). Thèse de Doctorat. Université de Bamako, Mali. pp 125
5. Anderberg, A (1982). The genus *Anvillea* (Compositae). Nord. J. Bot. 2 : 297-305.
6. Athamena, S., Chalghem1, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S. et Khebri, S. (2010). Activite anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. Lebanese Science Journal. 11(1) : 69-81
7. Attou, A. (2011). Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent. Mémoire de Magister. Université Abou bekr belkaid de Tlemcen, Algérie. P 66
8. Ayad, R. (2008). Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce : *Zygophyllum cornutum* (zygophyllaceae). Mémoire De Magister. Université Mentouri de Constantine, Algérie. P 72-73
9. Azzouz, M., (2007). Etude ethnologique de la flore spontanée médicinale dans la région d'El-Goléa (El Meniaa). Université Kasdi Merbah d'Ouargla, Algérie. P 30
10. Baba Ouyoub, F. (2017). Evaluation des activités biologiques de quelques extraits de *Zizyphus lotus* de la région de Ghardaïa. Mémoire de master. Université de Ghardaïa, Algérie. pp 46
11. Ba, K., Tine, E., Destain, J., Cissé, N. et Thonart, P. (2009). Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. Biotechnol. Agrono. Soc. Environ. 14(1) : 131-139.
12. Babayi, H., Kolo, I., Okogum J.I. et Ijah, U. J. J. (2004). The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogen microorganisms. Biokemistri. 16(2) : 102-105.

13. Bahorun, T. (1997). Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice. Food and agricultural research council, Réduit, Mauritius : 83-94
14. Barkely, T. M., Brouillet, L. et Strother, J. L. (2006). Asteraceae. Flora of North America. 19 : 3-69.
15. Beddou, F. (2015). Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius* L. et *Anvillea radiata* Coss. & Dur. Thèse Doctorat. Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen. Algérie. pp 143
16. Bediaga, M. (2011). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* (Smith) une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de doctorat. Université de Bamako, Mali. P 10.
17. Belbachir, A. E. (2017). Contribution à l'étude phyto-écologique et anatomique des deux espèces médicinales (*Rosmarinus officinalis* et *Juniperus oxycedrus*) Dans les matorrals de Sidi Djilali (Réponses aux perturbations). Mémoire de Master. Université de Tlemcen, Algérie. pp 98
18. Belkheiri, N. (2010). Derives phenoliques a activites antiatherogenes. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse, France. P 113
19. Belyagoubi, N. (2012). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse de doctorat. Université Aboubakr Belkaïd de Tlemcen, Algérie. P 91
20. Ben Abbes, F. (2011). Etude de quelques propriétés chimiques et biologiques d'extraits de dattes « *Phoenix dactylifera* L. ». Mémoire De Magister. Université Ferhat Abbas de Setif, Algérie. pp 79
21. Benammar, C. E., Hichami, A., Yessoufou, A., Simonin, A. M., Belarbi, M., Allali, H. et Khan N. A. (2010). *Zizyphus lotus* L. (Desf.) modulates antioxidant activity and human T-cell proliferation, J. BMC Complementary and Alternative Medicine. 10 : 1186-1472
22. Benkhedimallah, R. et kison, S. (2014). Etude phytochimique et biologique de la plante *satureja calamintha*. Mémoire de master. Université de Constantine1, Algérie. P 59
23. Benzahi, K. (2001). Contribution à l'étude des flavonoïdes dans la plante *Cynodon Dactylon* -L « Chiendent ». Mémoire de Magister. Université d'Ouargla, Algérie. pp 120
24. Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods in Enzymology. 299 : 15–27.

25. Berra, B. (2015). Etude de l'effet du milieu d'extraction sur la composition des feuilles de *Matricaria Pubescens*. Mémoire de master. Université Echahid Hamma Lakhdar d'El-Oued, Algérie. pp 74
26. Bidie, A., N'guessan, B., Yapo A. F., N'guessan, J. D. et Djaman, A. J. (2011). Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. Sciences & Nature. 8(1) : 1-11.
27. Boizot, N. et Charpentier, J. P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. INRA. 79-82.
28. Bouallala, M., Bradai, L. et Abid, M. (2014). Diversité et utilisation des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien dans la pharmacopée saharienne. Revue El-Wahat pour les Recherches et les Etudes. 7 (2) : 18 – 26
29. Boudjellal, K. (2009). Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de l'*Elaeagnus angustifolia* L. Mémoire de Magister. Université de Batna, Algérie. P 49
30. Bougandoura, N. (2011). Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales *Satureja calamintha* ssp nepta (nabta) et *Ajugaiva* L. (chendgoura) de l'ouest d'algerie. Mémoire de Magister. Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen, Algérie. pp 76
31. Bouhadjra, K. (2011). Etude de l'effet des Antioxydants naturels et de Synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive Vierge. Thèse de magister. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie. pp 42
32. Boulkroune, N. (2012). Etude de l'activité antioxydante d'une plante médicinale « *Matricaria pubescens* » : effets de la durée et du solvant d'extraction. Mémoire de Master. Université Abderrahmane Mira de Bejaia, Algérie. pp 54
33. Bourmita, Y., Belboukhari, N., Cheriti, A. et Ould El hadj Mohammed, D. (2013). Recherche préliminaire des sources végétales Sahariennes a alcaloïdes pour usage bio-insecticides. Algerian journal of arid environment. 3 (1) : 98-102
34. Boutalbi, S. (2014). Criblage chimique et l'activité biologique de spiruline (*Arthrospira platensis*). Mémoire De Master. Université Kasdi Merbah d'Ouargla, Algérie. pp 56
35. Bouziane, Z. (2017). Contribution à l'étude ethnobotanique des plantes médicinales de la région d'Azail (Tlemcen–Algérie). Université Abou bakr Belkaïd de Tlemcen, Algérie. pp 67
36. Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4^{ème} édition. Tec et Doc. 11, rue Lavoisier, Paris. pp 1271

37. Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. et Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*. 74 : 2157– 2184.
38. Carillon, A. (2009). Place de la phytothérapie dans les systèmes de sante au XXI^os. Conférence SIPAM.
39. Catier, O. et Roux, D. (2007). Botanique-pharmacognosie-phytothérapie. 3^{ème} édition. Wolters Kluwer. 1, rue Eugène et Armand Peugeot, 92500 Rueil-Malmaison cedex. Paris. P 09
40. Chaabi, M. (2008). Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : *Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae), *Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. (Combretaceae), *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae). Thèse de Doctorat. Université Mentouri de Constantine, Algérie. pp 266
41. Chabot, S., Bel-Rhlid, R., Chênevert, R. et Piché, Y. (1992). Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavono ; compounds under CO₂- enriched conditions. *New Phytol*. 122 : 461-467.
42. Chaouch, N. (2001). Etude des alcaloïdes dans la coloquinte *Colocynthis vulgaris* (L) Schrad (cucurbitacées) Région de Oued N'sa (Wilaya de Ouargla). Mémoire de magister. Université Kasdi Merbah d'Ouargla, Algérie. pp 44
43. Chehma, A. (2006). Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. Dar Elhouda. Aïn Mli'la, Algérie. P 18.
44. Chevallier, A. (2001). La rousse Encyclopédie des plantes médicinales. 2^{ème} édition. Hong Kong. pp 335
45. Chopra, I. C., Abrol, B. K. et Handa, K. L. (1960). Les plantes médicinales des régions arides considérées surtout du point de vue botanique. *In* Les plantes médicinales des régions arides. 7^{ème} édition. (Edited by Unesco « l'Organisation des Nations Unies pour l'éducation, la science et la culture »). Oberthur, Rennes, Place de Fontenoy, Paris. P 13
46. Collin, S. et Crouzet, J. (2011). Polyphénols et procédés : Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire. 11, rue Lavoisier, Paris. P 33-34
47. Cowan, M. (1999). Plant products antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12 (4) : 564-582.

48. Daira, N., Maazi, M. C. et Chefrour, A. (2016). Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale (*Ammoides verticillata* Desf. Briq.) de l'Est Algérien. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège. 85 : 276 – 290
49. Daoudi, A. Bammou, M. Zarkani, S. Slimani, I. Ibjibjen, J. et Nassiri, L. (2015). Etude ethnobotanique de la flore médicinale dans la commune rurale d'Aguelmous province de Khénifra (Maroc). Phytothérapie. 14 (4) : 220–228
50. Diallo, D. (2000). Ethno pharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them: *Glinus oppositifolius* (Azoceae), *Diospyros abyssinica* (Ebenaceae), *Entada africana* (Mimosaceae), *Trichilia emetic* (Meliaceae). Thèse de doctorat de recherche, Faculté des sciences de l'université de Lausanne Suisse.
51. Diallo, A. M. (2005). Etude des plantes médicinales de niafunke (region Tombouctou), phytochimie et pharmacologie de *Maerua crassifolia* Forsk. (Capparidacée). Thèse de Doctorat. Université de Bamako, Mali. pp 125
52. Djahra, A. B. (2014). Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L. Thèse de doctorat. Université Badji mokhtar d'Annaba, Algérie. P 39
53. Djellouli, M., Moussaoui, A., Benmehdi, H., Ziane, L., Belabbes, A., Badraoui, M., Slimani, N. et Hamidi, N. (2013). Ethnopharmacological study and phytochemical screening of three plants (Asteraceae family) from the region of south west Algeria. Asian journal of natural & applied sciences. 2 (2) : 159-165
54. Djemai zoughlache, S. (2009). Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Zizyphus lotus* L. Mémoire De Magister. Université El Hadj Lakhder de Batna, Algérie. P 48
55. Djenadi, F. (2011). Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne du genévrier (*Juniperus phoenicea*) : essai des huiles essentielles et composés phénoliques. Mémoire de Master. Université A Mira de Béjaia, Algérie. <https://www.memoireonline.com>
56. Djenidi, H. (2012). Etude du pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.), essais de germination, extraction des polyphénols et activité antimicrobienne. Mémoire De Magister. Université Mohamed Kheider de Biskra, Algérie. pp 80.
57. Dobignard, A. (2008). Photos d'*Anvillea garcinii* subsp. *radiata* (Coss. & Durieu) Anderb. ; ; num.coll. In Base de données des plantes d'Afrique. <http://www.ville-ge.ch>
58. Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Idrissi Hassani, L. M., Badoc, A. et Gmira, N. (2003). Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *thymelaea lythroides*. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 142 : 61-78

59. Dohou, N. (2004). Approche floristique, ethnobotanique, phytochimique et étude de l'activité biologique de *thymeleae lythroïdes*. Thèse de doctorat. Université Ibn Tofail, Maroc. pp 158
60. El Hanbali, F., El Hakmaoui, A., Mellouki, F., El Rhaffari, L. et Akssira, M. (2007). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Anvillea radiata* Coss. & Dur. Natural Product Communications. 2 (5) : 595-597.
61. El Hanbali, F., El Hassany, B., Mellouki, f., Rhalabi, N., Bessi, H., Haidour, A., Barrero, A. F. et Akssira, M. (2006). Etude des activités cytotoxique et antibactérienne d'un parthenolide isolé d'*Anvillea radiata*. Congrès International de biochimie. Agadir : 424-426.
62. El Hassany, B., El Hanbali, F., Akssira, M., Mellouki, F., Haidour, A. et Barrero, A. F. (2004). Germacranolides from *Anvillea radiata*. Fitoterapia. 75 (6) : 573-576.
63. Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M. et Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. Comptes Rendus Biologies, 331 (5) : 372-379.
64. Fang, Y. Z., Yang, S. et Wu, G. (2002). Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. Nutrition, 18 : 872-879.
65. FAO (Food and Agriculture Organization). (1996). Rapport du Burkina Faso pour la conférence technique internationale de la FAO sur les ressources phytogénétiques. Leipzig. P 05
66. Favier, A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique. P 108-115.
67. Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A. et Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. Molecules. 15 (12) : 8813-8826.
68. Grisibach, A. (1878). La végétation du globe : d'après sa disposition suivant les climats. 2^{ème} édition. Librairie J-B, Baillièrre et Fils. 19, Rue Hautefeuille, près de Boulevard Saint-Germain. Paris. pp 138
69. Halfon, R. (2011). La gemmothérapie : la santé par les bourgeons. Dangles. P 05-07
70. Halimi, A. K. (1997). دليل النباتات الطبية في الجزائر. وزارة الفلاحة والصيد البحري.

71. Hamada, D. et Ladjel, S. (2015). Chemical composition, in-vitro anti-microbial and antioxidant activities of the methanolic extract of *Anvillea radiata* Asteraceae. RJPBCS 6 (2) : 1367-1373
72. Harborne, J.B. (1998). Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. 3th edition. Chapman and Hall, London. 203-214.
73. Holevinsky, K. O. et Nelson, D. J. (1995). Simultaneous detection of free radical release and membrane current during phagocytosis. The Journal of Biological Chemistry. 270 (14) : 8328-8336.

74. Igor Passi, L. B. (2002). Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxyloides* Lam. (Rutaceae). Thèse de Pharmacie. Université de Bamako, Mali. P 12
75. IUCN (Centre for Mediterranean Cooperation). (2005). A guide to medicinal plants in north Africa. Monographie. Málaga, Spain. P 35-36

76. Jaitak, V., Sharma, K., Kalia, K., Kumar, N., Singh, H. P., Kaul, V. K. et Singh, B. (2010). Antioxidant activity of *Potentilla fulgens* : An alpine plant of western Himalaya. Journal of Food Composition and Analysis, 23 : 142-147.

77. Kablan, B.J., Adiko, M. et Abrogua, D.P. (2008). Evaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de *Kalanchoe crenata* et *Manotes longiflora* utilisées dans les ophtamies en cotes d'Ivoire. Pharmacognosie. 6 : 282-288.
78. Khan, AM., Qureshi, RA., Ullah, F., Gilani, S. A. et Nosheen, S. (2011). Phytochemical analysis of selected medicinal plants of Margalla hills and surroundings. J Med Plants Res. 5 : 6017-6023.
79. Khenfer, S. (2016). Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques d'une plante médicinale de la région sud du Sahara Algérien. Mémoire de Master. Université Kasdi Merbah d'Ouargla, Algérie. P 42
80. Kim, D. O., Jeong, S. W. et Lee, C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. Food Chemistry. 81: 321-326.
81. Kouamé-Bi K.F.P. (2012). Valorisation de quatre plantes médicinales Ivoiriennes : étude phytochimique. Thèse de doctorat. Université de Nantes et de l'Université de Cocody-Abidjan. P 30

82. Libbey, J. (2012). Progrès en dermato-allergologie : Besançon. 127, avenue de la république, 92120 Montrouge, France. pp 111
83. Macheix, J. J., Fleuriot, A. et Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechnologiques et universitaires romandes, France. pp 92
84. Mahboubi, A., Kamalinejad, M., Shalviri, M., Karbasi, Z., Jafariazar, Z., et Asgharian, R. (2012). Evaluation of antibacterial activity of three Iranian medicinal plants. Afr. J. Microbiol. Res. 6 (9) : 2048-2052.
85. Mahdjar, S. (2013). Contribution à l'Etude de la composition chimique de la plante *Matricaria pubescens* et à l'évaluation de son activité antioxydante. Mémoire de Master. Université Kasdi Merbah d'Ouargla, Algérie. P 03
86. Makhloufi, A. (2010). Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Thèse Doctorat. Université Aboubaker Belkaid de Tlemcen, Algérie. P 13
87. Mansour, A. (2009). Investigation phytochimique de l'extrait n-butanol de l'espèce *centaurea africana*. Mémoire de magister, Université Mentouri de Constantine, Algérie. P 08
88. Marc, F., Davin, A., Deglène-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M. et Fritsch, P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. SRMS et Éd EDK. 20 (4) : 458-463.
89. Mibindzou Mouellet, A. (2004). Screening phtochimique de deux espèces de plantes : *Crotalia retusa* L (papilionaceae) et *Hallea ciliata* Aubrev & Pellegr. (rubiaceae) récoltées au Gabon. Thèse de doctorat. University de Bamako, Mali. pp 58
90. Michel, T. (2011). Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*). Thèse de Doctorat. Université d'Orléans, Français. P 76-86
91. Moghtari, S. (2012). Effet protecteur de certaines bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté type Hamoum. Mémoire de Magister. Université d'Oran, Algérie. P 50
92. Moghtet, S. Menad, N., Meddah, B. et Moussaoui, A. (2017). *Anvillea radiata* (Aerial Parts) : antifungal effect on mycotoxigenic fungi. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res., 43(1) : 32-34

93. Mori, A., Nishino, C., Enoki N. et Tawata, S. (1987). Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*. 26 (8) : 2231-2234.
94. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (2004a). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 7th edition. Approved Standard M2-A8, Wayne, Pennsylvania.
95. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (2004b). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts ; approved guideline M44-A, Wayne, Pennsylvania.
96. Nostro, A., Germano, M. P., D'Angelo V., Marino A. et Cannetelli, M. A. (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lettres en microbiologie appliqué*. 30 (5) : 379-384.
97. O.M.S (Organisation Mondiale de la Santé). (2000). Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation de la médecine traditionnelle.
98. Ould El Hadj, M. D., Hadj-Mahammed, M. et Zabeiro, H. (2003). Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara septentrional est). *Courrier du Savoir*. 3 : 47-51
99. Ozenda, P. (1977). Flore de sahara. 2^{ème} édition. Centre National de la recherche scientifique. 15, quai Anatole, France. P 21
100. Ozenda, P. (1991). Flore de Sahara. Mise à jour et augmentée. 3^{ème} édition. Dunod. CNRS. Paris. pp 662
101. Pascal, S. M. et Véronique, C. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. 11, rue Lavoisier, Paris. P 09
102. Perumal, S., Pillai, S., Cai, L.W., Malunud, R. et Ramanathan, S., (2012). Determination of minimum inhibitory concentration of *Euphorbia hirta* (L.) by tetrazolium microplate assay. *Journal of Natural Products*. 5 : 68-76.
103. Ponce, A.G., Fritz, R., De lvalle, C. et Roura, S.I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm. Wiss. u. Technol*. 36 : 679-684.

104. Prior, R.L., Wu, X. et Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53(10) : 4290-4302.
105. Qadah, Z., (2013). دراسة الفعالية البيولوجية والفعالية المضادة للأكسدة لنبتة النقد (*Anvillea radiata*). Université Kasdi Merbah d'Ourgla, Algérie.
106. Quézel, P. et Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Volume 2. 15, suai Anatole, France. P 949
107. Saoud, H. D. (2016). Etude structure activité des principes actifs de la plante *Anvillea radiata* Asteraceae. Thèse de Doctorat. Université Kasdi Merbah d'Ouargla, Algérie. pp 133
108. Sarembaud, A. et Poitevin, B. (2011). Homéopathie : Pratiques et base scientifiques. 3^{ème} édition. Elsevier Masson. 20, rue des Grands-Augustins, 75006 paris. P 29-38
109. Seghiri, R. (2009). Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires du genre centaurea : *c. africana*, *c. nicaensis*. Thèse de Doctorat. Université Mentouri de Constantine, Algérie. pp 234
110. Scimeca, D. (2006). Les plantes du bonheur : Le coup de pouce des plantes contre tous les coups de blues. Alpen. Pastor center. 7, rue de Gabian. P 10
111. SFM,. (2014). Société Française de Microbiologie. www.sfm-microbiologie.org
112. Shui G, et Leong L. P. (2006). Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chemistry.* 97 : 277–284.
113. Singleton, V. L. et Rossi J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* 16 : 144-158
114. Steinmetz, M.D., Elias, R., Maillard, C., Boudon, G., Régli, P., Balansard, G. et Ghastin, C. (1993). Recherche d'une activité antitumorale de saponosides triterpéniques. *Médicaments et Aliments : L'Approche ethnopharmacologique* : 331-332.
115. Stermitz, F. R., Lorenz, P., Tawara, J. N., Lauren, A., Zenewicz, L. et Lewis, K. (2000). Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 : 1433-1437
116. Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M. Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 46 (10) : 4267-4274.

117. Szauffer-Hajdrych, M. et Goglifiska, (2004). The quantitative determination of phenolic acids and antimicrobial activity of *Symphoricarpos albus* (L) Blake. *Acta Poloniae Phannaceutica-Drug Research*, 61 (1) : 69-74.
118. Tegos, G., Stermitz, F. R., Lomovskaya, O. et Lewis, K. (2002). Multidrug Pump Inhibitors Uncover Remarkable Activity of Plant Antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46 (10) : 3133-3141.
119. Telli, A. (2017). Activités anti-oxydante, antimicrobienne et antidiabétique de deux espèces spontanées utilisées dans le traitement du diabète dans la région de Ouargla : *Amodaucus leucotrichus* et *Anvillea radiata*. Thèse de doctorat. Université Kasdi Merbah d'Ouargla, Algérie. pp 214
120. Thomas, M. (2011). Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*). Thèse de Doctorat. Université d'Orléans, Français.
121. Toure, D. (2015). Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire. Université Felix Houphouët-Boigny, Français. P 07
122. Trease, E. et Evans, W. C. (1987). *Pharmacognosie*, Billiaire Tindall. 13th edition. London : 61-62.
123. Van Antwerpen, P. Dubois, J., Gelbcke, M. et Neve, J. (2006). Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique : ciblage du système myeloperoxydase / peroxyde d'hydrogène / chlorure. Thèse de Doctorat. Université libre de Bruxelles. Institut de Pharmacie. pp 122

Annexes

Annexe 01 : Réactions de caractérisation (screening phytochimique), avec quelques modifications de protocole :

1. Identification des tanins : La présence des tanins est mise en évidence par l'addition à 2 ml de l'extrait de la plante 2 à 3 gouttes de solution de FeCl₃ diluée à 1%. Le mélange est incubé pendant 15 min à 50°C. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire ou bleu-verte (Trease et Evans, 1987).

*La différenciation des tanins (cathéchiques et galliques) est obtenue grâce au réactif de Stiasny (10 ml de formol (35%) + 5ml d'acide chlorhydrique R) : Sur 30 ml d'extrait aqueux, on ajoute 15ml de réactif de Stiasny, ensuite la solution est chauffée à reflux au bain marie pendant 15 à 30 minutes. L'apparition d'un précipité de couleur rose claire montre la présence des tanins catéchiques (Mibindzou Mouellet, 2004).

2. Identification des flavonoïdes :

- a) Les anthocyanes : A 2 ml d'extrait, on ajoute 2 ml d'HCl (2N) puis 2ml d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH). Une coloration rouge en milieu acide et bleue violacée en milieu basique témoigne de la présence d'anthocyanes (Mibindzou Mouellet, 2004).
- b) Réaction à la Cyanidine : À 5ml d'extrait aqueux, on ajoute 5 ml d'éthanol chlorhydrique (éthanol à 95°, eau distillée et acide chlorhydrique R en volumes égales de 5 ml). Ensuite, quelques copeaux de magnésium sont ajoutés ainsi qu'un ml d'alcool isoamylique. L'apparition d'une coloration sur la couche surnageant d'alcool isoamylique indique la présence des flavonoïdes libres (génine) :

- Une coloration rose-orangée indique la présence des flavones.
- Une coloration rose-violacée indique la présence des flavanones.
- Une coloration rouge indique la présence des flavonols et des flavanonols.

*On effectue la réaction de la cyanidine sans ajouter des copeaux de magnésium et on chauffe pendant 10 min au bain-marie. En présence de leucoanthocyanes, il se développe une coloration rouge cerise ou violacée ; les catéchols donnent une teinte brune-rouge (Mibindzou Mouellet, 2004).

3. Identification des coumarines : Sont révélées à partir de 2 ml de l'infusé à 5% placé dans un tube dans lequel sont ajoutés 3 ml de NaOH (10%). Après agitation de la solution, l'apparition d'une couleur jaune indique la présence de coumarines (Diallo, 2000).

4. Identification des quinones libres : 5 ml d'extrait plus quelques gouttes de NaOH à 1% développent une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet, révèle la présence des quinones libres (Dohou, 2004).
5. Identification des alcaloïdes : 5 ml d'acide chlorhydrique à 1% plus 1 ml de chaque extrait, le mélange est chauffé au bain marie puis on divise chaque extrait en deux volume égaux. Un volume est traité par 5 gouttes de réactif de Mayer (1,36 g HgCl₂ ; 5 g KI ; eau distillé q.s.p 100 ml), l'autre par 5 gouttes de réactif de Wagner (2 g KI ; 1,27 g d'iode ; eau distillé q.s.p 100 ml). La formation d'un précipité blanc ou brun indique la présence d'alcaloïdes (Benzahi, 2001 ; Chaouch, 2001).
6. Identification des terpénoïdes : Deux méthodes ont été utilisées :
 - ✓ Test de Libermann-Burchard : A 5 ml d'extrait, on ajoute 2 ml d'anhydride acétique et 1 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄). L'apparition d'une couleur mauve ou violette indique un test positif.
 - ✓ Test de Slakowski : 5 ml d'extrait est ajouté à 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase indique la présence de terpénoïdes (Khan et al., 2011).
7. Identification des stéroïdes : Dans une capsule, on introduit 5 ml d'anhydride acétique à 5 ml de l'extrait, qui sont replit dans un tube à essai dans lequel sont ajoutés 0,5 ml de H₂SO₄ concentré. L'apparition d'une coloration violette qui vire au bleu puis au vert indique une réaction positive (Harborne, 1998)
8. Saponines : Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse d'une décoction aqueuse à 2%. Après l'ajustement de filtrat à 100ml, préparer une série de dilutions (10% à 100%) dans des tubes de 1,3 cm de diamètre interne. Chaque tube est agité horizontalement pendant 15 secondes puis laissé reposer pendant 20 min. On relève ensuite la hauteur de la mousse persistante en cm. Si celle-ci est inférieure à 1 cm dans tous les tubes, l'indice est moins de 100. La dilution dans le tube où la hauteur de la mousse est égale à 1 cm représente l'indice recherché. Si elle est proche de 1 cm dans le Xème tube, on calcule l'indice de mousse par la formule suivante :

$$Im = \text{hauteur de mousse dans le Xème tube} \times 5 / 0,0x$$
 La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100 (Dohou *et al.*, 2003).

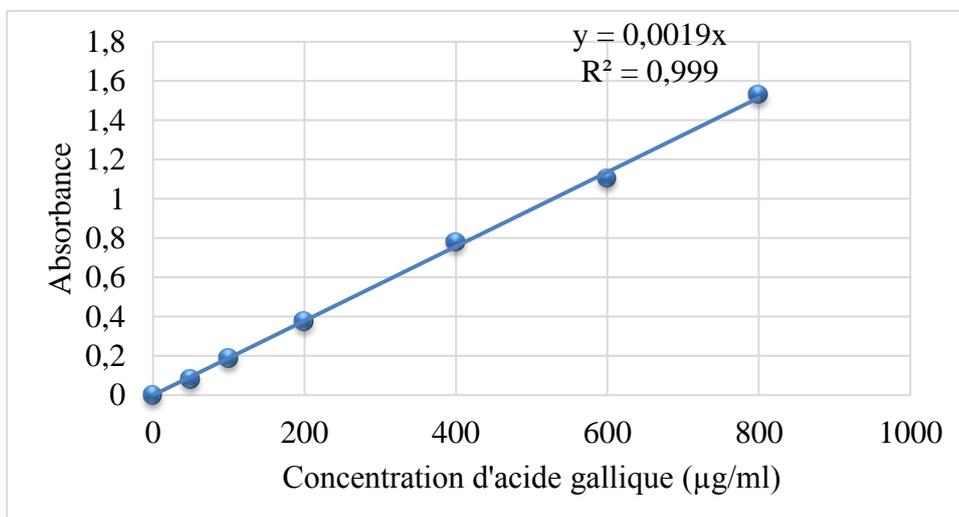
9. Composés réducteurs :

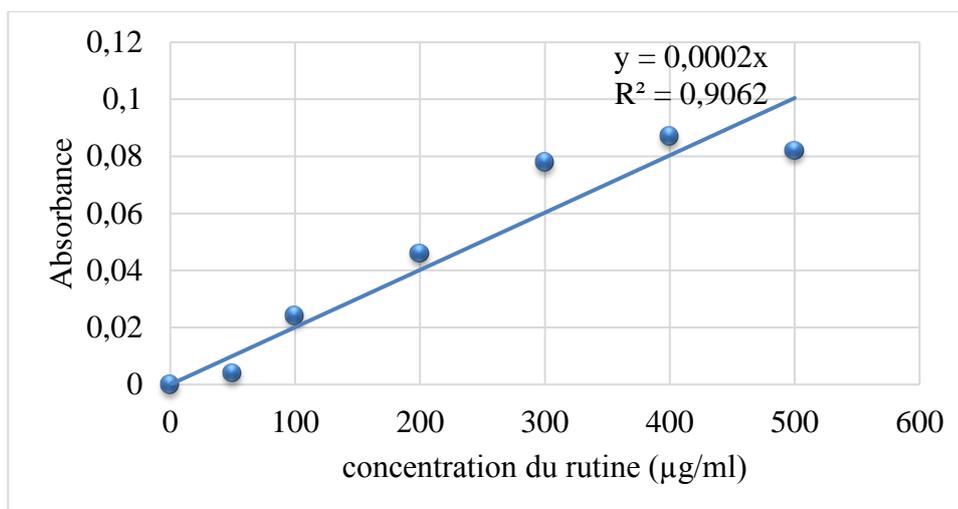
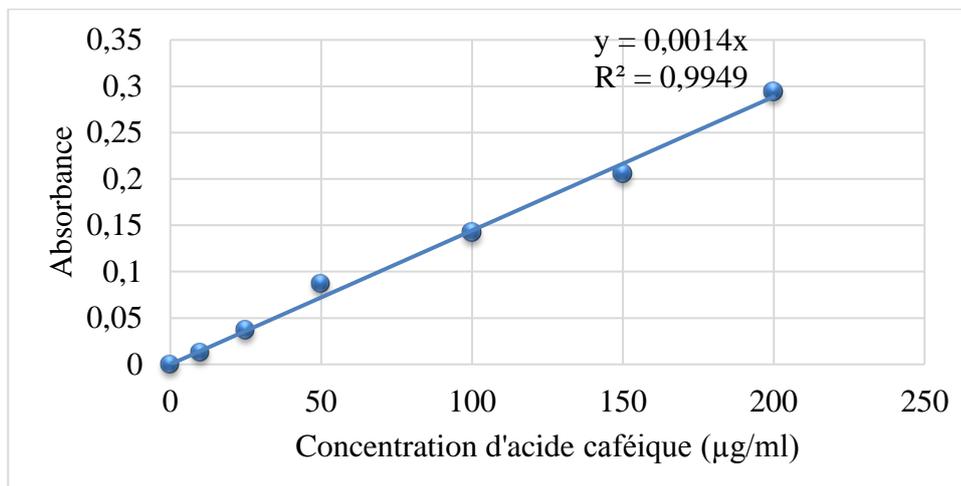
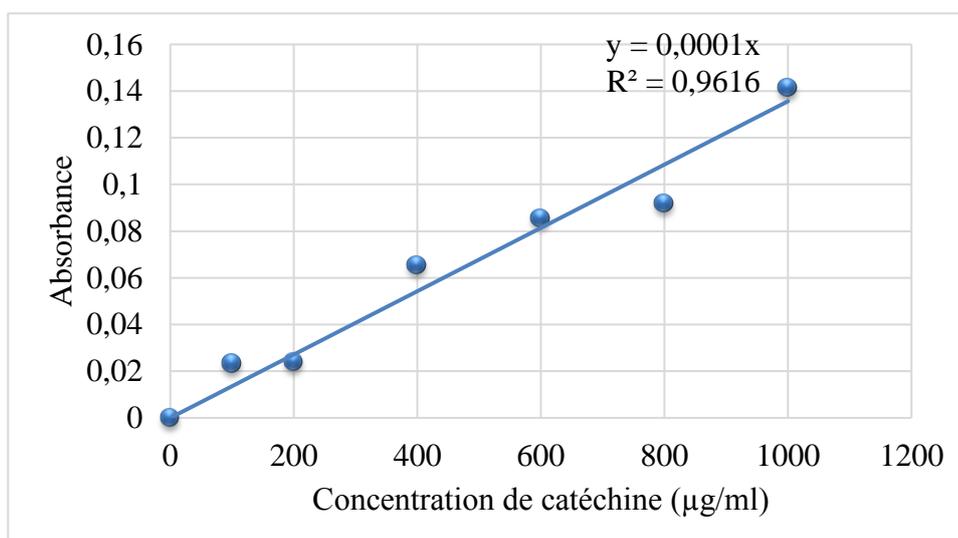
- Leur détection consiste à traiter 1 ml de l'extrait avec 2 ml d'eau distillé et 2 ml de la liqueur de Fehling puis les tubes sont chauffés au bain marie à 40°C. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique.
- Une évaporation à sec de 5 ml du décocté aqueux à 10% au bain-marie bouillant. L'obtention d'un précipité rouge-brique après addition au résidu de 1 ml de réactif de Fehling indique la présence des composés réducteurs (Trease et Evans, 1987).

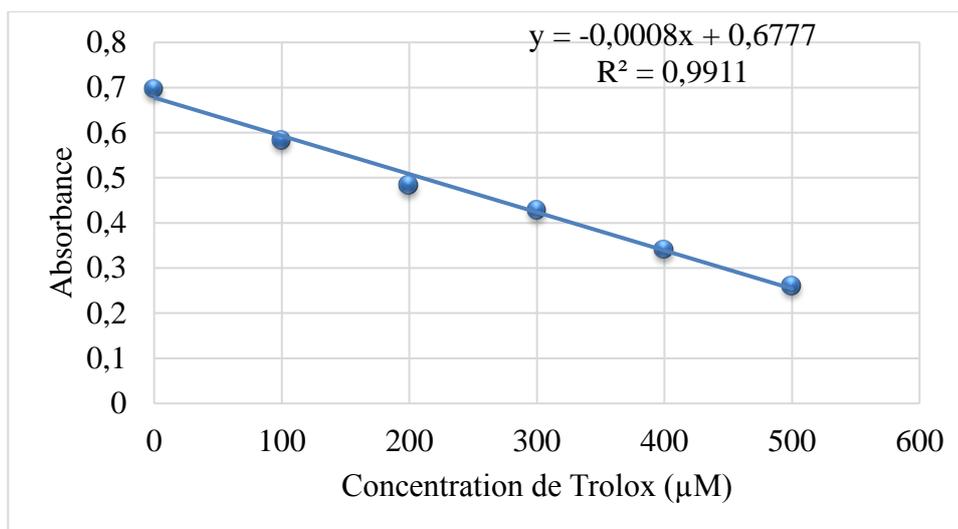
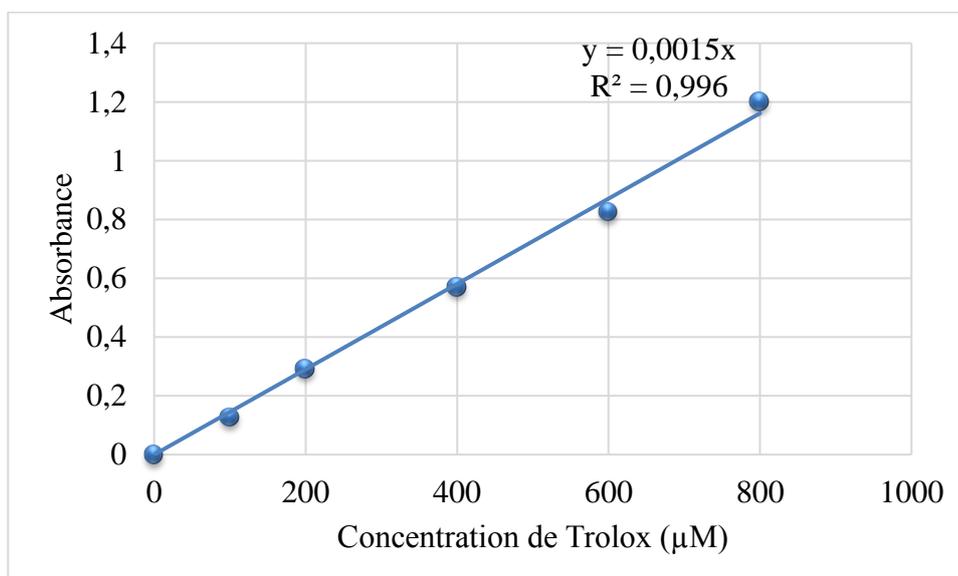
Annexe 2 : Indice de mousse de saponines

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Décocté	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Q.s.p 10ml	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
H (cm) de premier essai	0.4	0.7	0.8	0.8	1.4	0.7	0.9	2.4	1.8	2.3
Indice de mousse 1	200	175	133.33	100	140	58.33	64.29	150	100	115
H(cm) de deuxième essai	0.3	0.2	0.3	0.5	0.3	0.6	1.2	0.6	0.6	0.4
Indice de mousse 2	150	50	50	62.5	30	50	58.71	37.5	33.33	20

H : Hauteur de mousse

Annexe 3 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Annexe 4 : Courbe d'étalonnage de la rutine**Annexe 5** : Courbe d'étalonnage de l'acide caféique.**Annexe 6** : Courbe d'étalonnage de la catéchine.

Annexe 7 : Courbe d'étalonnage de Trolox pour le test ABTS.**Annexe 8** : Courbe d'étalonnage de Trolox pour le test FRAP.**Annexe 9** : Résultats de variabilité de teneur en polyphénol totaux (mg/g).

F (Valeur observée)	F (Valeur critique)	DDL1	DDL2	P-value	alpha
9,3682511	4,06618056	3	8	0,00537936	0,05

Annexe 10 : Résultats de variabilité de teneur en flavonoïde (mg/g).

F (Valeur observée)	F (Valeur critique)	DDL1	DDL2	P-value	alpha
4,39384641	4,06618056	3	8	0,04179301	0,05

Annexe 11 : Résultats de variabilité de teneur en acide phénol ($\mu\text{g/g}$)

F (Valeur observée)	F (Valeur critique)	DDL1	DDL2	P-value	alpha
3,13262652	4,06618056	3	8	0,08732773	0,05

Annexe 12 : Résultats de variabilité de teneur en tanins condensés (mg/g).

F (Valeur observée)	F (Valeur critique)	DDL1	DDL2	P-value	alpha
4,46612466	4,06618056	3	8	0,04021358	0,05

Annexe 13 : Résultats de test de variance de potentiel antioxydant ABTS (μM).

F (Valeur observée)	F (Valeur critique)	DDL1	DDL2	P-value	alpha
6,9679186	4,06618056	3	8	0,01273842	0,05

Annexe 14 : Résultats de test de variance de potentiel antioxydant FRAP (μM).

F (Valeur observée)	F (Valeur critique)	DDL1	DDL2	P-value	alpha
3,5731796	4,06618056	3	8	0,06650372	0,05

Annexe 15 : Matrice de corrélation entre les teneurs en composés phénoliques et les valeurs de CI_{50} de test anti-oxydant (ABTS et FRAP) de l'extrait MéOH.

Variables	PPT	FLV	Ac Ph	TC	ABTS	FRAP
PPT	1					
FLV	0,974	1				
Ac Ph	0,828	0,680	1			
TC	0,571	0,742	0,013	1		
ABTS	-0,900	-0,778	-0,990	-0,156	1	
FRAP	0,107	-0,121	0,645	-0,756	-0,529	1

Annexe 16 : Matrice de corrélation entre les teneurs en composés phénoliques et les valeurs de CI_{50} de test anti-oxydant (ABTS et FRAP) de l'extrait BuOH.

Variables	PPT	FLV	Ac Ph	TC	ABTS	FRAP
PPT	1					
FLV	0,996	1				
Ac Ph	0,708	0,766	1			
TC	0,115	0,028	-0,621	1		
ABTS	-0,445	-0,365	0,318	-0,941	1	
FRAP	-0,190	-0,104	0,559	-0,997	0,964	1

Annexe 17 : Matrice de corrélation entre les teneurs en composés phénoliques et les valeurs de CI_{50} de test anti-oxydant (ABTS et FRAP) de l'extrait AE.

Variables	PPT	FLV	Ac Ph	TC	ABTS	FRAP
PPT	1					
FLV	0,977	1				
Ac Ph	-0,756	-0,598	1			
TC	0,492	0,667	0,198	1		
ABTS	-0,440	0,770	0,920	0,566	1	
FRAP	0,099	-0,117	-0,726	-0,818	-0,937	1

Annexe 18 : Matrice de corrélation entre les teneurs en composés phénoliques et les valeurs de CI_{50} de test antioxydant (ABTS et FRAP) de l'extrait DCM.

Variables	PPT	FLV	Ac Ph	TC	ABTS	FRAP
PPT	1					
FLV	0,141	1				
Ac Ph	0,370	-0,867	1			
TC	0,978	-0,066	0,554	1		
ABTS	-0,523	0,770	-0,986	-0,687	1	
FRAP	0,151	1,000	-0,862	-0,056	0,764	1

Annexe 19 : L'inactivité de MéOH (témoin négatif) sur les trois souches testées (22 : *E. coli*, 23 : *S. aureus* et 27 : *P. aeruginosa*).



Annexe 20 : Zones d'inhibition des différents extraits d'*A. radiata* (1 : MéOH, 2 : BuOH, 3 : AE et 4 : DCM).

