

Université MUSTAPHA Stambouli
Mascara



جامعة مصطفى أسطبولي
معسكر

Faculté des sciences de la nature e de la vie

Département de biologie

Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire

THESE de DOCTORAT en SCIENCES

Spécialité : Sciences de la nature et de la vie

Option : Sciences biologiques

Thème

**Isolement et caractérisation des flavonoïdes des
plantes médicinales de la région de Mascara et leurs
activités biologiques.**

Présentée par : **M^{me} Boukada Fadhela**

Soutenue le **06 -10- 2022** devant les membres de jury

Présidente	M_m TIR TOUIL MEDDAH Aicha	Professeur	Université M.S. de Mascara
Examineur	M_r BERROUKCHE Abdelkrim	Professeur	Université M. T. de Saida
Examinatrice	M_m SAHNOUNI Fatima	Professeur	Université M.S. de Mascara
Examinatrice	M_m DJAAFRI Ayada	Professeur	Université A.B. d'Oran 1
Examineur	M_r ABOUNI Bouziane	Professeur	Université B.A. de Sidi Bel-Abbés
Encadreur	M_r MEDDAH Boumedienne	Professeur	Université M.S. de Mascara

Année Universitaire : 2021-2022

DEDICACES

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, Le respect, la reconnaissance... Aussi, c'est tout simplement que Je dédie cette thèse

À Ma très chère maman, Que Dieu le tout puissant te préserve mama,

À Mon très cher père, Merci pour tout ce que tu fais pour moi papa,

*À mes chers frères Youcef, Med el amine, Abd el kader et ma chère sœur
Ikram,*

À Mon mari, Merci pour ton soutien et ta gentillesse,

*À Mes petits : Abd el djalil, Abd el rahman, Abd el hakim et ma belle
Assia, je vous aime mes anges,*

À Ma belle famille,

À Mes amies Sara, Fatima et Hafida.

REMERCIEMENTS

J'exprime d'abord mes profonds remerciements à mon DIEU qui m'a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mon profond respect à mon directeur de thèse Monsieur **Meddah Boumediene**, Professeur de l'Université de Mascara, pour son sérieux, sa patience, sa rigueur scientifique, ses précieux conseils et l'orientation dont j'ai pu bénéficier et sans qui cette thèse n'aurait jamais vue le jour.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à Madame **Tir touil Meddah Aicha**, Professeur de l'Université de Mascara, qui a consenti à participer à cette commission et a présidé le jury, qu'elle trouve ici toute l'expression de ma considération.

Un grand remerciement à Monsieur **Berroukche Abdelkrim**, Professeur de l'Université de Saida, de m'avoir honoré de sa présence et d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je suis très reconnaissante à Madame **Sahnouni Fatima**, Professeur de l'Université de Mascara, pour sa contribution et son aide et d'avoir acceptée de participer à ce jury, qu'elle trouve ici l'expression de toute ma gratitude.

J'exprime toute ma gratitude à Madame **Djaàfri Ayada**, Professeur de l'Université d'Oran 1, de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie Monsieur **Abouni Bouziane**, Professeur de l'Université de Sidi Bel-Abbas pour sa participation au jury et lui demande d'accepter toute ma reconnaissance et qu'il trouve ici l'expression de ma haute considération.

Je remercie particulièrement, Docteurs **Sitayeb Sara** et **Khadem Hafida**, pour leur disponibilité et encouragement.

Je remercie également Monsieur **Megharbi Ahmed**, Maitre de conférences A, de l'Université de Rélizane pour m'avoir aidé dans les études statistiques.

Je remercie toutes les personnes travaillantes au sein des laboratoires SNV de l'Université de Mascara, pour leur disponibilité.

Mes sentiments de reconnaissances et mes remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Résumé

Cette thèse contribue à la mise en valeur de trois plantes médicinales de la région de Mascara: *Ajuga iva*, *Adiantum capillus-veneris* et *Lavandula stoechas* et leur caractérisation par un screening phytochimique, une évaluation des activités antioxydantes et antibactériennes et une identification des composés phénoliques.

Le screening phytochimique a été réalisé afin de déterminer les grands groupes chimiques contenus dans les trois plantes par des méthodes standards. Cette investigation phytochimique a permis de mettre en évidence la détection de quelques groupes chimiques à savoir : huiles essentielles, alcaloïdes, saponines, tanins et flavonoïdes en tant que métabolites secondaires et acides gras, sucres, et protéines en tant que métabolites primaires dans toutes les espèces.

L'extraction des flavonoïdes a été réalisée par 85% de méthanol, ensuite les extraits bruts ont été successivement fractionnés avec de l'acétate d'éthyle et le n-butanol. Les extraits ont été analysés pour déterminer leur teneur en polyphénols et en flavonoïdes en utilisant respectivement le test de Folin-Ciocalteu et la méthode au trichlorure d'aluminium. La teneur en phénols totaux des extraits présentaient une large gamme variant de 3.87 ± 0.17 à 191.46 ± 2.87 mg EAG/g E où les fractions acétate d'éthyle sont les plus riches en polyphénols. En outre, la teneur en flavonoïdes varie entre 0.17 ± 0.002 et 91.83 ± 2.32 mg EC/g E dont les fractions butanolique ont la teneur la plus élevée en flavonoïdes.

L'activité antioxydante *in vitro* des extraits flavoniques a été évaluée par trois méthodes : le piégeage du radical 2,2-diphényl-2-picrylhydrazyl, le pouvoir réducteur et les substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. Les extraits présentaient une activité antioxydante importante mais qui varie d'une méthode à une autre. Néanmoins, Les fractions acétate d'éthyle et butanolique de *Lavandula soechas* ont présenté le potentiel antioxydant le plus puissant avec les trois méthodes. Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la teneur en polyphénols et en flavonoïdes et l'activité antioxydante.

Le pouvoir antibactérien des extraits a été testé contre des bactéries pathogènes à Gram négatives et Gram positives en utilisant la méthode de diffusion sur disque et la méthode de microdilution pour déterminer la CMI. En outre, les concentrations minimales bactéricides (CMB) ont été déterminées. Les extraits ont révélé une activité antibactérienne à large spectre contre les souches bactériennes utilisées dans l'étude. L'extrait d'acétate d'éthyle a révélé la plus grande zone d'inhibition et la plus faible concentration minimale inhibitrice (31 mm et CMI = 0.31 mg/ml) respectivement contre *Streptococcus pneumoniae*.

La caractérisation par CCM et HPLC-UV nous a permis d'identifier la présence de quelques composés phénoliques principalement des acides phénoliques et des flavonoïdes. Il ressort de cette étude que les trois plantes constituent une source majeure de principes actifs possédant diverses activités biologiques qui pourraient jouer un rôle reconnu dans la phytothérapie.

Mots clés : *Ajuga iva*, *Adiantum capillus-veneris*, *Lavandula stoechas*, activité antioxydante, activité antibactérienne, CCM, HPLC, polyphénols, flavonoïdes.

Abstract

This study contributes to the development of three medicinal plants from Mascara region: *Ajuga iva*, *Adiantum capillus-veneris* and *Lavandula stoechas* and their characterization by phytochemical screening, evaluation of antioxidant and antibacterial activities and identification of phenolic compounds.

Phytochemical screening was carried out to determine the major chemical groups contained in the three plants by standard methods. This phytochemical investigation revealed the detection of some chemical groups, namely: essential oils, alkaloids, saponins, tannins and flavonoids as secondary metabolites and fatty acids, sugars, and proteins as primary metabolites in all species.

Flavonoids were extracted using 85% methanol, then the crude extracts were successively fractionated with ethyl acetate and n-butanol. The extracts were analysed for polyphenol and flavonoid content using the Folin-Ciocalteu test and the aluminium trichloride method, respectively. The total phenol content of the extracts showed a wide range from 3.87 ± 0.17 to 191.46 ± 2.87 mg EAG/g E where the ethyl acetate fractions are the most rich in polyphenols. In addition, the flavonoid content ranged from 0.17 ± 0.002 to 91.83 ± 2.32 mg EC/g E with the butanol fractions having the highest flavonoid content.

The *in vitro* antioxidant activity of flavonoids extracts was assessed by three methods: 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging, reducing power and thiobarbituric acid reactive substances. The extracts showed significant antioxidant activity but this varied from method to method. Nevertheless, the ethyl acetate and butanol fractions of *Lavandula soechas* showed the strongest antioxidant potential with all three methods. No correlation was found between polyphenol and flavonoid contents and antioxidant activity.

The antibacterial potency of the extracts was tested against Gram-negative and Gram-positive pathogenic bacteria using the disk diffusion method and the micridillution method to determine the MIC. In addition, the minimum bactericidal concentrations (MBC) were determined. The extracts showed broad spectrum antibacterial activity against the bacterial strains used in the study. The ethyl acetate extract showed the largest zone of inhibition and the lowest minimum inhibitory concentration (31 mm and MIC = 0.31 mg/ml respectively) against *Streptococcus pneumoniae*.

Characterisation by CCM and HPLC-UV allowed us to identify the presence of some phenolic compounds, mainly phenolic acids and flavonoids. It appears from this study that the three plants constitute a major source of active principles with various biological activities that could play a recognised role in phytotherapy.

Key words: *Ajuga iva*, *Adiantum capillus-veneris*, *Lavandula stoechas*, antioxidant activity, antibacterial activity, TLC, HPLC, polyphenols, flavonoids.

Table des matières

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Liste des annexes

INTRODUCTION GENERALE 01

CHAPITRE 01 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les plantes médicinales choisies.....	03
1.1. La plante médicinale <i>Ajuga iva</i> L	03
1.1.1. Description de la plante	03
1.1.2. Composition chimique de la plante	04
1.1.3. Utilisation traditionnelle de la plante	05
1.1.4. Propriétés biologiques de la plante	05
1.2. La plante médicinale <i>Adiantum capillus-veneris</i> L.	06
1.2.1. Description de la plante.....	06
1.2.2. Composition chimique de la plante	06
1.2.3. Utilisation traditionnelle de la plante	07
1.2.4. Propriétés biologiques de la plante	07
1.3. La plante médicinale <i>Lavandula stoechas</i> L.	08
1.3.1. Description de la plante.....	08
1.3.2. Composition chimique de la plante	08
1.3.3. Utilisation traditionnelle de la plante	09
1.3.4. Propriétés biologique de la plante	09
2. Antibiorésistance	10
2.1. Définition d'un antibiotique	10
2.2. La résistance aux antibiotiques	10
2.3. Types de résistances bactériennes	11
2.3.1. La résistance naturelle	11
2.3.2. La résistance acquise	11
2.4. Appauvrissement de l'arsenal thérapeutique.....	12

Table des matières

2.5. Les plantes comme source alternative des antimicrobiens.....	12
3. Radicaux libres, stress oxydant et antioxydant	13
3.1. Radicaux libres	13
3.2. Stress oxydatif	14
3.2.1. Conséquences moléculaires du stress oxydatif	15
3.2.2. Stress oxydatif et maladies humaines	16
3.3. Les antioxydants.....	17
3.3.1. Antioxydants endogènes	17
3.3.2. Antioxydants exogènes	17
4. Les polyphénols	19
4.1. Définition des polyphénols.....	19
4.2. Classification des polyphénols	19
4.2.1. Acides phénoliques (ou acides phénolcarboxyliques)	20
4.2.2. Coumarines.....	20
4.2.3. Stilbènes	21
4.2.4. Lignanes	22
4.2.5. Flavonoides	23
4.2.5.1. Définition et structure	23
4.2.5.2. Biosynthèse des flavonoides	24
4.2.5.3. Classification des flavonoides	25
4.3. Activités biologiques des flavonoides.....	29
4.3.1. Activité antioxydante des flavonoides	32
4.3.1.1. Mécanisme d'action antioxydant des flavonoides	33
4.3.1.2. Relations structure-activité antioxydante des flavonoïdes	36
4.3.2. Activité antibactérienne des flavonoïdes	38
4.3.2.1. Mécanisme d'action antibactérien des flavonoïdes	38
4.3.2.2. Relation structure-activité antibactérienne des flavonoides	43

CHAPITRE 02 : MATERIELS ET METHODES

1. Objectif	46
--------------------------	-----------

Table des matières

2. Matériel végétal (récolte, séchage et broyage)	46
3. Etude phytochimique	48
3.1. Etude phytochimique qualitative	48
3.1.1. Préparation des extraits	48
3.1.2. Tests de caractérisation	49
3.1.2.1. Extrait chloroformique	49
3.1.2.2. Extrait méthanolique	49
3.1.2.3. Extrait aqueux	50
3.2. Etude phytochimique quantitative.....	55
3.2.1. Métabolites primaires.....	55
3.2.1.1. Détermination de la teneur en matière sèche	55
3.2.1.2. Détermination de la matière organique et minérale	55
3.2.1.3. Lipides	55
3.2.1.4. Protéines	55
3.2.1.5. Sucres	57
3.2.2. Métabolites secondaires	58
3.2.2.2. Flavonoïdes	58
3.2.2.2. Tanins	58
3.2.2.3. Saponosides.....	58
3.2.2.4. Alcaloïdes	59
3.2.2.5. Huiles essentielles	59
4. Extraction des flavonoïdes	60
4.1. Préparation des extraits bruts méthanoliques	60
4.2. Fractionnement	61
4.3. Calcul du rendement en extrait sec	63
4.4. Dosage des polyphénols	63
4.5. Dosage des flavonoïdes	64
5. Chromatographie des extraits	65
5.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	65

Table des matières

5.2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC-DAD-ESI-MS).....	66
6. Evaluation des activités antioxydantes	67
6.1. Piégeage des radicaux DPPH'	67
6.2. Réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power).....	69
6.3. Test de peroxydation lipidique	70
7. Evaluation de l'activité antibactérienne	73
7.1. Préparation des solutions d'extraits	73
7.2. Souches utilisées	73
7.3. Revivification et contrôle de pureté des souches	74
7.4. Préparation des inoculums	74
7.5. Milieu de culture	74
7.6. Contrôle de qualité des souches : Antibiogramme	75
7.7. Préparation des disques	75
7.8. Tests microbiologiques	76
7.8.1. La méthode de diffusion des disques	76
7.8.2. Détermination de la CMI et la CMB par la méthode de microdilution	77
8. Analyse statistique	78
<i>CHAPITRE 03 : RESULTATS ET DISCUSSION</i>	
1. Analyse phytochimique	79
1.1. Analyse phytochimique qualitative.....	79
1.2. Analyse phytochimique quantitative	81
1.2.1. Métabolites primaires.....	81
1.2.2. Métabolites secondaires	84
2. Extraction des flavonoïdes.....	87
3. Teneur en phénols totaux et flavonoïdes des extraits secs	89
4. Chromatographie des fractions des flavonoïdes.....	93
4.1. Chromatographie sur couche mince.....	93
4.2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC-DAD-ESI-MS).....	98
5. Résultats de l'étude de l'activité antioxydante	109

Table des matières

5.1. Piégeage des radicaux DPPH	109
5.2. Réduction du fer : FRAP (Ferric reducing antioxidant power)	115
5.3. Peroxydation lipidique	120
5.4. Analyse de corrélation.....	124
6. Résultats du test du pouvoir antibactérien	127
6.1. Test préliminaire	127
6.2. Antibiogramme.....	128
6.3. Activité antibactérienne des extraits flavoniques.....	129
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	137
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	140
ANNEXES	

Liste des figures

Figure 01 : <i>Ajuga iva</i> . (A) la plante entière, (B) la fleur, (C) les feuilles et les fleurs	04
Figure 02 : <i>Adiantum capillus-veneris</i> dans la nature	06
Figure 03 : Photo de la plante <i>Lavandula stoechas</i> poussant dans la région de Nesmot (Mascara).....	08
Figure 04 : Les voies de formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et leur transformation	13
Figure 05 : Effet des radicaux libres sur les biomolécules (ADN, lipides, protéines).....	15
Figure 06 : Mécanisme d'action des antioxydants	18
Figure 07 : Classification des polyphénols	19
Figure 08 : Structure des acides phénoliques: acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques	20
Figure 09 : Structures chimiques de la coumarine simple et ses dérivés	21
Figure 10 : Structures chimiques des stilbènes	22
Figure 11 : Les monomères et classification des lignanes	23
Figure 12 : Squelette basique de la molécule de flavonoïde	24
Figure 13 : Diagramme de la voie de biosynthèse des flavonoïdes	25
Figure 14 : Les principales classes et sous classes de flavonoïdes et leurs sources naturelles	26
Figure 15 : Structure du squelette de base des flavonoïdes et de leurs classes	28
Figure 16 : Suppression de la réaction de Fenton par les flavonoïdes	33
Figure 17 : Sites de chélation possibles de la quercétine	34
Figure 18 : Mécanisme possible de l'effet de la quercétine sur l'homéostasie du fer intracellulaire	34
Figure 19 : Activité antiradicalaire du DPPH	35
Figure 20 : Production de superoxyde d'oxygène et de peroxyde d'hydrogène par la xantine oxydase	36
Figure 21 : Structure du flavonoïde avec les facteurs déterminants l'activité antioxydante ..	37
Figure 22 : Représentation schématique du mécanisme d'action des flavonoïdes	38
Figure 23 : Relation structure-activité des chalcones	44
Figure 24 : Relation structure-activité des Flavanes	44
Figure 25 : Relation structure-activité des Flavanols	44
Figure 26 : Relation structure-activité des Flavonols	44

Figure 27 : Relation structure-activité des flavanes	44
Figure 28 : Matériel végétale	47
Figure 29 : Représentation des tests phytochimiques à partir de l'extrait chloroformique ...	51
Figure 30 : Représentation des tests phytochimiques à partir de l'extrait méthanolique.....	52
Figure 31 : Représentation des tests phytochimiques à partir de l'extrait aqueux	53
Figure 32 : Etapes de l'extraction des flavonoïdes par la méthode de Merghem et <i>al.</i> , 1995.	62
Figure 33 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (mg/ml)	64
Figure 34 : Courbe d'étalonnage de catéchine (mg/ml)	65
Figure 35 : Forme libre et réduite du DPPH	67
Figure 36 : Test de DPPH	68
Figure 37 : Test de réduction du fer	70
Figure 38 : Test d'activité antiperoxydation lipidique	72
Figure 39 : Méthode de diffusion sur disque	76
Figure 40 : Détermination de la CMI et la CMB par la méthode de microdilution	77
Figure 41 : Teneur en métabolites primaires par rapport à la matière sèche (%)	82
Figure 42 : Répartition des valeurs moyennes des métabolites primaires	83
Figure 43 : Teneur en métabolites secondaires par rapport à la matière sèche (mg/100g). ...	85
Figure 44 : Rendements en huiles essentielles des trois plantes (%)	86
Figure 45 : Répartition des valeurs moyennes des métabolites secondaire	86
Figure 46 : Rendements en extrait sec des fractions des flavonoïdes (%)	88
Figure 47 : Répartition des valeurs moyennes des extraits secs	88
Figure 48 : Quantité moyenne des polyphénols en mg EAG/g E	91
Figure 49 : Quantité moyenne des flavonoïdes en mg EC/g E	91
Figure 50 : Box-plot des composants et des espèces	92
Figure 51 : Chromatogrammes résultant de l'analyse des fractions des flavonoïdes d' <i>A. iva</i> par chromatographie sur gel de silice (révélation à l'UV)	97
Figure 52 : Chromatogrammes résultant de l'analyse des fractions des flavonoïdes d' <i>A.</i> <i>capilus-veneris</i> par chromatographie sur gel de silice (révélation à l'UV).....	97
Figure 53 : Chromatogrammes résultant de l'analyse des fractions des flavonoïdes de <i>L.</i> <i>stoechas</i> par chromatographie sur gel de silice (révélation à l'UV)	98
Figure 54 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction hydrométhanolique d' <i>Ajuga iva</i>	99

Figure 55 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction acétate d'éthyle d' <i>Ajuga iva</i>	100
Figure 56 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction butanolique d' <i>Ajuga iva</i>	101
Figure 57 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction aqueuse d' <i>Ajuga iva</i>	102
Figure 58 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction hydrométhanolique d' <i>Adiantum capillus-veneris</i>	105
Figure 59 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction acétate d'éthyle d' <i>Adiantum capillus-veneris</i>	105
Figure 60 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction butanolique d' <i>Adiantum capillus-veneris</i>	105
Figure 61 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction aqueuse d' <i>Adiantum capillus-veneris</i>	106
Figure 62 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction hydromethanolique de <i>Lavandula stoechas</i>	107
Figure 63 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction acétate d'éthyle de <i>Lavandula stoechas</i>	108
Figure 64 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction butanolique de <i>Lavandula stoechas</i>	108
Figure 65 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction aqueuse de <i>Lavandula stoechas</i>	108
Figure 66 : Pouvoir antioxydant testé par la méthode de piégeage des radicaux DPPH des extraits flavonoïdiques d' <i>Ajuga iva</i>	110
Figure 67 : Pouvoir antioxydant testé par la méthode de piégeage des radicaux DPPH des extraits flavonoïdiques d' <i>Adiantum capillus-veneris</i>	112
Figure 68 : Pouvoir antioxydant testé par la méthode de piégeage des radicaux DPPH des extraits flavonoïdiques de <i>Lavandula stoechas</i>	113
Figure 69 : Box-plot des extraits et des espèces.....	115
Figure 70 : Pouvoir réducteur des flavonoïdes d' <i>Ajuga iva</i> testé par la méthode FRAP	116
Figure 71 : Pouvoir réducteur des flavonoïdes d' <i>Adiantum capillus-veneris</i> testé par la méthode FRAP	117
Figure 72 : Pouvoir réducteur des flavonoïdes de <i>Lavandula stoechas</i> testé par la méthode FRAP	118
Figure 73 : Box-plot des extraits et des espèces.....	119

Figure 74 : Pouvoir antioxydant des flavonoïdes d' <i>Ajuga iva</i> testé par la méthode de peroxydation lipidique	120
Figure 75 : Pouvoir antioxydant des flavonoïdes d' <i>Adiantum capillus-veneris</i> testé par la méthode de peroxydation lipidique	121
Figure 76 : Pouvoir antioxydant des flavonoïdes de <i>Lavandula stoechas</i> testé par la méthode de peroxydation lipidique	122
Figure 77 : Box-plot des extraits et des espèces.....	123
Figure 78 : Photos montrant l'effet de DMSO (100%, 50%, 25%, 12,5%) sur la culture de trois souches bactériennes	128

Liste des tableaux

Tableau 01 : Rôle des flavonoïdes dans les pathologies humaines et leurs mécanismes thérapeutiques	29
Tableau 02 : Lieu de récolte des plantes et caractéristiques géographiques des stations d'études	48
Tableau 03 : Antibiotiques choisis pour l'antibiogramme	75
Tableau 04 : Analyses phytochimiques qualitatives des extraits chloroformiques	80
Tableau 05 : Analyses phytochimiques qualitatives des extraits méthanoliques	80
Tableau 06 : Analyses phytochimiques qualitatives des extraits aqueux	81
Tableau 07 : Résultat de la chromatographie sur couche mince des extraits d' <i>Ajuga iva</i>	94
Tableau 08 : Résultat de la chromatographie sur couche mince des extraits d' <i>Adiantum capillus-veneris</i>	95
Tableau 09 : Résultat de la chromatographie sur couche mince des extraits de <i>Lavandula stoechas</i>	96
Tableau 10 : Identification par HPLC-DAD des composés phénoliques de l'extrait hydrométhanolique d' <i>Ajuga iva</i>	99
Tableau 11 : Identification par HPLC-DAD des composés phénoliques de l'extrait acétate d'éthyle d' <i>Ajuga iva</i>	100
Tableau 12 : Identification par HPLC-DAD des composés phénoliques de l'extrait butanolique d' <i>Ajuga iva</i>	101
Tableau 13 : Identification par HPLC-DAD des composés phénoliques de l'extrait aqueuse d' <i>Ajuga iva</i>	102
Tableau 14 : Identification par HPLC-DAD des composés phénoliques des extraits d' <i>Adiantum capillus-veneris</i>	106
Tableau 15 : Identification par HPLC-DAD-ESI-MS des composés phénoliques des extraits de <i>Lavandula stoechas</i>	109
Tableau 16 : Valeurs des IC ₅₀ (µg/ml) trouvés pour les différents extraits des trois plantes étudiées	114
Tableau 17 : Valeurs des EC ₅₀ (µg/ml) trouvés pour les différents extraits des trois plantes étudiées	118
Tableau 18 : Valeurs des EC ₅₀ (µg/ml) trouvés pour les différents extraits des trois plantes étudiées	123
Tableau 19 : Coefficients de corrélation (r) de l'activité antioxydante	127
Tableau 20 : Résultats de l'antibiogramme des souches bactériennes testées	129

Tableau 21 : Activité antibactérienne des extraits d' <i>Ajuga iva</i>	134
Tableau 22 : Activité antibactérienne des extraits d' <i>Adiantum capillus-veneris</i>	134
Tableau 23 : Activité antibactérienne des extraits de <i>Lavandula stoechas</i>	134

Liste des abréviations

AFNOR: Association Française de Normalisation.

APL : Antiperoxydation lipidique

CCM : Chromathographie sur couche mince

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DMSO: DiMethyl Sulfoxyde.

DO : Densité optique

DPPH : 1,1 Diphényl 2 Pycril Hydrazil

DPPH: 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyle.

EAc : Extrait acétate d'éthyle

EAq : Extrait aqueux

EBr : Extrait brut

EBt : Extrait butanolique

EC₅₀ : Concentration efficace médiane

FRAP : Ferric reducing-antioxidant power

HPLC-DAD-ESI-SM : Chromatographie liquide haute performance couplée spectre de masse

IC₅₀ : Concentration inhibitrice médiane

LDL: Low density lipoprotein.

LPS: Lipopolysaccharide

Rf : Rapport frontal

Introduction générale

La démographie mondiale croissante a un retentissement sur le stress environnemental, comme la biodiversité et la contamination de l'air et de l'eau. Les contraintes physiques et psychologiques provoquent le stress oxydatif et perturbent l'homéostasie. Néanmoins, le système de défense antioxydant et les mécanismes de protection sont importants pour permettre à l'organisme de se protéger (Herrera *et al.*, 2009).

Aujourd'hui, le stress oxydatif a attiré l'attention de différents chercheurs. Un déséquilibre entre les radicaux libres et les antioxydants conduit à des dommages protéiques, lipidiques et des acides nucléiques. Les antioxydants protègent l'organisme de l'effet nocif des radicaux libres. La diététique, en particulier les antioxydants dans la nourriture, réduit les effets néfastes des espèces réactives de l'oxygène et régule le stress. Par conséquent, il est nécessaire de comprendre comment les antioxydants présents dans les nutriments exercent leurs effets protecteurs sur la santé (Adwas *et al.*, 2019).

Par le biais de la réaction de Fenton, le traitement par des antibiotiques bactéricides pouvait entraîner une augmentation du stress oxydatif. L'appauvrissement des capacités antioxydantes pourrait donc protéger les bactéries contre à la fois de la réponse immunitaire de l'hôte et de l'antibiothérapie. L'utilisation des antibiotiques est une pratique commune dans le traitement des infections nosocomiales (Manga *et al.*, 2021).

En plus des mesures de surveillance des résistances bactériennes et des politiques sur la réglementation du bon usage des antibiotiques, le renouvellement de l'arsenal des molécules anti-infectieux est devenu une des priorités pour faire face à ce problème de santé publique émergent. A l'instar de certains micro-organismes tel que *Penicillium* ou *Streptomyces* qui ont servi de source d'antimicrobiens, certaines plantes ont depuis plusieurs siècles été utilisées par la médecine traditionnelle pour lutter contre les infections (Moroh, 2013)

Face à ces difficultés et à ces défis, il est urgent de rechercher de nouvelles molécules ou de nouveaux composés antioxydants et antimicrobiens d'origine végétale qui présentent un large spectre d'activité contre les espèces bactériennes et une capacité à réduire les dommages dus au stress oxydant. Plusieurs horizons s'ouvrent dans ce sens dont la thérapie par les plantes « Phytothérapie » qui signifie la thérapie par les plantes ayant des propriétés thérapeutiques que l'on appelle alors plantes médicinales (Colalto, 2018).

Depuis des siècles, les plantes médicinales sont utilisées par les populations algériennes pour soigner plusieurs maladies. La flore Algérienne est riche en plantes médicinales et aromatiques, en raison de sa diversité climatique et géographique (Hamza et *al.*, 2019).

Notre étude s'est orientée vers les plantes médicinales pour contribuer ainsi à la quête de nouvelles substances antimicrobiennes et antioxydantes. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à l'étude de trois plantes, qui se propagent spontanément dans la région ouest de l'Algérie: *Ajuga iva*, *Lavandula stoechas* et *Adiantum capillus-veneris*. La sélection des espèces étudiées n'est pas aléatoire, mais repose sur différents critères. Le plus important est leur emploi dans la médecine traditionnelle ou populaire et leur mise à disposition.

Dans un premier temps, nous avons abordé les connaissances bibliographiques actuelles avec quatre rubriques principales : présentation botanique des trois plantes, généralités sur les flavonoïdes, stress oxydatif et la résistance aux antibiotiques. Dans un deuxième temps, nous avons entamé la partie expérimentale, où nous avons procédé à l'application de différentes méthodes utilisées pour :

- Une analyse phytochimique des métabolites primaires et secondaires, qualitative et quantitative,
- Préparation des extraits flavoniques,
- Dosage des polyphénols et des flavonoïdes,
- Analyse des constituants chimiques des extraits riches en flavonoïdes par HPLC-DAD-ESI-MS,
- Evaluation du potentiel antioxydant des extraits flavoniques par trois méthodes : la capture des radicaux libres par le DPPH, la méthode de réduction du fer et la technique de peroxydation lipidique,
- Etude du pouvoir antibactérien des flavonoïdes vis-à-vis de certaines souches bactériennes et détermination de CMI et la CMB,
- Etude statistique des résultats.

Dans la partie résultats et discussion, nous avons exposé et discuté les résultats obtenus dans cette étude. Pour finir, une mise au point rapportant les résultats principaux d'un point de vue scientifique, ainsi que les perspectives, complétant notre document.

Chapitre 01

Revue bibliographique

Dès les premiers temps, l'homme a tenté d'apaiser ses maux et de diminuer ses douleurs. Pour y parvenir, il a recours aux produits qui lui sont à peu, il a su distinguer les caractéristiques des plantes, leurs vertus et leur nocivité. Toutes les immédiatement accessibles. Le règne végétal a été son premier champ thérapeutique. Peu anciennes civilisations : Mésopotamienne, égyptienne, chinoise, indienne, précolombienne possédaient un éventail impressionnant de remèdes végétaux (Fouché *et al.*, 2000).

Avant d'entamer notre travail expérimental sur trois plantes médicinales appartenant à des familles différentes : *Ajuga iva*, *Adiantum capillus-veneris* et *Lavandula stoechas*, nous allons exposer un rappel sur les plantes médicinales, ses métabolites secondaires et leurs activités biologiques.

1. Les plantes médicinales choisies

1.1. La plante médicinale *Ajuga iva* L.

1.1.1. Description de la plante

Ajuga iva (chendgoura) appartient à la famille des Lamiaceae. C'est une petite plante vivace de goût amer de 5-10 cm, à tiges vertes rampantes et velues, à feuilles vertes de 14-25 mm de longueur, linéaires, denses et couvertes de duvets (figure 01). Les fleurs sont violettes, roses, ou jaunes, de 20 mm de longueur, la lèvre supérieure de la corolle est réduite ou absente et la lèvre inférieure est divisée en trois lobes velus. Les lobes latéraux sont petits, alors que le lobe central est relativement plus large décoré dans sa base par un axe central jaunâtre avec des spots de la même couleur de la fleur, généralement en violet. A l'intérieur de la fleur il y a quatre étamines liées à quatre carpelles noirs. Les graines sont marrons et ont la taille des graines de *Nigella sativa* (Halimi, 2004).

Cette plante aromatique se développe dans le sol profond des terres fraîches à 2700 m de hauteur, dans la période étendue du printemps jusqu'à la fin de l'été. La période de floraison est entre Mai et Juin (Batanouny *et al.*, 1999 ; Halimi, 2004). Elle est largement distribuée dans la région méditerranéenne: le sud de l'Europe et le nord de l'Afrique, en particulier en Algérie, Maroc, Tunisie, et en Egypte (Halimi, 2004).

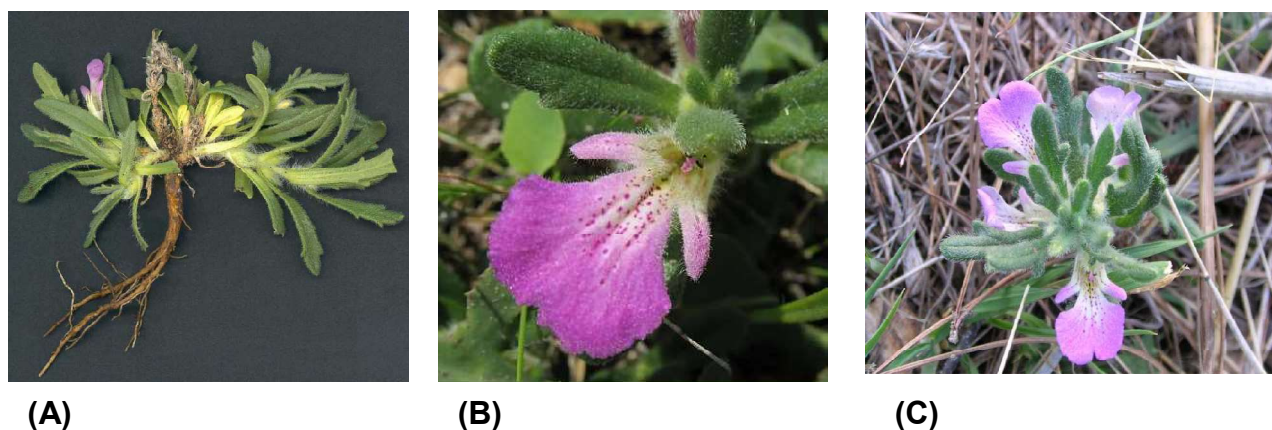


Figure 01: *Ajuga iva*. (A) la plante entière, (B) la fleur, (C) les feuilles et les fleurs (Salem *et al.*, 2016)

1.1.2. Composition chimique de la plante

Les flavonoïdes et les tannins se trouvent en grande quantité dans l'*Ajuga iva* (El Hilaly *et al.*, 2004 ; Boudjelal *et al.*, 2015). Elle contient aussi les anthocyanes, les acides phénoliques et d'autres substances en particulier l'ajugarine (Halimi, 2004). Bouyahyaa *et al.* (2020) ont marqué la présence de nombreux composés chimiques tels que la 20-hydroxyecdysone, la cyasterone, l'ajugastérone, le dihexoside d'apigénine, l'apigénine, le carvacrol, l'ecdystérone, l'acide palmitique dans différentes parties de l'*A. iva*. Ghedira *et al.* (1991) ont rapporté l'isolement et l'élucidation de la structure de deux flavonoïdes communs, l'apigénine 7-O-néohesperidoside et la naringine (naringénine 7-O-rutinoside). Les études ont montré que l'ivette contient les trois majeurs ecdystéroïdes (makisterone A, 20-hydroxyecdysone et cyasterone), en plus du 24,28-dehydromakisterone A et les deux nouveaux phytoecdystéroïdes (22-oxocyasterone et 24,25-dehydroprecyasterone). Elle contient aussi le 2-deoxy-20-hydroxyecdysone, le polypodine B et le 14,15-dihydroajugapitine (Bondi *et al.*, 2000). Ben Jannet *et al.* (1999) ont isolé les ivaïdes A, B et C d'*Ajuga iva*. Les cicatrisants (externes), les diterpénoïdes (clérodane), les iridoïdes et saponosides acides sont aussi des composés chimiques que les chercheurs les trouvent dans l'*Ajuga iva*, elle est très riche en fer (Ben Jannet *et al.*, 2000). Stocker et son équipe (2004) ont trouvé une autre classe de polyphénols, à savoir des dérivés de l'acide hydroxycinnamique, dans l'extrait hydroalcoolique des parties aériennes de cette plante.

1.1.3. Utilisation traditionnelle de la plante

En médecine traditionnelle, *Ajuga iva* (L.) est utilisée entière sans racines. En Algérie, elle est employée, après macération aqueuse de plusieurs jours ou en poudre, pour traiter le diabète et l'hypertension. Elle est aussi consommée en poudre sèche ou avec du miel pour surmonter son goût amer, pour traiter les troubles gastro-intestinales et contre l'ulcère de l'estomac (El Hilaly *et al.*, 2004).

En usage externe, elle est souvent employée en applications locales contre les rhumatismes, et comme antiseptique et cicatrisante sur les plaies. D'autre part, la macération ou l'infusion serait utile pour débarrasser le cuir chevelu des parasites. En plus, elle a un effet antifongique et antimicrobien (Ben Jannet *et al.*, 2000).

1.1.4. Propriétés biologiques de la plante

Chenni et ses collaborateurs (2007) ont étudié l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* qui diminue les endommagements issus du stress oxydatif chez les rats traités par des doses élevées de cholestérol. Et comme les flavonoïdes et les iridoïdes ont été isolés de cette plante (Ghedira *et al.*, 1991), il a été suggéré que la défense antioxydante chez les rats hypercholestérolémiques traités par *Ajuga iva* peut être dû à ces composés. Les résultats des recherches d'El-Hilaly et Lyoussi (2002) et d'El-Hilaly *et al.* (2006) suggèrent que *Ajuga iva* peut être considérée comme un agent anti-diabétique et hypolipidémique chez l'homme. L'extrait méthanolique d'*Ajuga iva* a présenté une activité inhibitrice remarquable contre les enzymes digestives clés liées au diabète de type 2, avec un effet inhibiteur plus puissant contre l' α -glucosidase et une inhibition considérable contre l' α -amylase (Fettach *et al.*, 2019). En 2004, El-Hilaly *et al.* ont trouvé que l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* a des propriétés vasodilatatrices et est donc considéré comme agent anti-hypertensif.

L'extrait aqueux d'*Ajuga iva* a présenté un effet antihypertenseur chez le SHR-SP et provoque une diminution de la contraction vasculaire à la noradrénaline (El-Hilaly *et al.*, 2021). Les études de Pascual-Villalobos et Robledo (1999) ont montré que l'extrait aqueux de *Ajuga iva* inhibe la croissance de la larve *Tribolium castaneum* (70-100% de mortalité). Les huiles essentielles isolées de l'ivette ont une activité antibactérienne contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa* (Chouitah *et al.*, 2017). Egalement, les résultats de Ladjimi *et al.* (2020)

soulignent la capacité des feuilles, en tant que piègeurs et chélateurs de fer, à exercer un effet antioxydant direct et secondaire en empêchant la réaction de Fenton.

1.2. La plante médicinale *Adiantum capillus-veneris* L.

1.2.1. Description de la plante

Le capillaire appartient à la famille des Adiantaceae (Ahmed et *al.*, 2012). C'est une fougère à frondes d'un vert tendre, portées par des rachis noirs, luisants, lisses, grêles et fins comme des cheveux (d'où le nom de capillaire), 2-4 pennées, de 15-25 mm de long ; à segments ultimes pétillés, en forme de coin, à bords latéraux droits, à marge supérieure plus ou moins lobée, sores presque droits, non enfoncés dans les sinus (figure 02) (Mohammed, et *al.*, 2019).

Le capillaire croit dans les endroits humides, il aime surtout les fentes des rochers, les bords des ruisseaux, les grottes qu'il tapisse de sa belle verdure, il est souvent cultivé chez les fleuristes comme plante d'appartement et d'ombrière (Ahmed et *al.*, 2012).

Il est largement distribué dans la région méditerranéenne: le sud de l'Europe et le nord de l'Afrique (Halimi, 2004).



Figure 02 : *Adiantum capillus-veneris* dans la nature (Mohammed, et *al.*, 2019)

1.2.2. Composition chimique de la plante

Le capillaire contient des sucres, des gommes et mucilages, très peu de tanin, une essence volatile à odeur agréable, triterpenoïdes, des flavonoïdes, propanoïdes phényle, stéroïdes, acides alicycliques (Yoshiaki & Yoshio, 1999). Les travaux ont montré que la

plante est très riche en lipides et les chercheurs ont isolé et identifié le Diacylglyceryl-O-4'-(N,N,N-triméthyl)-homoserine le monogalactosyldiacylglycero et l'acide hexadecatricoïque (Naoki & Masaki, 1984).

Les feuilles de l'*Adiantum capillus-veneris* ont été signalées comme contenant différents flavonoïdes parmi lesquels la rutine, la quercétine, quercétine-3-O-glucoside, quercitrone, isoquercitrine, nicotiflorine, naringine, astragaline, populnine, procyanidine, prodelphinidine kaempferol-3-sulfate, acide *p*-coumarique et acide rosmarinique (Singh et al., 2020). Zedan et al. (2011) ont isolé quatre types de terpénoïdes à partir de l'extrait hexanique (isoadiantone, isoadiantol-B, 3-méthoxy-4-hydroxyfilicane et 3,4-dihydroxyfilicane). Quatre esters sulfatés de dérivés d'acide hydroxycinnamique-sucre ont été isolés des frondes d'*A. capillus-veneris* L. Ces composés se sont révélés être le 6-sulfate *p*-coumarylglycose, le 2- sulfate *p*-coumarylglycose, le 3-sulfate caffeylgalactose et le 6-sulfate caffeylgalactose (Al-Snafi et al., 2015)

1.2.3. Utilisation traditionnelle de la plante

Adiantum capillus-veneris était l'une des espèces les plus communes avec une importance potentielle pour des fins médicinales et nutritives. Les espèces d'*Adiantum* étaient utilisées pour les problèmes de poitrine, la toux et le rhume, comme expectorant, pour augmenter la lactation, pour aider la fonction rénale, comme antiparasite et pour les pellicules. L'infusion du capillaire est très efficace contre l'allègement de la chaleur interne ou de la fièvre, l'amélioration de la miction, l'élimination des calculs urinaires (Pan et al., 2011).

1.2.4. Propriétés biologiques de la plante

Les études de Zedan et son équipe (2011), ont montré l'effet anti-inflammatoire et hypoglycémiant des extraits alcooliques d'*A. capillus-veneris*. Le capillaire a d'autres activités contre plusieurs maladies y compris les maladies infectieuses (Meenakshi et al., 2007), jaunisse et hépatite (Abbasi et al., 2009), des effets analgésiques et antioxydants (Ming-Zhu et al., 2011). Dans des études antérieures, des extraits éthanoliques d'*A. capillus-veneris* ont été rapportés comme ayant des effets antiprolifératifs sur les cellules du carcinome gastrique humain SGC-7901 et un effet protecteur de l'ADN (Mohammed et al., 2019). L'extrait éthanolique du rhizome d'*Adiantum capillus-veneris* a présenté une activité antivirale *in vitro* contre le virus de la stomatite vésiculaire (Al-Snafi, 2015). L'activité antilithiasique *in vitro* de l'extrait hydroalcoolique d'*A. capillus-veneris* a été évaluée par des tests de cristallisation,

d'agrégation et de nucléation. Ces tests ont montré que l'extrait inhibait significativement la cristallisation et l'agrégation, ce qui a été confirmé par une étude *in vivo* contre l'urolithiase induite par l'éthylène glycol (0,75%) et le chlorure d'ammonium (1%) chez des rats Sprague Dawley mâles (Ahmed et al., 2013).

1.3. La plante médicinale *Lavandula stoechas* L.

1.3.1. Description de la plante

Lavandula stoechas appartient à la famille des Lamiaceae. C'est une plante tendre, qui préfère les endroits ensoleillés et les sols riches, les tiges étroites sont quadrangulaires à feuilles opposées, tendent à être plus vertes que grise, à son extrémité une inflorescence terminée par un toupet de longue bractées violettes (figure 03) (Chu & Kemper, 2001). Largement distribué dans les îles canari, Islande et à travers tout le tell méditerranéen, l'Afrique du Nord, Sud West de l'Asie, Afrique tropicale avec une disjonction vers l'Inde (Mohd et al., 2016).

Plusieurs espèces du genre *Lavandula* se développent à l'état sauvage dans le sol rocheux de l'Afrique. Actuellement, sont cultivés dans le sol calcaire des pays méditerranéens (Chu & Kemper, 2001).



Figure 03 : Photo de la plante *Lavandula stoechas* poussant dans la région de Nesmoth (Mascara)

1.3.2. Composition chimique de la plante

Lavandula stoechas L. renferme comme composés phytochimiques : alpha pinène, beta pinène, beta santalène, borneol, camphre, caryophyllène, coumarine, geraniol, limonène, linalol, luteoline, 1,8-cineol, acide rosmarinique, tannin, umbellifère, acide ursolique et de

nombreux autres composés tels que les flavonoïdes. Les flavonoïdes principaux de *L. stoechas* sont : apigénine 7-glucoside, lutéoline, lutéoline 7-glucoside et lutéoline 7-glucuronide (Upson et al., 2000). *L. stoechas* possède un rendement en huile essentielle très important varie d'une région à l'autre (Goren et al., 2002).

1.3.3. Utilisation traditionnelle de la plante

La lavande a été traditionnellement utilisée comme plante aromatique, culinaire, décoratif, cosmétique et dans des buts médicaux. La plante est employée comme expectorant, antispasmodique, carminatif, bon désinfectant des plaies. L'huile employée comme remède contre les affections du colon, soulager les maux de tête (Goren et al., 2002). En Algérie, elle est utilisée dans le cas des brûlures, dépressions, psoriasis et problèmes dermiques (Sebai et al., 2014),

1.3.4. Propriétés biologique de la plante

L'activité anti-inflammatoire de la lavande est étudiée par Zuzarte et al. (2013). Les résultats ont montré que l'huile essentielle a réduit de manière significative la production de nitrite dans des cultures cellulaires sans causer de dommages cellulaires. Les caractéristiques antioxydantes des composés phénoliques de *L. stoechas* sont principalement attribuées à leur capacité à éliminer les radicaux libres, ils réduisent le stress oxydatif induit chez les rats diabétiques (Sebai et al., 2014) et ont des effets hépatoprotecteurs et rénoprotecteurs contre le stress oxydatif induit par le malathion chez les jeunes souris mâles (Selmi et al., 2015). Les extraits hydrométhanoliques présentent des effets antispasmodiques et sédatifs (Gilani et al., 2000). Les huiles essentielles présentent des activités antibactériennes, antivirales et antifongiques et se sont révélées être de puissants agents thérapeutiques (Shikha, 2015).

Les plantes médicinales présentent une gamme variée d'activités biologiques et peuvent être exploitées efficacement pour gérer les maladies. Les approches nutritionnelles et botaniques, combinées, peuvent constituer des outils puissants pour lutter contre toute une série d'infections. La médecine traditionnelle peut offrir une multitude de possibilités intéressantes pour combattre la résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance bactérienne aux antibiotiques est apparue rapidement après leur introduction dans le traitement des maladies infectieuses. Cette résistance est un facteur

majeur compliquant le traitement des infections bactériennes et la dissémination des souches multi-résistantes.

2. Antibiorésistance

2.1. Définition d'un antibiotique

Les antibiotiques sont des substances chimiques produites par les bactéries du sol et certains champignons, dont l'activité s'exprime à très faible dose et de manière spécifique, en inhibant certains mécanismes importants. Les antibiotiques qui sont extraits d'organismes vivants sont d'origines naturelles. Ils sont également susceptibles d'être obtenus par synthèse chimique totale ou partielle (Demore et *al.*, 2012).

Chaque antibiotique a un mode d'action spécifique. En fonction de leur concentration et du temps de contact avec la bactérie, ils peuvent détruire la bactérie (effet bactéricide) ou bloquer sa reproduction (effet bactériostatique) en agissant sur une ou plusieurs des étapes métaboliques nécessaires à la vie bactérienne (Montserrat-Martinez et *al.*, 2019).

2.2. La résistance aux antibiotiques

Suite à une période de haute efficacité dans la lutte contre les maladies infectieuses, les antibiotiques sont de moins en moins efficaces face à certaines infections bactériennes. Après la découverte de la pénicilline, Abraham et Chain (1940) ont mis en lumière une résistance d'*Escherichia coli* à cet antibiotique. Les bactéries se transforment et deviennent résistantes aux antibiotiques.

Les définitions existantes de la résistance aux antibiotiques sont très variées. La résistance est exprimée en termes de caractéristiques phénotypiques et/ou génotypiques des bactéries, et peut être classée en deux catégories : l'origine et le type de résistance. Généralement, la résistance aux antibiotiques est définie dans un contexte clinique, plutôt que comme un aspect épidémiologique (Demore et *al.*, 2012). Ici nous donnons quelques définitions éditées de la résistance aux antibiotiques :

- La propriété d'un micro-organisme à résister à un antibiotique (HMSO, 1999)
- Une caractéristique des bactéries qui leur confère la capacité d'inactiver ou d'exclure les antibiotiques, ou un mécanisme qui bloque les effets inhibiteurs ou meurtriers des antibiotiques (Harrison & Lederberg, 1998)

- Pour que l'antibiotique soit efficace, il doit entrer en contact avec les bactéries, ce qui impose de prendre en compte des critères pharmacologiques tels que la posologie, la voie d'administration, la distribution tissulaire et le métabolisme moléculaire. Ensuite, il doit pénétrer dans la bactérie au lieu d'être détruit ou modifié et fixé sur la cible, détruisant ainsi la fonction physiologique de la bactérie. Si les conditions ne sont pas réunies, même si les antibiotiques sont utilisés correctement, ils sont sans efficacité. Ce phénomène est appelé résistance (Demore et *al.*, 2012)

2.3. Types de résistance bactériennes

Le support génétique de la résistance aux antibiotiques est porté par des chromosomes bactériens ou des plasmides. Les gènes de résistance sont utiles aux bactéries, se transfèrent facilement et sont souvent portés par des éléments génétiques mobiles. Il existe deux principaux types de résistance aux antibiotiques : la résistance intrinsèque ou naturelle et la résistance acquise (Monserrat-Martinez et *al.*, 2019).

2.3.1. La résistance naturelle

La résistance intrinsèque ou la résistance naturelle à un antibiotique donné est une caractéristique qui existe dans toutes les souches de la même espèce ou du même genre de bactéries. Elle définit le champ d'action des antibiotiques. Par exemple, les bacilles à Gram négatif ont une résistance naturelle aux antibiotiques hydrophobes car ces molécules ont des difficultés à traverser la membrane externe de leurs parois (Les esters, les lincosamides, les streptomycines, etc.), les mycoplasmes et les bactéries sans paroi ont une résistance naturelle aux β -lactamines car le mode d'action de cette famille d'antibiotiques comprend l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane (Blair et *al.*, 2015).

2.3.2. La résistance acquise

La résistance acquise des bactéries aux antibiotiques est un phénomène qui se produit dans les souches d'une espèce donnée et qui est généralement sensible à tels antibiotiques. L'acquisition de facteurs génétiques entraîne une diminution de la sensibilité à ses molécules létales. Dans certains cas, il peut s'agir de la grande majorité de ces souches, comme la production de pénicillinase chez *Staphylococcus* qui implique plus de 90 % des souches. Génétiquement parlant, la résistance peut être acquise de deux manières complètement

différentes. Soit c'est une mutation dans le génome, on parlera de transmission verticale aux générations futures, soit c'est un transfert horizontal pour obtenir des informations génétiques étrangères à partir d'autres bactéries (Demore et *al.*, 2012).

2.4. Appauvrissement de l'arsenal thérapeutique

Si les bactéries finissent par devenir multirésistantes aux antibiotiques que nous possédons, il est certain que de multiples cas d'impasse thérapeutique s'imposeront à nous. La mise au point d'une antibiothérapie n'est plus un investissement concurrentiel car les cibles moléculaires au sein d'une bactérie deviennent de jour en jour difficiles à identifier (Andremont & Tibon-Cornillot, 2007)

Dans l'attente du développement et de l'optimisation d'autres modalités de lutte contre les bactéries, il est clair que l'anticipation de l'adaptation des bactéries ne peut se définir que par le renouvellement de l'arsenal thérapeutique des molécules antimicrobiennes. Dès lors, la recherche de ces molécules dans les plantes médicinales pourrait être une piste de développement intéressante (Blair et *al.*, 2015).

2.5. Les plantes comme source alternative des antimicrobiens

Les plantes sont les plus grands entrepôts biochimiques et pharmaceutiques jamais connus sur notre planète. Ces réserves vivantes sont capables de générer une variété de composés biochimiques. Dans la vie quotidienne, l'être humain et les animaux n'utilisent qu'une petite partie (1 à 10 %) des plantes disponibles sur terre (Cowan, 1999).

Les plantes médicinales produisent une grande variété de métabolites secondaires ayant des propriétés antimicrobiennes tels que les saponines, les tanins, les alcaloïdes, terpénoïdes et les flavonoïdes (Cowan, 1999).

En fait, ces métabolites secondaires peuvent agir comme de puissants antioxydants et avoir des effets bénéfiques en tant que piègeurs de radicaux libres et limitant le stress oxydatif.

3. Radicaux libres, stress oxydant et antioxydant

3.1. Radicaux libres

Dans les différents domaines de la biologie et de la médecine, les radicaux libres sont plus généralement connus sous le nom d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou d'espèces réactives de l'azote (ERA). Les radicaux libres sont des molécules ou des fragments de molécules contenant un ou plusieurs électrons non appariés, dont la présence les rend très réactifs (Poprac et al., 2017).

Bien que les radicaux libres soient très réactifs, la plupart d'entre eux ont une demi-vie très courte, inférieure à 10^{-6} s dans les systèmes biologiques (Alkadi, 2020). Ils sont classés en deux grandes catégories, qui comprennent les radicaux libres et les radicaux non réactifs. Les radicaux libres comprennent le radical d'oxyde nitrique (NO^\bullet), le radical hydroxyl (OH^\bullet), le radical ionique superoxyde (O_2^\bullet), les radicaux peroxyde (ROO^\bullet), alcoxyde (RO^\bullet) et une forme d'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$). Ces espèces sont très réactives et capables d'exister de manière indépendante (Halliwell, 1999). Les radicaux non réactifs sont un groupe de composés qui ne sont pas des radicaux mais sont extrêmement réactifs ou peuvent facilement être convertis en espèces réactives. Des exemples de ces substances comprennent l'acide hypochloreux (HClO), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les peroxydes organiques, les aldéhydes, l'ozone (O_3), et O_2 (figure 04) (Poprac et al., 2017).

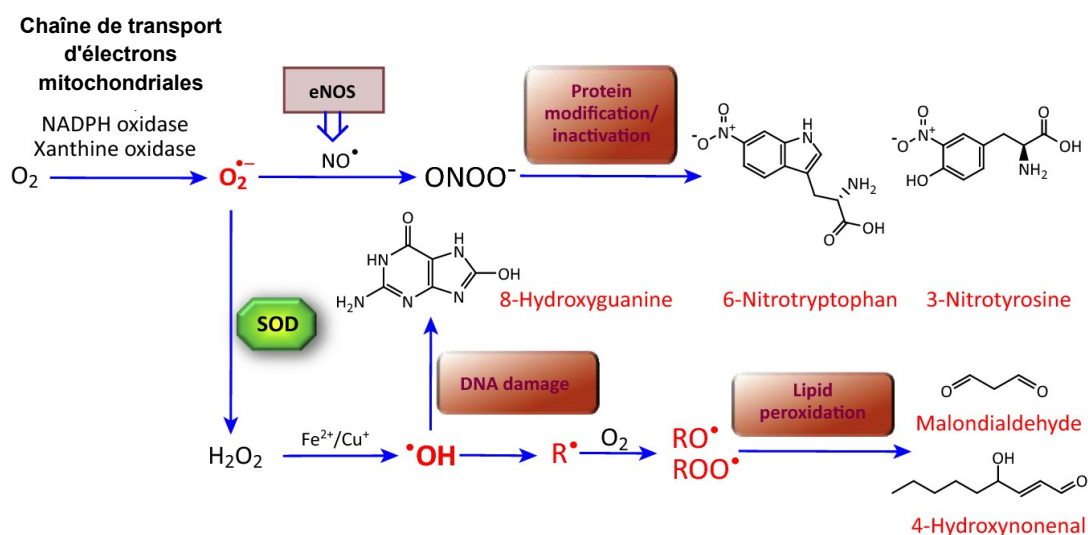


Figure 04 : Les voies de formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et leur transformation (Poprac et al., 2017)

Les radicaux libres peuvent provenir soit de l'environnement, de processus physiologiques ou de sources endogènes (Sultan, 2014).

Les plus importantes sources exogènes de radicaux libres sont : polluant environnemental, fumée de cigarette, consommation d'alcool, radiations, ozone, rayons ultraviolets, pesticides, anesthésiques, certains médicaments, solvants industriels.

Les sources endogènes comprennent les processus dans les organismes vivants qui nécessitent des réactions enzymatiques. Il s'agit notamment des réactions impliquées dans la chaîne respiratoire, système du cytochrome P450, phagocytose, synthèse des prostaglandines, inflammation et les voies de l'arachidonate. De même, les réactions impliquant le fer et d'autres métaux de transition, les peroxyosomes, la xanthine oxydase, etc. sont aussi des sources endogènes de radicaux libres (Jamshidi-Kia et *al.*, 2020).

Certains processus ou états physiologiques comme le stress, les émotions, le vieillissement, l'état psychique et les maladies sont également responsables de la formation de radicaux libres (Sultan, 2014).

Au cours des deux dernières décennies, de nombreuses preuves ont mis en évidence l'implication des processus médiés par les radicaux libres dans une grande variété de maladies humaines. Lorsque les molécules d'oxygène se divisent en atomes simples avec des électrons non appariés, elles se transforment en radicaux libres instables qui tentent de trouver d'autres molécules ou atomes auxquels se lient. Si cette situation se prolonge, le stress oxydatif peut se déclencher (Jamshidi-Kia et *al.*, 2020).

3.2. Stress oxydatif

Lorsqu'ils sont produits en excès, les radicaux libres génèrent un phénomène appelé stress oxydatif, un processus délétère qui peut sérieusement altérer les membranes cellulaires et d'autres structures telles que les protéines, les lipides et l'acide désoxyribonucléique (ADN). Le stress oxydatif peut survenir lorsque les cellules ne peuvent pas détruire de manière adéquate l'excès de radicaux libres formés. En d'autres termes, le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre la formation et la neutralisation des ERO/ERA (Sultan, 2014).

3.2.1. Conséquences moléculaires du stress oxydatif

Un afflux incessant des ERO/ERA de sources endogènes et exogènes mènent à des dommages oxydatifs des composants cellulaires. Les cibles biologiques les plus vulnérables aux dommages oxydatifs sont les protéines, les enzymes, les membranes lipidiques et l'ADN (figure 05) (Singh et al., 2019).

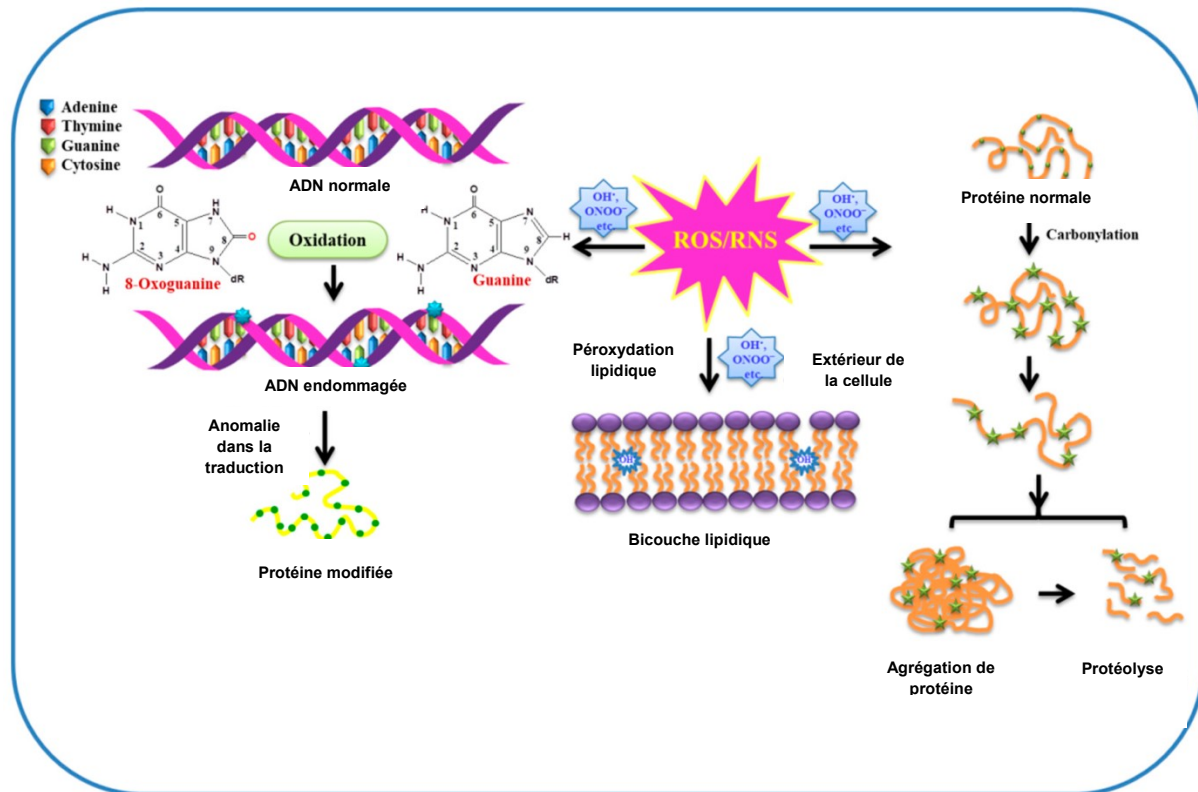


Figure 05 : Effet des radicaux libres sur les biomolécules (ADN, lipides, protéines)
(Singh et al., 2019)

Suite à l'interaction avec les radicaux libres, les protéines peuvent être attaquées directement en endommageant des résidus d'acides aminés spécifiques et en modifiant leurs structures tertiaires ou indirectement telles que la peroxydation, la dégradation et la fragmentation. Les conséquences de l'oxydation des protéines se traduisent par une perte d'activité enzymatique et une altération des fonctions cellulaires. Les produits d'oxydation sont généralement des cétones, des aldéhydes et des composés carbonyles (Singh et al., 2019).

Les lipides sont également des cibles éventuelles pour les oxydants. Les dommages lipidiques dus aux ROS sont connus sous le nom de peroxydation lipidique. L'oxydation des

lipides génère des hydroperoxydes, qui subissent ensuite une fragmentation pour produire une large gamme de produits intermédiaires, tels que l'isomère F2 α de la prostaglandine F2-isoprostanes (F2-IsoPs), et le malondialdéhyde (MDA) (Catalá, 2009).

Même si l'ADN est une molécule stable, les radicaux libres peuvent interagir avec elle et causent plusieurs formes de lésions, dont les ruptures simples et doubles de l'ADN, la modification des bases azotés, la perte de purines, les liaisons croisées ADN-protéines, les dommages au sucre désoxyribose et les dommages au système de réparation de l'ADN. Le radical hydroxyle est le plus destructeur qui affecte les acides nucléiques. Par exemple, OH \cdot peut attaquer la guanine et l'adénine pour donner un produit d'oxydation, 8-hydroxydeoxyguanosine et hydroxyadénine qui ont considérés comme des biomarqueurs de l'oxydation de l'ADN (Rahman et *al.*, 2012).

3.2.2. Stress oxydatif et maladies humaines

Le stress oxydatif a été impliqué dans plusieurs maladies, notamment l'athérosclérose, le cancer, le paludisme, la polyarthrite rhumatoïde, le syndrome de fatigue chronique et les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington (Rahman et *al.*, 2012 ; Surai et *al.*, 2019).

Des seuils élevés de radicaux libres tels que le 4-hydroxy-2,3-nonénel (HNE), l'acroléine, le malondialdéhyde (MDA) et les F2-isoprostanes ont été enregistrés dans la maladie d'Alzheimer. Il a également été signalé que les ERO endommagent les composants cellulaires dans le cartilage, ce qui aboutit à l'ostéoarthrite et comme participant à la destruction des cellules des îlots de Langerhans du pancréas. De ce fait, l'hyperglycémie déclenche la production des ERO dans les cellules tubulaires et mésangiales du rein humain, ce qui modifie les fonctions et la structure des glomérules, causant une néphropathie diabétique (Găman et *al.*, 2020).

Les cellules vivantes doivent équilibrer efficacement le processus de formation des ROS/RNS pour maintenir leurs niveaux bas, mais toujours supérieurs à zéro. On sait depuis de nombreuses années que les cellules peuvent tolérer un léger stress oxydatif par une synthèse supplémentaire de divers antioxydants et en rétablissant l'équilibre redox antioxydant/prooxydant. Il s'agit principalement d'antioxydants, dont certains font partie du

mécanisme de régulation redox de l'organisme, tandis que d'autres sont issus de sources alimentaires (Surai et *al.*, 2019).

3.3. Les antioxydants

Les antioxydants sont des agents réducteurs qui peuvent ralentir ou arrêter les réactions d'oxydation directement en interagissant avec les intermédiaires de la réaction, ou en réagissant avec l'agent oxydant et en empêchant la réaction. Il existe deux types d'antioxydants : les antioxydants déjà présents dans notre corps, appelés antioxydants endogènes, et les antioxydants de l'environnement extérieur, appelés antioxydants exogènes (Jamshidi-Kia et *al.*, 2020).

3.3.1. Antioxydants endogènes

Les systèmes antioxydants protecteurs de l'organisme sont principalement des enzymes qui participent également aux processus de signalisation à médiation redox et contribuent à maintenir l'équilibre redox. Il existe cinq grandes familles d'enzymes antioxydantes cellulaires : Le système de la thiorédoxine, le système du glutathion, superoxyde dismutases, catalase et peroxyredoxines (Yadav et *al.*, 2016).

Les antioxydants non enzymatiques sont généralement des composés antioxydants de faible poids moléculaire qui peuvent protéger contre les dommages oxydatifs soit directement en interagissant avec les radicaux libres, soit indirectement en chélatant les métaux. Cependant, la concentration de ces molécules synthétisées par la cellule ou générées comme produits résiduels tels que les dipeptides d'histidine, le glutathion, l'acide urique, l'acide lipoïque et la bilirubine est faible (Surai et *al.*, 2019).

3.3.2. Antioxydants exogènes

Les antioxydants exogènes peuvent être issus de sources naturelles, mais ils peuvent aussi être des composés synthétiques, comme le butylhydroxyanisole, butylhydroxytoluène, le gallate. Vitamine C, vitamine E, α -carotène, lycopéine, sélénium, polyphénol, glutathion, peroxydase, cystine sont les principales sources d'antioxydants exogènes. Les jus de fruits et les boissons chaudes contiennent des quantités considérables d'antioxydants (Yadav et *al.*, 2016).

Les études épidémiologiques ont montré à plusieurs reprises une corrélation inverse entre le risque de maladies humaines chroniques et la consommation de produits riches en polyphénols. Les groupes phénoliques des polyphénols sont aptes à capter un électron pour former des radicaux phénoxyles relativement stables (figure 06), perturbant ainsi les réactions d'oxydation en chaîne des composants cellulaires. Les polyphénols en tant qu'antioxydants, peuvent protéger les constituants cellulaires contre les dommages oxydatifs et, par conséquent, limiter le risque de diverses maladies dégénératives associées au stress oxydatif (Surai et *al.*, 2019).

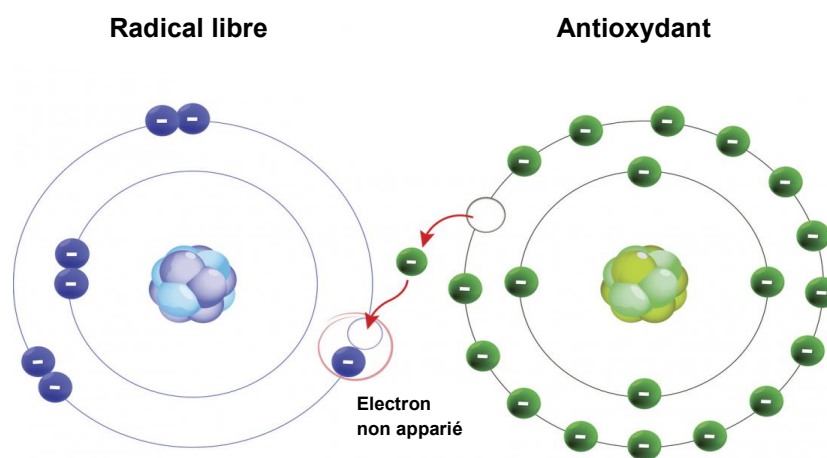


Figure 06: Mécanisme d'action des antioxydants (Jamshidi-Kia et *al.*, 2020)

Les polyphénols prennent une importance de plus en plus considérable, notamment en raison de leurs effets nocifs sur la santé. En effet, ils jouent un rôle important en tant qu'antioxydants naturels dans la prévention et le traitement du cancer et des maladies infectieuses (Jamshidi-Kia et *al.*, 2020).

4. Les polyphénols

4.1. Définition des polyphénols

Les polyphénols sont des produits naturels végétaux non nutritifs ou ce que l'on appelle des métabolites secondaires végétaux. Les polyphénols représentent une grande famille de composés provenant du métabolisme secondaire, très largement répandus dans le règne végétal. La principale définition utilisée est la suivante : Le terme "polyphénol" désigne les composés exclusivement dérivés de la voie du shikimate/phénylpropanoïde et/ou du polykétide, possédant plus d'une unité phénolique et dépourvus de fonctions azotées" (Hano & Tungmunnithum, 2020). Ce groupe de composés est hautement diversifié et comprend plusieurs sous-groupes de composés phénoliques, allant de substances assez simples, comme les acides phénoliques et les stilbènes, à des molécules hautement polymérisées, comme les tanins (Cherrak et al., 2016).

4.2. Classification des polyphénols

D'après Hano et Tungmunnithum (2020), Les principales classes de polyphénols naturels sont (figure 07) :

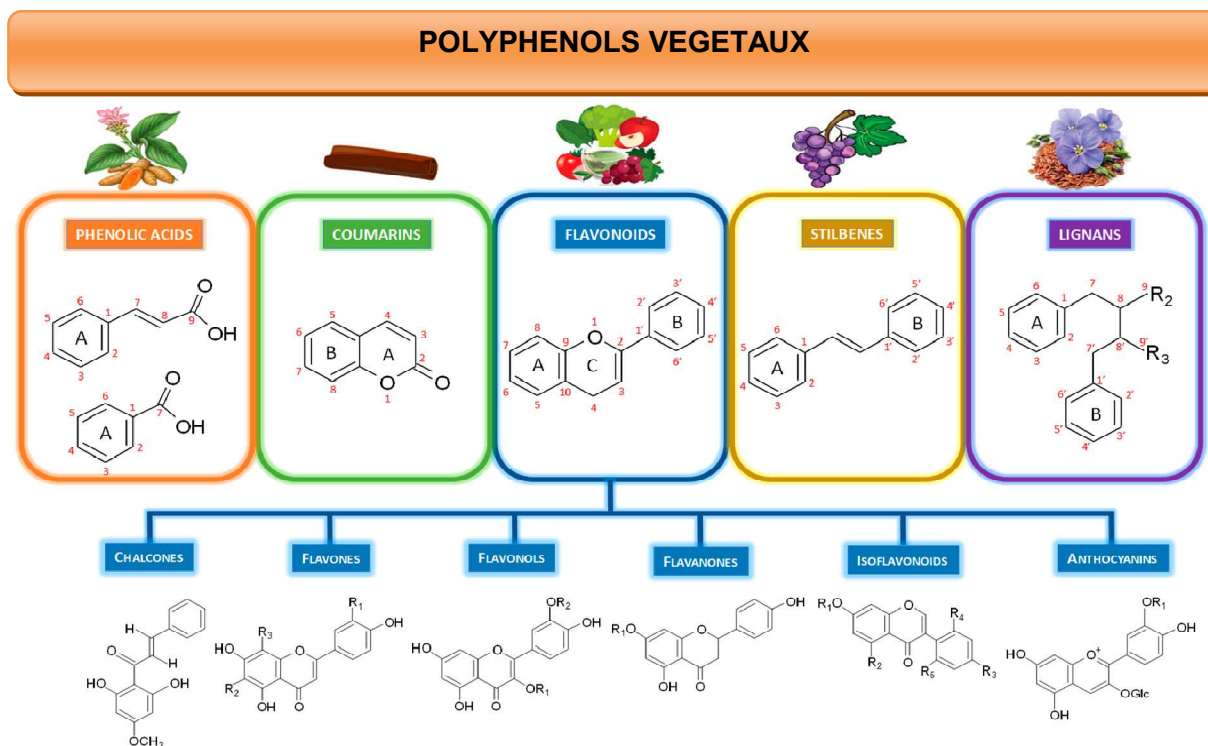


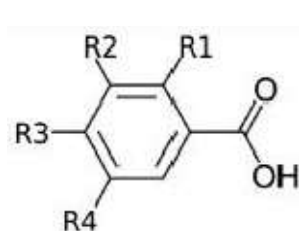
Figure 07: Classification des polyphénols (Hano & Tungmunnithum, 2020).

4.2.1. Acides phénoliques (ou acides phénolcarboxyliques)

Les acides phénoliques sont des composés organiques aromatiques et ont une fonction carboxylique et un cycle phénolique (Hano & Tungmunnithum, 2020). Ils se subdivisent en deux sous-classes (figure 08):

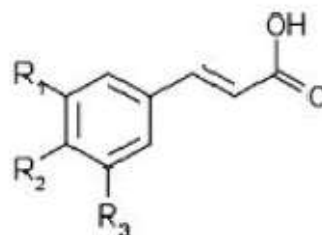
- les acides hydroxybenzoïques (C6-C1), parmi lesquels les plus fréquents sont l'acide cinnamique, l'acide salicylique, l'acide gallique et l'acide vanillique.
- les acides hydroxycinnamiques (C6-C3), les plus répandus étant l'acide ρ -coumarique, l'acide caféique et l'acide férulique (Bruneton, 2015).

Les acides phénoliques sont fréquemment inclus dans notre régime alimentaire et ont été largement étudiés en raison de leurs propriétés biologiques (antioxydantes, antitumorales et antimicrobiennes). Les champignons, en particulier, sont une excellente source de ces molécules dans l'alimentation (Bruneton, 2015).



Acides hydroxybenzoïques

R1=R4=H, R2=OCH₃, R3=OH Acide vanillique
 R1= H, R2=R3=R4 =OH Acide gallique
 R1=OH, R2=R3=R4=H Acide salicylique



Acides hydroxycinnamiques

R1=R3=H, R2=OH Acide ρ -coumarique
 R1= R2=OH, R3 =H Acide caféique
 R1=OCH₃, R2=OH, R3=H Acide férulique

Figure 08: Structure des acides phénoliques: acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques (Bruneton, 2015)

4.2.2. Coumarines

Les coumarines appartiennent à la famille des benzopyrones (1,2-benzopyrones ou 2H-benzopyran-2-ones). Les coumarines appartiennent à la classe des lactones dont la

structure est composée d'un noyau benzénique lié à un noyau α -pyrone, et disposent d'un système conjugué riche en électrons et doté de propriétés de transport de charges. La simplicité et la polyvalence de la structure de la coumarine en font un point de départ intéressant pour une large gamme d'applications (Matos et al., 2015).

Il existe quatre principaux sous-types de coumarines : les coumarines simples, les furanocoumarines, les pyranocoumarines et les coumarines substituées par une pyrone (Jain & Joshi, 2012). Les différentes formules de la coumarine et de ses dérivés sont présentées dans la figure 09.

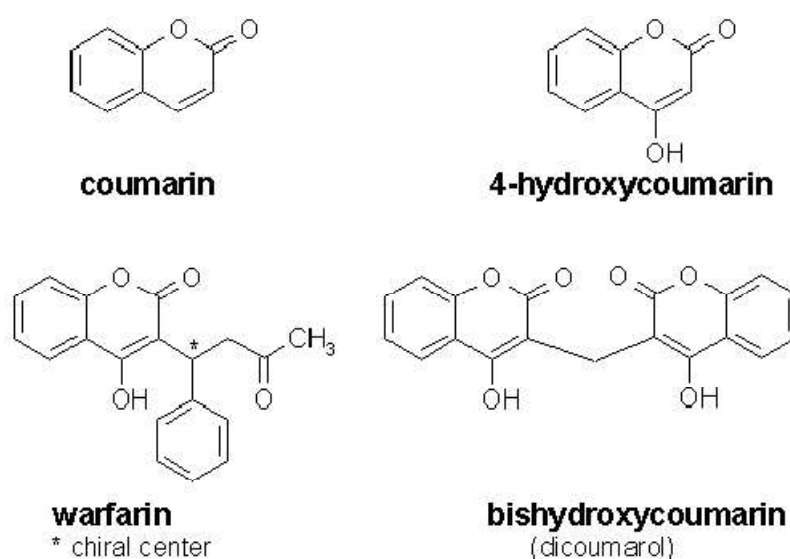


Figure 09 : Structures chimiques de la coumarine simple et ses dérivés (Jain & Joshi, 2012)

Les dérivés de la coumarine ayant une large gamme d'activité biologique, comme anti-inflammatoires, anticancéreux, anticoagulants, antioxydants, anti-VIH et antibactériens (Matos et al., 2015).

4.2.3. Stilbènes

Les stilbènes appartiennent à la classe des composés phénoliques, caractérisés par la présence d'un noyau 1,2-diphényléthylène et sont synthétisés par la voie des phénylpropanoïdes. Les stilbènes ont un squelette de base C₆-C₂-C₆ et sont constitués de deux groupes phényles reliés par une double liaison éthénique. Ils existent généralement sous

forme de trans-resvératrol, ptérostilbène et le 30-hydroxyptérostilbène (Dubrovina & Kiselev, 2017) (figure 10).

De nombreux rôles ont été dévolus aux stilbènes, en tant que composés antimicrobiens, dissuasifs ou répulsifs dans les plantes, les protégeant des attaques de champignons, de bactéries, de nématodes ou d'herbivores. Les stilbènes ont été plébiscités pour leurs effets curatifs et préventifs en tant qu'agents cardioprotecteurs, antitumoraux, neuroprotecteurs et antioxydants (Tsai et al., 2016).

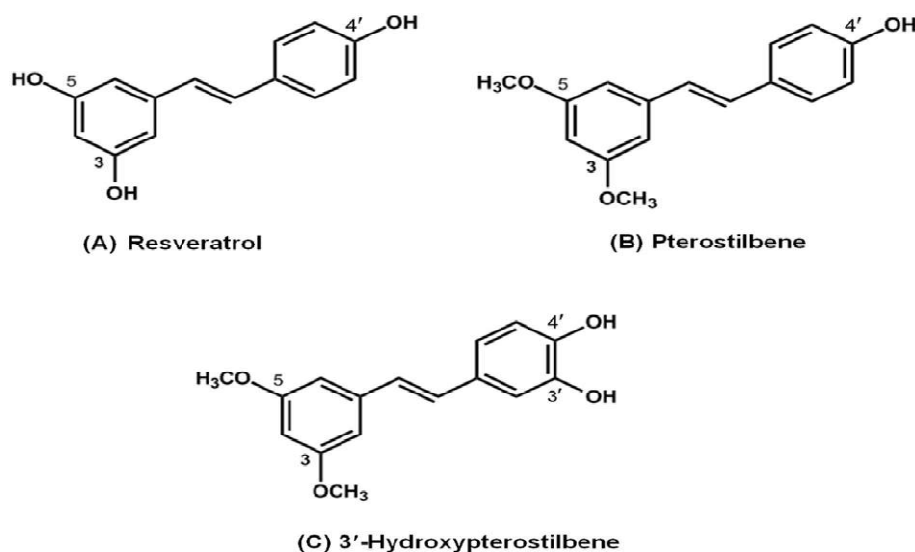


Figure 10 : Structures chimiques des stilbènes (Tsai et al., 2016)

4.2.4. Lignanes

Les lignanes appartiennent au groupe des composés diphénoliques dérivés de la combinaison de deux unités phénylpropanoïdes C6-C3 au niveau du carbone β et β' , et qui peuvent être liés à des liaisons éther, lactone ou carbone supplémentaires (Durazzo et al., 2018).

Les lignanes peuvent être classés en cinq principaux types en fonction de leur structure : lignanes, néolignanes, norlignanes, lignanes hybrides et lignanes oligomères (Cui et al., 2020) (figure 11). Les différents types de lignanes ont nombreuses caractéristiques pharmacologiques, telles que les activités antitumorales, hépatoprotectrices, antagonistes du

facteur d'activation plaquettaire (PAF), antifongiques, antihypertensives, sédatives et antioxydantes (Durazzo *et al.*, 2018).

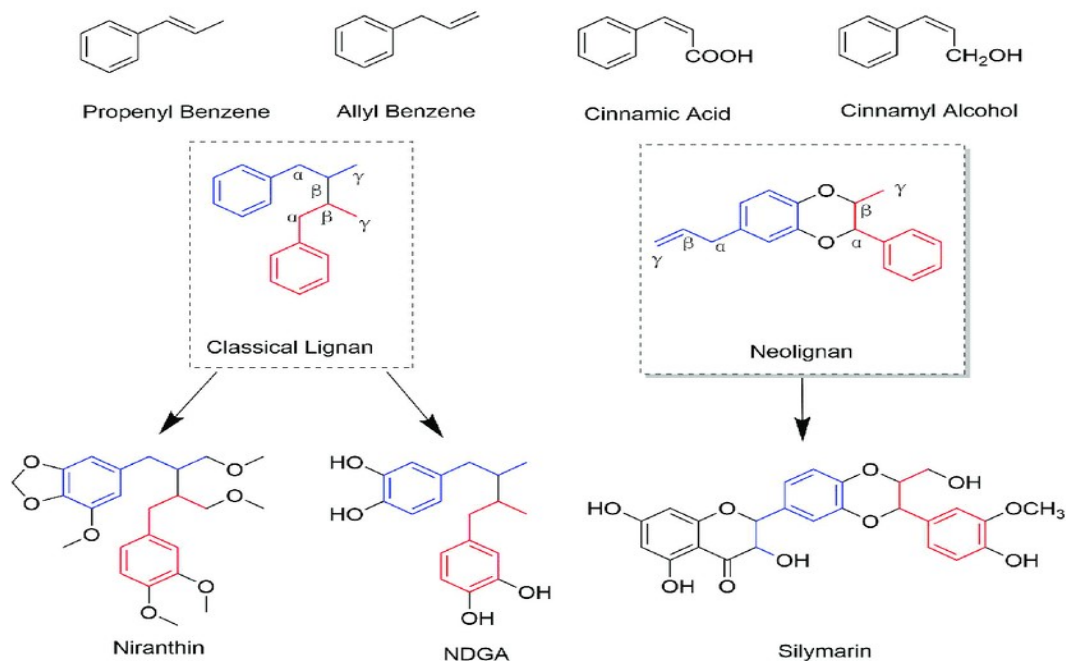


Figure 11 : Les monomères et classification des lignanes (Cui *et al.*, 2020)

4.2.5. Flavonoïdes

4.2.5.1. Définition et structure

Les flavonoïdes constituent le plus grand groupe de composés phénoliques. Ils contiennent plus de 6000 des 8000 composés phénoliques présents dans les aliments végétaux. Ils ont un faible poids moléculaire et sont caractérisés par un squelette de 15 atomes de carbone, disposés en C6-C3-C6, avec des substitutions, un degré d'insaturation et une disposition du squelette de base variables, aboutissant à différentes sous-classes. Ces composés apportent aux plantes des pigments de couleur attrayants tels que le jaune, le rouge, le bleu et le violet (Hano & Tungmunthum, 2020).

La structure des flavonoïdes est constituée de deux cycles aromatiques, A et B, réunis par un pont à trois carbones, souvent sous la forme d'un cycle hétérocyclique, C (figure 12) (Hano & Tungmunthum, 2020 ; Ekalu & Habila, 2020).

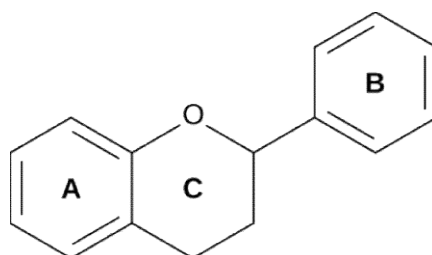


Figure 12 : Squelette basique de la molécule de flavonoïde (Hano & Tungmunnithum, 2020)

Les flavonoïdes sont fortement présents dans les fleurs, les écorces, les graines et les feuilles des plantes, en abondance dans les légumes à feuilles et ils se retrouvent dans les boissons (vin, thé, cidre, bière, cacao, etc.) et dans les aliments d'origine végétale (légumineuses, légumes, céréales, fruits, etc.). Leur présence est largement influencée par des facteurs génétiques et des conditions environnementales (Ekalu & Habila, 2020).

4.5.2.2. Biosynthèse des flavonoïdes

Le processus initial de biosynthèse de la plupart des flavonoïdes est la condensation d'une molécule de *p*-coumaroyl-CoA (dérivé du shikimate, cycle B) avec trois molécules de malonyl-CoA (origine polykétide, cycle A) pour former la chalcone (2', 4', 6', 4-tétrahydroxychalcone). Cette réaction est catalysée par l'enzyme chalcone synthase (CHS). La chalcone est ensuite isomérisée en flavanone par l'enzyme chalcone flavanone isomérase (CHI). À partir de ces intermédiaires clés, la voie diverge en plusieurs ramifications latérales, chacune donnant une classe différente de flavonoïdes (figure 13) (Santos et al., 2017).

Les différentes sous-classes de flavonoïdes sont synthétisées à partir d'un squelette de base de flavonoïde par l'action d'un groupe d'enzymes, comme les réductases, les isomérases, les hydroxylases et plusieurs dioxygénases dépendantes du Fe²⁺/2-oxoglutarate. Ces enzymes modifient la structure de base des flavonoïdes en y apportant des sucres (d-glucose, lignine, arabinose, glucorhamnose, l-rhamnose, galactose), des groupes méthyle et/ou des fragments acyle, ces modifications peuvent altérer leur interaction, leur solubilité et leur réactivité avec les cellules (Ekalu & Habila, 2020).

Les anthocyanes, les proanthocyanes, les flavones et les flavonols sont des sous classes connues comme produits finaux de la biosynthèse. Les isoflavonoïdes, sont formés par une réaction de transfert de la chaîne latérale 2-aryle vers la position 3, médiée par l'isoflavone synthase (figure 13) (Santos *et al.*, 2017).

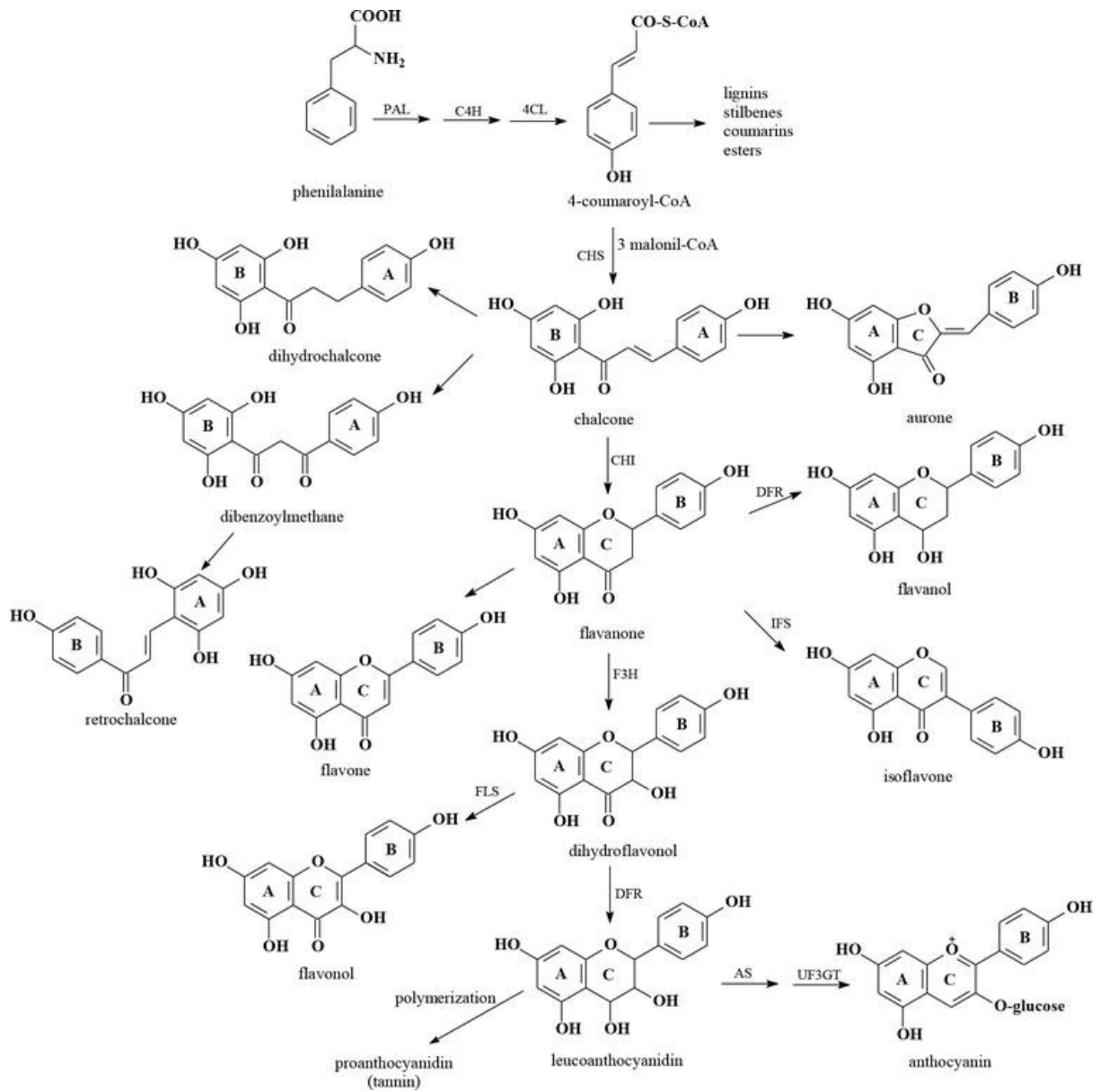


Figure 13 : Diagramme de la voie de biosynthèse des flavonoïdes (Santos *et al.*, 2017)

4.5.2.3. Classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont subdivisés en différentes classes en fonction du carbone du cycle C, sur lequel est fixé le cycle B et du niveau d'insaturation et d'oxydation du cycle pyrane. Ces flavonoïdes ont un rôle majeur dans de nombreuses activités pharmacologique (Panche et *al.*, 2015). Chaque classe est présentée ci-dessous (figure 14).

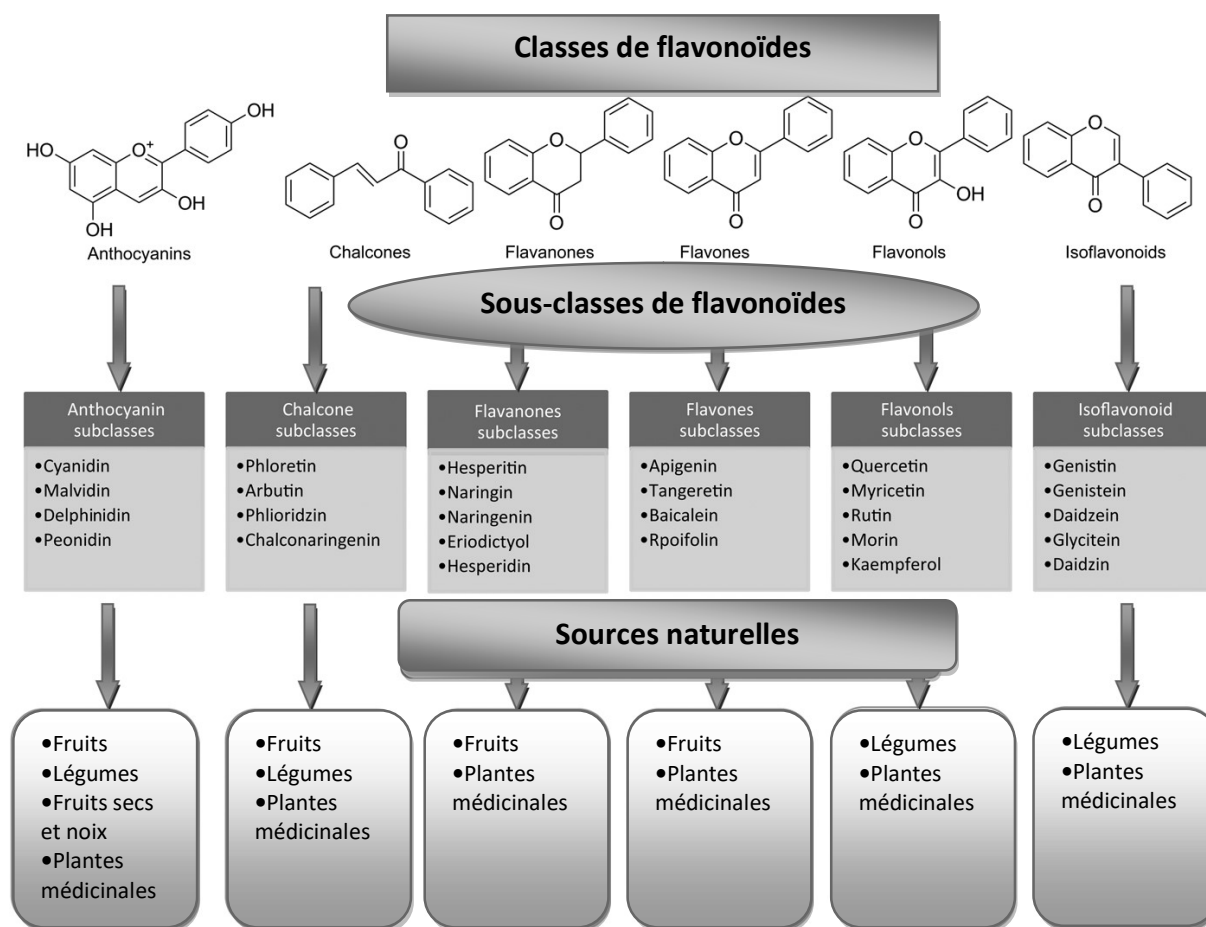


Figure 14 : Les principales classes et sous classes de flavonoïdes et leurs sources naturelles (Panche et *al.*, 2015).

- **Flavones**

Les flavones font partie de l'un des principales classes des flavonoïdes. elles comportent une double liaison sur le cycle pyranique entre les positions 2 et 3, et un carbonyle

(cétone) en position 4. L'apigénine, la lutéoline, et la tangeritine appartiennent à cette sous-classe de flavonoïdes (figure 15). Les flavones sont en général extraits des fleurs, des feuilles et des fruits du poivrons verts et rouges, brocoli, romarin, oignon, céleri, carotte, persil, origan, camomille et menthe (Gürler et *al.*, 2020).

- **Flavonols**

les flavonols sont les dérivés alcooliques des flavones. Ils se distinguent des flavones par la présence d'un groupe hydroxyle en position 3 du cycle pyranique (figure 15). Les flavonols les plus connus sont le kaempférol, la myricétine, la quercétine et la fisétine. Les flavonols sont trouvés dans la laitue, les haricots, le brocoli, les tomates, les oignons, le chou frisé, les pommes, les raisins et les baies. Outre les fruits et légumes, le thé et le vin rouge sont aussi des sources de flavonols (Ayaz et *al.*, 2019).

- **Flavanones**

Les flavanones sont aussi une autre classe importante connues comme étant des dihydroflavones. Les flavanones sont des flavones saturés et sont caractérisés par l'absence de double liaison entre la position 2 et 3 et c'est la seule différence structurelle entre ces deux classes de flavonoïdes. L'héspéritine, la naringénine, l'héspéridine, la naringine et l'ériodictyol se trouvent généralement dans les fruits de citrus tels que le citron, l'orange, et le raisin (Gürler et *al.*, 2020) (figure 15).

- **Isoflavonoïdes**

Les isoflavones ou isoflavonoïdes sont des flavonoïdes où le cycle benzénique (C) est fixé à la troisième position du cycle pyranique (figure 15). La génistéine et la daidzéine sont connues sous le nom d'isoflavonoïdes et sont généralement considérées comme des phyto-œstrogènes en raison de l'activité œstrogénique démontrée dans des modèles animaux. Bien que la présence d'isoflavones ou d'isoflavonoïdes soit peu fréquente, on les trouve principalement dans le soja et d'autres légumineuses (Ayaz et *al.*, 2019).

- **Chalcones**

Bien qu'ils ne disposent pas du cycle pyranique, ils sont classés parmi les flavonoïdes parce qu'ils ont une structure synthétique analogue à celle des flavonoïdes. De plus la partie

pyranne est disponible comme structure ouverte (figure 15). La phlorétine et la chalconerigénine sont en quantité appréciable dans les poires, les tomates, les busseroles, les fraises et certains produits du blé (Panche et *al.*, 2015).

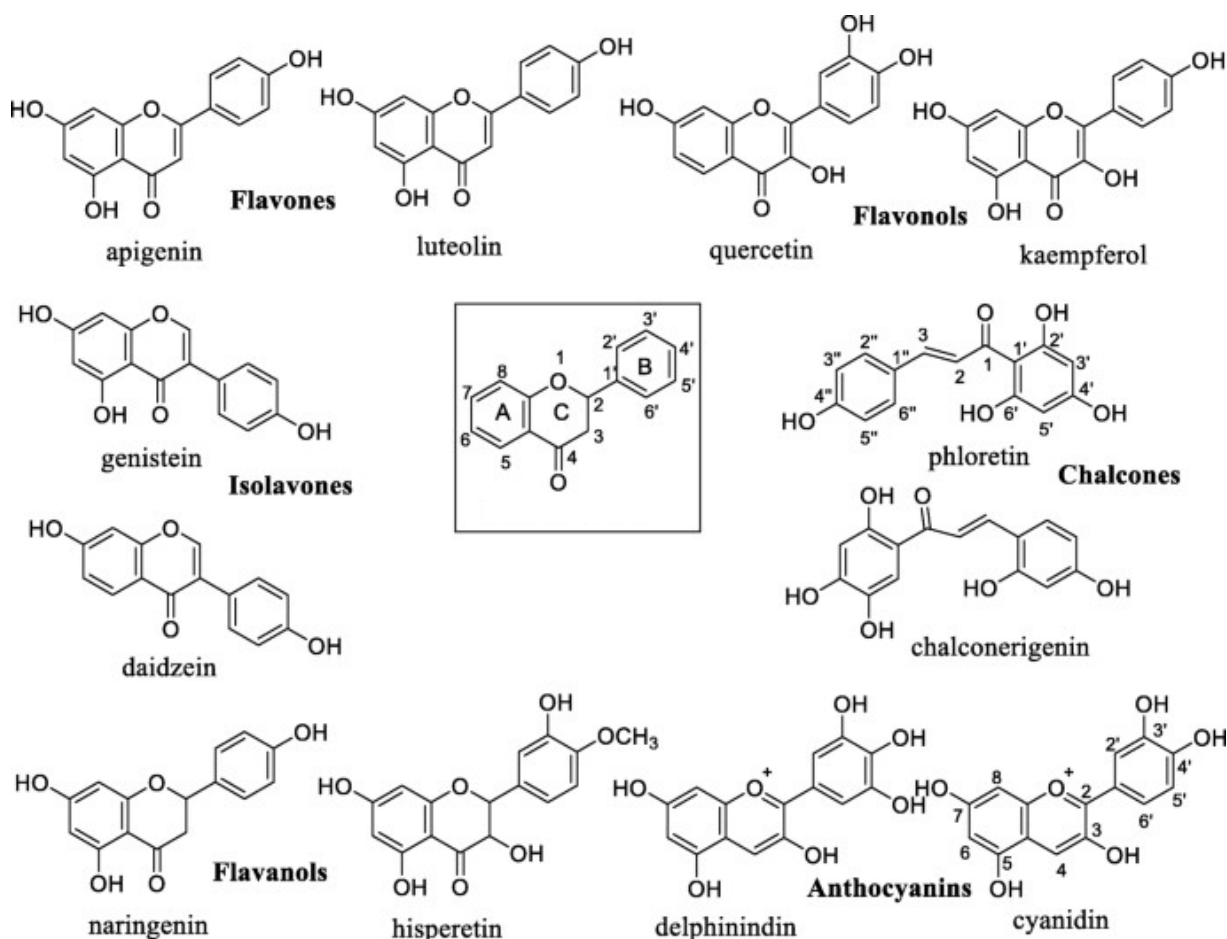


Figure 15 : Structure du squelette de base des flavonoïdes et de leurs classes (Panche et *al.*, 2015)

- **Anthocyanes**

Les anthocyanes sont des pigments responsables de la couleur des plantes. Ils existent sous forme de cations (sels de chlorure). Ils sont les dérivés salins du cation 2-phénylchromenylium (flavylium). La malvidine, la delphinidine, la cyanidine, la péonidine et la pélargonidine sont les anthocyanines les plus étudiées (figure 15). Elles sont surtout présentes dans les couches cellulaires externes de divers fruits tels que les cassis, les

canneberges, les raisins rouges, les raisins merlot, les fraises, les framboises, les mûres et les myrtilles (Gürler et *al.*, 2020).

4.3. Activités biologiques des flavonoïdes

Toutes les pathologies semblent être associées au stress oxydatif, bien que l'on ne sache pas encore si celui-ci apparaît comme une cause ou comme une conséquence. La propriété antioxydante des flavonoïdes, en tant qu'agent protecteur, est liée à des maladies telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, l'artériosclérose, les maladies neurodégénératives et le vieillissement (Panche et *al.*, 2015)

Les bienfaits des flavonoïdes ont également été observés dans le cas du diabète. Il a été mis en évidence que les polyphénols constitutifs du thé vert augmentaient l'absorption et le captage du glucose par les adipocytes par la stimulation de l'insuline basale (Wu et *al.*, 2004). Par ailleurs, dans une autre étude, l'effet de l'isoflavone génistéine, sur le métabolisme lipidique des rats ovariectomisés, fait apparaître une diminution des taux de triglycérides dans le sérum sanguin et les muscles et une augmentation du niveau d'acides gras libres dans le sérum (Nogowski et *al.*, 1998). Le rôle des flavonoïdes dans les maladies humaines et leurs mécanismes thérapeutiques sont récapitulés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 01 : Rôle des flavonoïdes dans les pathologies humaines et leurs mécanismes thérapeutiques

Flavonoïdes	Rôle dans les maladies humaines	Mécanismes d'action	Références
Genistein	Traitement auxiliaire du diabète	Diminue les concentrations de triglycérides et augmente le niveau d'acides gras libres dans le sérum, favorisant l'insuline basale et en améliorant la	Nogowski et <i>al.</i> (1998)

		diffusion du glucose dans les cellules.	
Campférol3-O-méthyle	Traitement et prévention des maladies inflammatoires	Inhibe la production d'oxyde nitrique et de prostaglandine E2	Soares et <i>al.</i> (2015)
Cyanidine		Suppression de la production d'interleukines pro-inflammatoires	Tsuda et <i>al.</i> (2002)
Quercétine, Catéchine		Inhibition de la cyclooxygénase 2 (COX-2) et de la lipoxygénase du métabolisme de l'acide arachidonique	Behling et <i>al.</i> (2004), Soares et <i>al.</i> (2015)
Quercétine	Traitement et prévention de l'athérosclérose	Une réduction des facteurs pro-inflammatoires et des radicaux libres, et un effet protecteur des LDL contre les altérations oxydatives.	Cardoso et <i>al.</i> (2011), Tapas et <i>al.</i> (2008)
Resvératrol		Diminution des lésions artérielles, diminution de l'activité de l'angiotensine II, effets anti-ischémiques et anti-sénescence, amélioration de	Opie & Lecour (2007)

		l'activité cardiaque	
Icariine		Inhibe les niveaux sériques du facteur de nécrose tumorale- a, noradrénaline, angiotensine II et peptide natriurétique cérébral et améliore les changements histologiques et l'activité cardiaque	Song et al. (2011)
Polyphénols de thé vert	Traitement auxiliaire du diabète	Augmente l'absorption et l'assimilation du glucose par les adipocytes via la stimulation de l'insuline basale.	Wu et al. (2004)
Baicaline	Traitement de la candidose	Elle se combine avec les protéines solubles présentes dans les parois des cellules fongiques et les détruit.	Arif et al. (2011), Serpa et al. (2012)
Catéchines, Quercétine, Epicatéchines, Théaflavines	Traitement adjuvant des infections virales	Inhibe les enzymes et détruit les membranes cellulaires, empêchant ainsi la pénétration du virus et sa liaison aux cellules, et	Cushnie & Lamb (2011), Sandhar et al. (2011)

		déclenchant le mécanisme d'autodéfense de l'hôte	
Galangina, Pinocembrine, Kaempférol, Baicaline	Traitement complémentaire des infections bactériennes	Activité inhibitrice sur la croissance des micro-organismes, avec une action bactériostatique	Cushnie & Lamb (2011), Calderon-Montano <i>et al.</i> (2011)
Proanthocyanidine		Diminution de la formation de radicaux libres, ce qui entraîne une régulation effective de la Na ⁺ /K ⁺ ATPase	Zhao <i>et al.</i> (2010)

Les activités antioxydantes et antimicrobiennes des flavonoïdes, faisant l'objet de ce travail, seront détaillées ci-après.

4.3.1. Activité antioxydante des flavonoïdes

L'activité la plus décrite des flavonoïdes est leurs capacités à agir comme agents antioxydants. Les flavonoïdes ont plusieurs voies potentielles pour agir comme antioxydants. La plus importante est le piégeage des radicaux libres, dans laquelle les flavonoïdes peuvent interrompre la réaction en chaîne des radicaux libres (Xie & Schaich, 2014). Un composé est défini comme un antioxydant s'il remplit deux conditions: premièrement, il doit être présent à de faibles concentrations, par rapport au substrat oxydable, il peut significativement retarder ou empêcher l'oxydation du substrat ; secondement, le radical résultant doit être stable de manière à l'empêcher d'agir en tant que radical de propagation de chaîne (Surai *et al.*, 2019). Les flavonoïdes peuvent manifester ces propriétés antioxydantes en piégeant les espèces réactives de l'oxygène, en chélatant les métaux de transition, en inhibant certaines enzymes intervenant dans la production de radicaux libres.

4.3.1.1. Mécanisme d'action antioxydant des flavonoïdes

- *Chélation des métaux de transition*

La capacité des flavonoïdes à neutraliser les radicaux libres est généralement liée à leurs pouvoirs antioxydants. Cependant, d'autres mécanismes peuvent également être impliqués. L'un d'entre eux est la capacité de séquestrer les ions métalliques, tels que les ions de fer et de cuivre qui participent à la génération de radicaux hydroxyles dans la réaction de Fenton (figure 16) (Kejík et *al.*, 2021) :

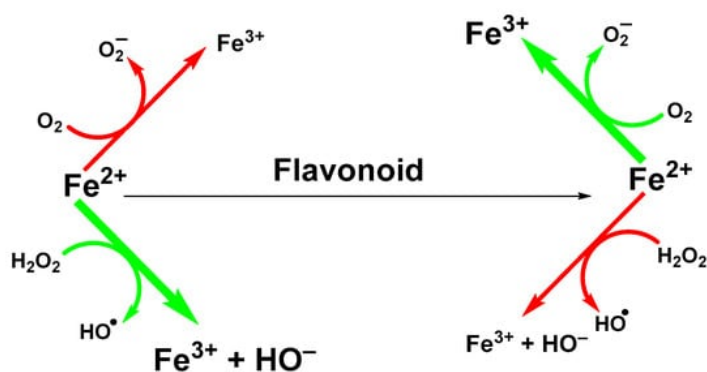


Figure 16 : Suppression de la réaction de Fenton par les flavonoïdes (Kejík et *al.*, 2021)

La chélation a lieu par l'intermédiaire de groupes hydroxyles ou de leur fraction carbonyle, s'ils sont présents. Une deuxième possibilité pour que les flavonoïdes exercent des effets antioxydants est de réagir avec les groupes -SH et de modifier ensuite l'environnement redox à l'intérieur de la cellule (Xu et *al.*, 2019). La quercétine, un flavonol très répandu, est l'un des flavonoïdes les mieux étudiés. Sa capacité à chélater un large éventail d'ions métalliques, tels que Al(III), Co(II), Cr(III), Cu(II), Fe(II), Fe(III), Mo(VI), Pb(II), Tb(III) et Zn(II), a été démontrée dans plusieurs études (Surai et *al.*, 2019) (figure 17). Des données similaires ont été obtenues pour la rutine (quercétine-3-O-bêta-rutinoside) ou la catéchine (flavan-3-ol) vis-à-vis des ions de Cu(II), Fe(II), et Zn(II) (Xu et *al.*, 2019).

Les complexes fer-flavonoïdes peuvent interagir avec diverses biomolécules. Hamilton et *al.* (2018) ont découvert que le GLUT1 peut transporter la quercétine-Fe(II) du cytosol au milieu extracellulaire. En même temps, la quercétine est également un inhibiteur de GLUT1 en se liant à son site exofacial. Un modèle proposé de l'effet de la quercétine sur l'homéostasie du fer intracellulaire est présenté dans la figure 18. Les ions ferreux sont

généralement transportés dans une cellule par le DMT1. Dans le cytosol, la quercétine peut chélater les ions ferreux. Le complexe formé est transporté hors de la cellule par GLUT1. Dans le sens inverse, la quercétine libre est transportée vers la cellule. Dans l'espace extracellulaire, l'ion ferrique chélaté est déplacé de la quercétine vers la transferrine (protéine de transport sanguin pour les ions ferriques). En peu de temps, la quercétine peut diminuer la concentration intercellulaire d'ions ferriques (Kejik et *al.*, 2021)

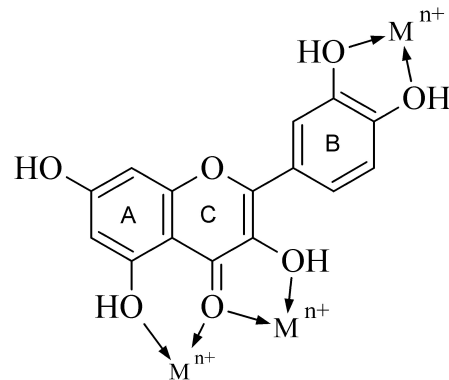


Figure 17 : Sites de chélation possibles de la quercétine (Hamilton et *al.*, 2018)

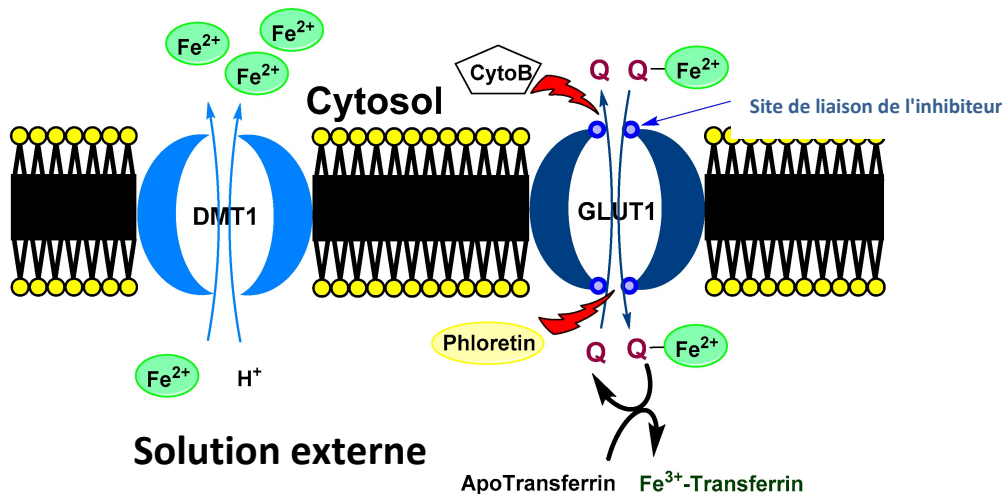


Figure 18 : Mécanisme possible de l'effet de la quercétine sur l'homéostasie du fer intracellulaire (Kejik et *al.*, 2021)

DMT1 (Transporteur des Métaux Divalents N°1), GLUT1 (Transporteur de Glucose N°1), Cyto B (Cytochalasine B), Phloretin (Inhibiteur de GLUT1), Q (Quercétine)

- **Piégeage des radicaux libres**

Le piégeage des radicaux libres joue un rôle important dans l'activité antioxydante des flavonoïdes. Les propriétés antiradicalaires des flavonoïdes sont liées à leur capacité à transmettre leur hydrogène phénolique (Fl-O-H) à un radical libre. L'abstraction formelle de l'atome H des flavonoïdes peut être décrite par la réaction suivante (Ekalu & Habila, 2020):



Il a été prouvé que cette réaction se déroule selon au moins trois mécanismes différents :

- transfert d'atomes d'hydrogène en une seule étape,
- transfert d'électron unique suivi d'un transfert de proton,
- transfert séquentiel d'électrons avec perte de protons.

Ces mécanismes peuvent coexister, et ils dépendent des propriétés du solvant et des caractéristiques des radicaux (Ekalu & Habila, 2020).

De nombreuses méthodes ont été développées pour l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro*, dont la plupart sont spectrophotométriques, en mesurant l'activité de piégeage par des radicaux artificiels tels que l'acide 2-2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS), le 1-1'-diphényl-2-picrylhydrazyl ; (DPPH) et la N,N-diméthyl-p-phénylendiamine (DMPD). Bien que ces techniques présentent des divergences et ne reproduisent pas exactement les conditions *in vivo*, néanmoins, elles permettent de classer et d'estimer l'activité comme dans le cas du DPPH qui évalue la capacité des flavonoïdes à transférer un atome d'hydrogène à un radical (Alkadi, 2020) (figure 19).

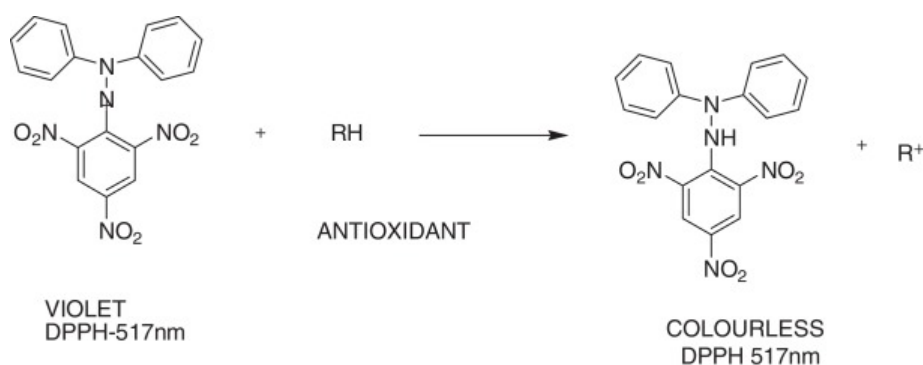


Figure 19 : Activité antiradicalaire du DPPH (Alkadi, 2020)

- **Inhibition de l'activité des enzymes**

Il y a des rapports révélant que les flavonoïdes peuvent inhiber l'activité d'un ensemble d'enzymes générant des radicaux libres qui sont directement liés au stress oxydatif et à la peroxydation des lipides, y compris NADPH oxydases, xantine oxydases, peroxydases, lipoxygénases, cellulases, xylanases, pectinases, glutathion-S-transférases, glycoprotéines et kinases (Kaurinovic & Vastag, 2019).

L'enzyme la plus étudiée est la xanthine oxydase, c'est une molybdoflavoenzyme impliquée dans la dégradation des purines où elle catalyse l'hydroxylation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique, avec une production concomitante de superoxyde d'oxygène et de peroxyde d'hydrogène (figure 20) (Özyürek et al., 2009). Quercétine, morine, myricétine, kaempferol et la puerarine ont été proposés comme les inhibiteurs les plus efficaces de la xanthine oxydase. Le kaempférol, qui pourrait entrer dans la cavité hydrophobe de la XOD et interagir avec les résidus d'acides aminés, s'est avéré être un inhibiteur compétitif de la XOD (Kaurinovic & Vastag, 2019). De plus, les groupes hydroxyle sur le cycle B des flavonoïdes ont été identifiés comme contribuant à l'activité inhibitrice de la xanthine oxydase (Özyürek et al., 2009)

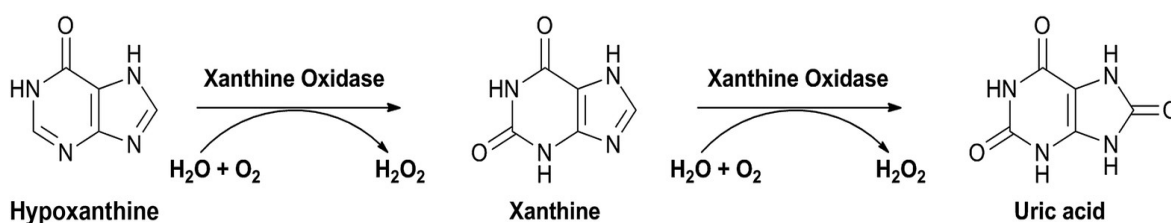


Figure 20 : Production de superoxyde d'oxygène et de peroxyde d'hydrogène par la xanthine oxydase (Özyürek et al., 2009)

4.3.1.2. Relations structure-activité antioxydante des flavonoïdes

Le pouvoir antioxydant d'un flavonoïde dépend fortement de sa structure chimique. Il est bien connu que l'activité antioxydante des flavonoïdes est fortement conditionnée par le nombre et la position des groupes hydroxyles sur les anneaux B et A, et par le degré de conjugaison entre les cycles B et C (Panche et al., 2015). Selon Bors et al. (1990), les conditions structurelles générales favorables pour un piégeage efficace des

radicaux et/ou un potentiel antioxydant des flavonoïdes répondent aux critères suivants (figure 21) :

- La structure O-dihydroxy (3', 4'-diOH ou catéchol) dans le cycle B confère une grande stabilité aux radicaux phénoxy des flavonoïdes grâce à l'expansion et à la délocalisation des liaisons hydrogènes ou des électrons,
- La double liaison C2-C3 (conjuguée au groupe 4-oxo) détermine la coplanarité du groupe hétérocyclique et participe à la stabilisation des radicaux libres par la délocalisation des électrons sur les cycles A, B, C,
- La présence de groupes 3-OH et 5-OH confèrent aux flavonoïdes une capacité maximale de piégeage des radicaux,
- En absence de structure O-dihydroxy dans le cycle B, les substitués hydroxyles de catéchol dans l'anneau A sont capables de la compenser et deviennent un déterminant plus important de l'activité antiradicalaire des flavonoïdes.

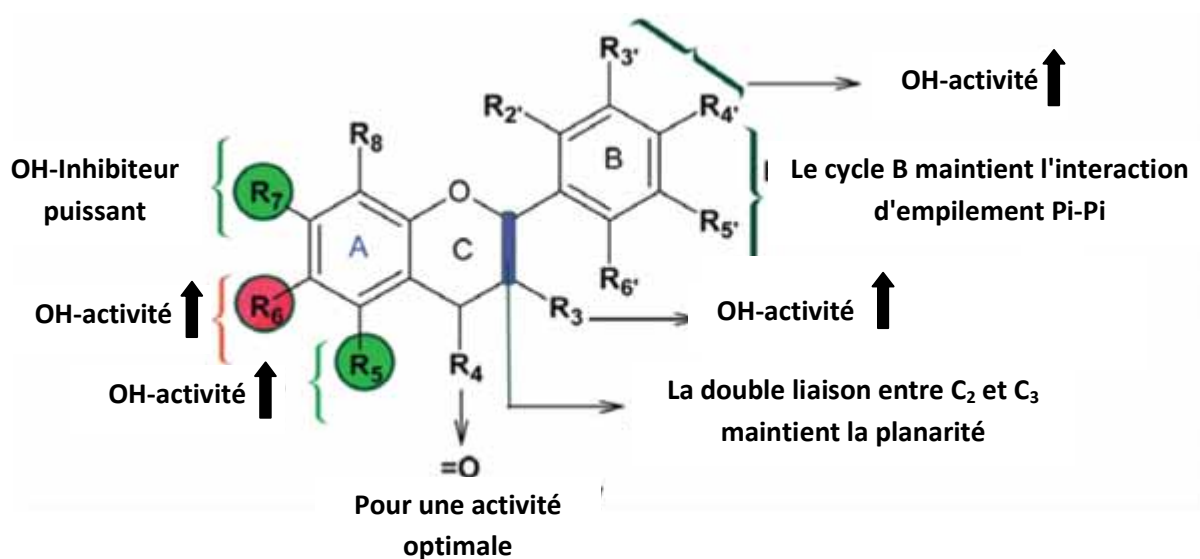


Figure 21 : Structure du flavonoïde avec les facteurs déterminants l'activité antioxydante (Alkadi et *al.*, 2020)

Selon Van Acker et *al.* (1998), la structure de base des flavonoïdes ne semble pas être nécessaire pour une bonne capacité antioxydante. Elle ne devient importante que lorsque la partie catéchol n'est pas présente. De plus, la glycosylation des flavonoïdes réduit généralement leur activité antioxydante. Le blocage du groupe hydroxyle C-3 ou l'élimination du groupe 3-OH réduira les propriétés antioxydantes des flavonoïdes.

4.3.2. Activité antibactérienne des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont synthétisés par les plantes en réponse à une infection microbienne. Il n'est donc pas surprenant qu'ils se soient révélés être des substances antimicrobiennes efficaces contre un large éventail de micro-organismes. Plusieurs recherches ont montré une activité antibactérienne puissante des extraits de plantes riches en flavonoïdes (Sanver et al. 2016; Górnaiak et al., 2019).

4.3.2.1. Mécanisme d'action antibactérien des flavonoïdes

Les activités antibactériennes de nombreux flavonoïdes dérivés de plantes utilisent des mécanismes différents de ceux des médicaments conventionnels et pourraient donc jouer un rôle important dans l'amélioration de la pharmacothérapie antibactérienne (Sanver et al. 2016). Les possibles mécanismes antimicrobiens des flavonoïdes avec leur cible spécifique sur les cellules bactériennes sont résumés dans la figure 22.

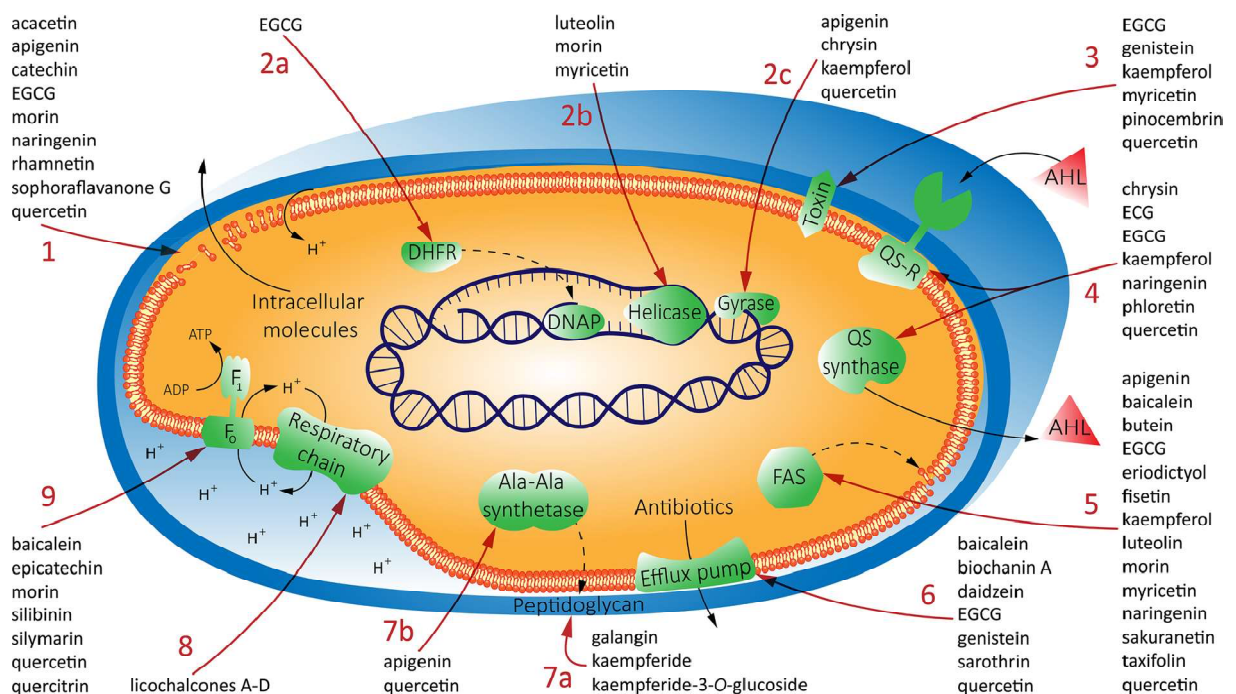


Figure 22 : Représentation schématique du mécanisme d'action des flavonoïdes (Górnaiak et al., 2019)

- **Désorganisation de la membrane plasmique**

La membrane plasmique bactérienne est responsable de l'osmorégulation, la respiration, les processus de transport, la biosynthèse et la réticulation du peptidoglycane, ainsi que la biosynthèse des lipides. Pour réaliser toutes ces fonctions, l'intégrité de la membrane est une condition préalable, et sa perturbation peut directement ou indirectement provoquer un dysfonctionnement du métabolisme en conduisant à la mort des cellules bactériennes (Górniak et *al.*, 2019).

Les réactions des flavonoïdes avec les bicouches lipidiques mettent en jeu deux mécanismes. Le premier est associé à la partition des composés non polaires dans l'intérieur hydrophobe de la membrane, alors que le second inclut la formation des liaisons hydrogènes entre les groupes de tête polaires des lipides et les flavonoïdes les plus hydrophiles à l'interface de la membrane (Sanver et *al.* 2016).

Les différences dans le nombre et la distribution des groupes hydroxyle, le degré de polymérisation, ainsi que la présence d'un groupe méthoxy dans le cycle C peuvent influencer le type d'interactions qui se produisent entre différents flavonoïdes et les bicouches lipidiques.

La catéchine est souvent liée aux effets antimicrobiens et aux interactions avec la membrane cellulaire en inhibant la synthèse des enzymes intracellulaires et extracellulaires. Une équipe de recherche a étudié le mécanisme antimicrobien des flavonoïdes (kaempferole et hespétine) vis-à-vis *Escherichia coli* à travers les membranes cellulaires et le modèle des liposomes. Ils ont conclu que l'interaction entre le groupe polaire de la tête de la membrane et les régions hydrophobes peut endommager la membrane d'*Escherichia coli* (He et *al.*, 2014).

- **Inhibition de la formation des biofilms**

Le biofilm est une couche fine robuste de mucilage adhérent à une surface solide. La formation de biofilm est un processus par lequel les micro-organismes se sont attachés irréversiblement à des tissus humains et des dispositifs médicaux entraînant une altération du phénotype des organismes (Górniak et *al.*, 2019).

Les flavonoïdes hydrophiles peuvent interagir à la surface de la membrane et agir efficacement contre les biofilms par différents mécanismes, à savoir : empêchement de

l'adhésion bactérienne ainsi que la formation de biofilm, inhibition de la maturation du biofilm, perturbation des exopolysaccharides du biofilm et la destruction du micro-organisme dans le biofilm mature (Sanver et *al.* 2016).

Plusieurs études ont montré que les flavonoïdes empêchent la formation des biofilms. Awolola et *al.* (2014) ont montré une activité antibiofilm significative d'isovitexine et d'épicathéchine contre *Staphylococcus aureus*. En outre, quercétine a été démontré comme inhibant la formation du biofilm d'*Escherichia coli* entéroaggrégatif (He et *al.*, 2014). Plus particulièrement, la quercétine réduit l'expression de plusieurs protéines sidérophores de fer en limitant la teneur en Fe^{3+} nécessaire à la formation de biofilm (Górniak et *al.*, 2019). Dans le tableau 02, nous avons listé quelques flavonoïdes qui présentent une activité contre la formation de biofilm.

- ***Inhibition de la synthèse de l'enveloppe cellulaire***

Chez les bactéries Gram-négatives, la voie des acides gras synthase de type II (FAS-II) est essentielle pour la biogénèse des membranes. Les phospholipides et les lipopolysaccharides sont essentiels à la survie des bactéries, et FAS-II joue un rôle important dans leur biosynthèse. Par conséquent, en inhibant FAS-II, nous pouvons interrompre la synthèse de l'enveloppe cellulaire des bactéries (Wallace et *al.*, 2015). De multiples inhibiteurs du FAS-II ont été rapportés jusqu'à présent, par exemple, Brown et *al.* (2007) ont rapporté que les chalcones 4,20,40-trihydroxychalcone, la butéine et l'isoliquirtigénine possèdent une activité inhibitrice contre le FAS-II de *Mycobacterium bovis*. Des études sur la D-alanine-D-alanine ligase, responsable de la production du dipeptide terminal du peptidoglycane ont prouvé que la quercétine et l'apigénine inhibent cette enzyme (Wallace et *al.*, 2015).

- ***Inhibition de la synthèse des acides nucléiques***

Les flavonoïdes peuvent également agir comme des antimicrobiens en mettant à profit leurs effets inhibiteurs sur les topoisomérases bactériennes (Biharee et *al.*, 2020). La dihydrofolate réductase (DHFR) est la cible commune de nombreux agents antimicrobiens. La DHFR est une enzyme importante de la voie de synthèse de l'acide folique, qui fournit le précurseur des pyrimidines et des purines. Raju et *al.* (2015) ont signalé que l'épigallocatechine gallate inhibait les DHFR de *Streptomonas maltophilia*, *Mycobacterium*

tuberculosis et *E. coli*. Les hélicases sont des protéines motrices ubiquitaires qui séparent et/ou réarrangent les duplexes d'acides nucléiques. Des études ont suggéré que ces protéines constituent une cible moléculaire des flavonoïdes (Biharee et al., 2020). Flavones et flavonols groupes de pharmacophores ayant une capacité de liaison aux acides nucléiques, ont montré une capacité d'inhiber l'hélicase (Górniak et al., 2019). Dans l'étude d'Ulanowska et al. (2006), la génistéine peut inhiber la croissance de *Vibrio harveyi* via la stabilisation du complexe de clivage de l'ADN par la topoisomérase, ce qui conduit à l'achèvement de la réplication des chromosomes.

- ***Inhibition de la chaîne de transport des électrons et de la synthèse d'ATP***

Une chaîne de transport d'électrons comprend une série de complexes, ces complexes transfèrent des électrons via des réactions d'oxydoréductions, ce qui conduit à la création d'un gradient électrochimique de protons entraînant la synthèse de l'ATP. En outre, l'enzyme ATP synthase ayant deux segments F_1 et F_0 qui jouent un rôle crucial dans la synthèse de l'ATP (Biharee, et al., 2020).

Ulanowska et al. (2006) ont signalé que les flavonoïdes pouvaient inhiber les segments F_1 et F_0 de l'ATPase d'*E. coli* en se liant à la poche de liaison des polyphénols de l'ATP synthase. Il est donc possible que d'autres micro-organismes puissent également être inhibés par ce mécanisme.

- ***Neutralisation des toxines bactériennes***

Les toxines jouent un rôle important dans la pathogenèse bactérienne, causant parfois des maladies mortelles longtemps après que les bactéries elles-mêmes aient été tuées. Des études indiquent que les flavonoïdes peuvent neutraliser ces éléments de virulence. Choi et al. (2007) ont démontré que la catéchine polymérisée neutralise l'effet de la α -toxine de *S. aureus* *in vitro* et *in vivo*. De plus, Delehanty et al. (2007) ont montré que les polymères de catéchine et d'épicatéchine neutralisent l'endotoxine (lipopolysaccharide: LPS). Cet effet a été détecté en incubant des LPS avec les flavonoïdes et en montrant ensuite une diminution de la quantité de LPS fixés aux billes recouvertes d'un agent de liaison.

- ***Inhibition de la motilité bactérienne***

Les flavonoïdes tels que la nobiltine, sinensetin, morine, luteolin, naringenine, quercetins et epigallocatechine gallate peuvent stopper rapidement le mouvement des bactéries en bloquant la motilité et l'essaimage ainsi que la prévention de l'adhésion bactérienne (Silva et al., 2016).

- ***Inhibition de la sécrétion des facteurs de virulence***

Les protéines et les enzymes qui agissent comme des facteurs virulents jouent un rôle important dans la pathogenèse des maladies infectieuses. Ces facteurs virulents peuvent être les cibles potentielles pour éradiquer les infections. Ces cibles comprennent les sortases, la coagulase, la protéase dégradante, l'uréase et les sialidases. Il a été constaté que la baicaline et la scutellarine peuvent inhiber l'uréase de *Helicobacter pylori* (Yu et al., 2015).

- ***Inhibition des pompes d'efflux bactériennes***

Les pompes d'efflux bactériennes sont des protéines de transport actives que les cellules bactériennes utilisent pour se protéger contre de multiples composés toxiques, dont de nombreux antimicrobiens. Les inhibiteurs de pompes d'efflux provenant de plantes peuvent bloquer ces pompes d'efflux, augmentant ainsi la puissance des composés antimicrobiens (Brown et al., 2021).

Les flavonoïdes qui ont été signalés pour avoir une activité de potentialisation des antibiotiques agissent en inhibant la pompe d'efflux (Biharee et al., 2020). Silva et al. (2016) ont rapporté que la quercétine la morine, la rutine et la lutéoline montrent un bon effet inhibiteur contre le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline SARM en influençant la pompe d'efflux via la fuite de potassium.

4.3.2.2. Relation structure-activité antibactérienne des flavonoïdes

Selon le résultat de nombreuses recherches, les chalcones avec un groupe lipophile tel que l'isoprénoïde et les groupes méthoxy aux positions 3', 5' et 2' du cycle A sont les inhibiteurs les plus puissants des souches de SMR (Omosa et al., 2016). Basé sur l'activité de l'isobavachalcone, Mbaveng et al. (2008) suggèrent que l'anneau A avec le groupe prényle

présente une bonne activité. De même, le groupe hydroxyle en 4', 4 et 6 des cycles A et B augmente l'activité (figure 23).

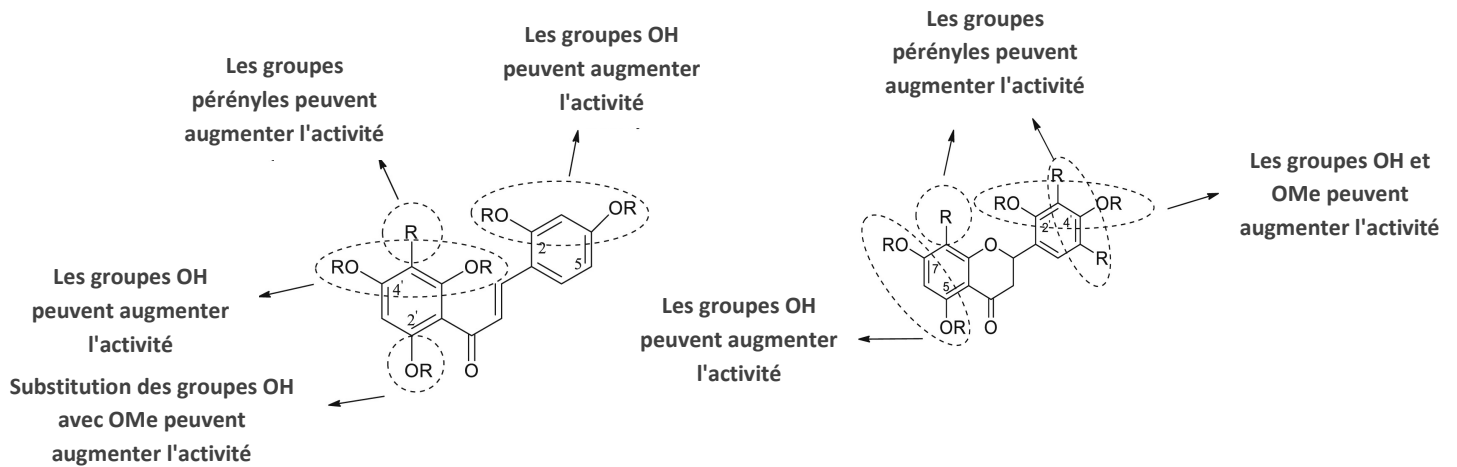


Figure 23 : Relation structure-activité des chalcones (Farhadi et al., 2019).

Figure 24 : Relation structure-activité des Flavanes (Farhadi et al., 2019).

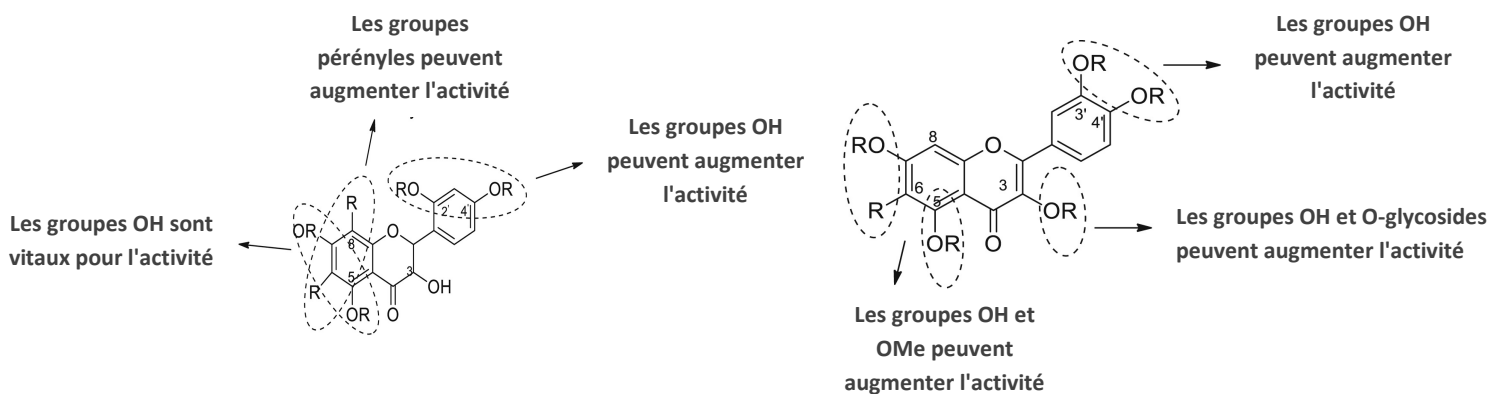


Figure 25 : Relation structure-activité des Flavanols (Farhadi et al., 2019).

Figure 26 : Relation structure-activité des Flavonols (Farhadi et al., 2019).

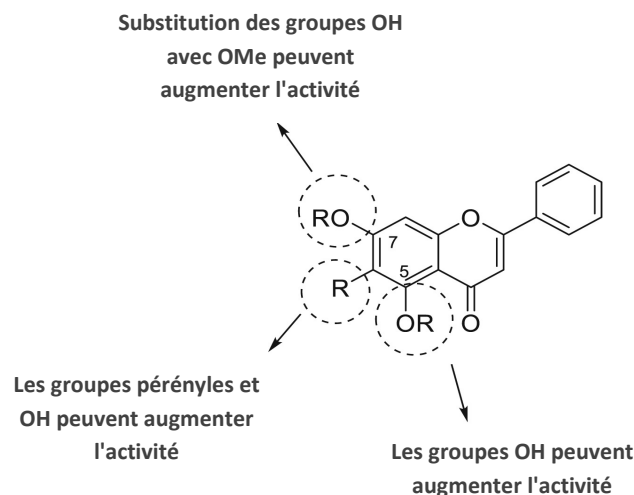


Figure 27 : Relation structure-activité des flavanes (Farhadi et al., 2019)

L'hydroxylation en position 5 et 7 dans le cycle A est importante sur l'activité antibactérienne des flavonols contre les souches de *S. aureus*, en plus, l'hydroxylation sur les cycles B et C augmente également l'activité antimicrobienne de ces composés. Le nombre de groupe glycosylique à la place du groupe hydroxyle en position 3 joue également un rôle important sur l'activité antibactérienne (figure 26) (Farhadi et *al.*, 2019).

Les groupes hydroxyles dans le cycle A (notamment en C-7) sont vitaux pour l'activité antibactérienne, et dans une autre position comme C-5 et C-6 peut augmenter l'activité (figure 27). La présence du groupe prényle (C5) en position 6 sans cyclisation de ce substituant avec le cycle A a également été rapporté pour améliorer l'activité antibactérienne (Omosa et *al.*, 2016).

Chapitre 02

Matériels et méthodes

1. Objectifs de l'étude

Le travail est réalisé au niveau de laboratoire de Bioconversion Génie Microbiologie et Sécurité Sanitaire (LBGMSS) à l'université de Mustapha Stambouli, Mascara sur une période allant de 2014-2021.

La conservation de la flore naturelle obéit à un impératif écologique, à une logique économique et à une obligation déontologique. Le travail qui nous est confié vise à approfondir la connaissance de trois espèces végétales et à les valoriser. Notre étude a été réalisée sur la partie aérienne de trois plantes poussantes à l'état spontané dans la région Ouest d'Algérie. Les plantes sont : *Ajuga iva* (chendgoura), *Adiantum capillus-veneris* (el zzyata), *Lavandula stoechas* (el khila).

Dans un premier temps, on a procédé à une étude phytochimique afin de caractériser les grands groupes chimiques existés dans les différentes plantes par des tests de caractérisation chimiques puis on a réalisé une extraction des flavonoïdes suivie par des tests chromatographiques (CCM, HPLC). Ces composés chimiques sont ceux responsables des activités biologiques des plantes.

Dans un deuxième temps, on a étudié l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits.

2. Matériel végétal (récolte, séchage et broyage)

Le choix des plantes utilisées était basé sur une enquête pharmaco-traditionnelle mais aussi sur leur disponibilité. La récolte d'*Ajuga iva*, *Adiantum capillus-veneris* et *Lavandula stoechas* a été faite au mois de Janvier, Mars, Avril 2014 (période de floraison) Les plantes ont été identifiées par Dr Righi.




<i>Ajuga iva</i> récolté de Mascara	
	<p>Position systématique (Israili et Lyoussi, 2009)</p> <p>Règne : <i>Plantae</i> Sous-règne : <i>Eucaryotes</i> Embrenchement : <i>Spermatophyta</i> Classe : <i>Magnoliopsida</i> Ordre : <i>Lamiales</i> Famille : <i>Lamiaceae</i> Genre : <i>Ajuga</i> Espèce : <i>Ajuga iva</i> L. Nom vernaculaire : <i>Chendgoura</i></p>
<i>Adiantum capillus-veneris</i> récolté d'Ain temouchent	
	<p>Position systématique (Al-Snafi, 2015)</p> <p>Règne : <i>Plantae</i> Sous-règne : <i>Eucaryotes</i> Embrenchement : <i>Pteridophyta</i> Classe : <i>Pteridopsida</i> Ordre : <i>Pteridales</i> Famille : <i>Adiantaceae</i> Genre : <i>Adiantum</i> Espèce : <i>Adiantum capillus-veneris</i> L. Nom vernaculaire : <i>El ziyata</i></p>
<i>Lavandula stoechas</i> récolté de Mascara	
	<p>Position systématique (Chu & Kemper, 2001)</p> <p>Règne : <i>Plantae</i> Sous-règne : <i>Eucaryotes</i> Embrenchement : <i>Spermatophyta</i> Classe : <i>Magnoliopsida</i> Ordre : <i>Lamiales</i> Famille : <i>Lamiaceae</i> Genre : <i>Lavandula</i> Espèce : <i>Lavandula stoechas</i> L. Nom vernaculaire : <i>El khila</i></p>

Figure 28: Matériel végétale

La récolte des différentes espèces a été effectuée dans l'ouest et le nord de l'Algérie à partir de différents sites. Les situations géographiques des différentes stations sont représentées dans le tableau 4.

Tableau 02 : Lieu de récolte des plantes et caractéristiques géographiques des stations d'études

Plante	Station	Longitude	Latitude	Altitude
<i>Ajuga iva</i>	Mohamadia (Mascara)	0°4'12" W	35°35' 25" N	30 m
<i>Adiantum capillus-veneris</i>	Beni saf (Ain temouchent)	1° 23' 1" W	-35° 18' 8" N	25 m
<i>Lavandula stoechas</i>	Nesmot (Mascara)	0° 22' 60" W	35° 15' 0" N	1200 m

Le matériel végétal doit être séché à l'obscurité et à température ambiante (25-30°C), car il est recommandé d'utiliser du matériel végétal séché, congelé ou lyophilisé pour une meilleure extraction ; dans la mesure où certains composés antioxydants (certains flavonoïdes, en particulier les glycosides) sont instables ou peut être dégradé par les enzymes du matériel végétal frais (Bruneton, 1999).

3. Etude phytochimique

3.1. Etude phytochimique qualitative

Elle consiste à caractériser ou à identifier les principaux groupes chimiques d'une plante à partir d'une méthode d'extraction convenable.

L'analyse phytochimique sommaire est réalisée sur la base des tests de coloration caractéristiques en vue de mettre en évidence les grands groupes chimiques. A cet effet, plusieurs types de réactifs ont été utilisés (figures 29, 30, 31).

3.1.1. Préparation des extraits

Les extraits soumis à l'étude phytochimique qualitative sont préparés par une macération de 20g de chaque plante broyée dans 150 ml de chloroforme, méthanol et eau distillée, pendant 72 h sous agitation magnétique. Cette macération est répétée 3 fois en renouvelant le solvant chaque 24 h. Entre chaque renouvellement du solvant, on filtre par papier Whatman n°1. Les macérations de chaque solvant sont réunies et concentrées à 80 ml

sous pression réduite par l'évaporateur rotatif. Les extraits ainsi récupérés sont conservés au réfrigérateur à 4°C (Merghem et *al.*, 1995).

3.1.2. Tests de caractérisation

3.1.2.1. Extrait chloroformique

Les principaux groupes chimiques extractibles en milieu chloroformique selon Ouedraogoy et *al.*, (2001) sont recherchés et identifiés par des réactions de caractérisation (figure 29). Ce sont:

- Alcaloïdes bases (Raymond et Cox, 2010),
- Stérols polyterpènes (Venkata et *al.*, 2010),
- Caroténoïdes (Potchoo et *al.*, 2008),
- Flavones aglyones (Koffi et *al.*, 2009),
- Emodols (Raymond et Cox, 2010),
- Huiles volatils (Raahman, 2008),
- Acides gras (Raahman, 2008).

3.1.2.2. Extrait méthanolique

L'extrait alcoolique qui en résulte, susceptible de contenir des groupes de molécules polaires solubles dans l'alcool (figures 30, 31), ces molécules sont les suivantes:

- Alcaloïdes sels (Raymond et Cox, 2010),
- Tannins
 - ✓ *Test au chlorure ferrique* (Karumi et *al.*, 2004)
 - ✓ *Test au réactif de Stiasny* (Koffi et *al.*, 2009)
- Glycosides cardiaques (Sazada et *al.*, 2009),
- Flavonoïdes
 - ✓ *Test à la soude* (Jack et Okorosaye-Orubite, 2008)
 - ✓ *Test par la réaction à la cyanidine* (Koffi et *al.*, 2009)
- Composés réducteurs (Raymond et Cox, 2010),
- Anthracénosides (Raymond et Cox, 2010),
- Anthocyanes (Potchoo et *al.*, 2008),
- Coumarines (Raymond et Cox, 2010),

- Acides aminés (Raahman, 2008),
- Hétérosides stéroliques et terpéniques (Raymond et Cox, 2010).

3.1.2.3. Extrait aqueux

Le soluté ainsi obtenu renferme les groupes chimiques les plus polaires, qui comprennent (figure 32) :

- Saponosides (Karumi et *al.*, 2004),
- Amidon (Roger, 2007),
- Polyuronides (Kokate et *al.*, 2008).

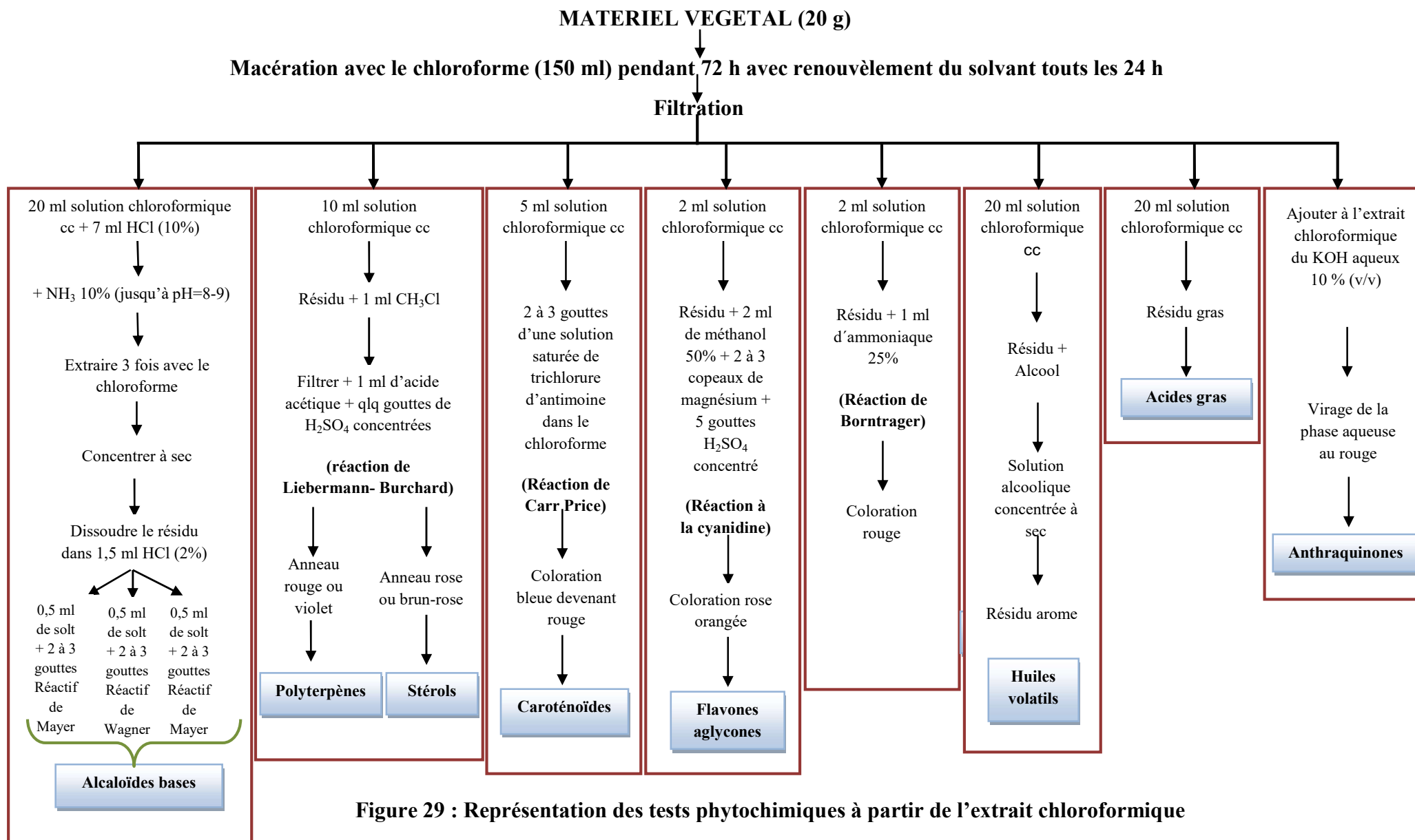
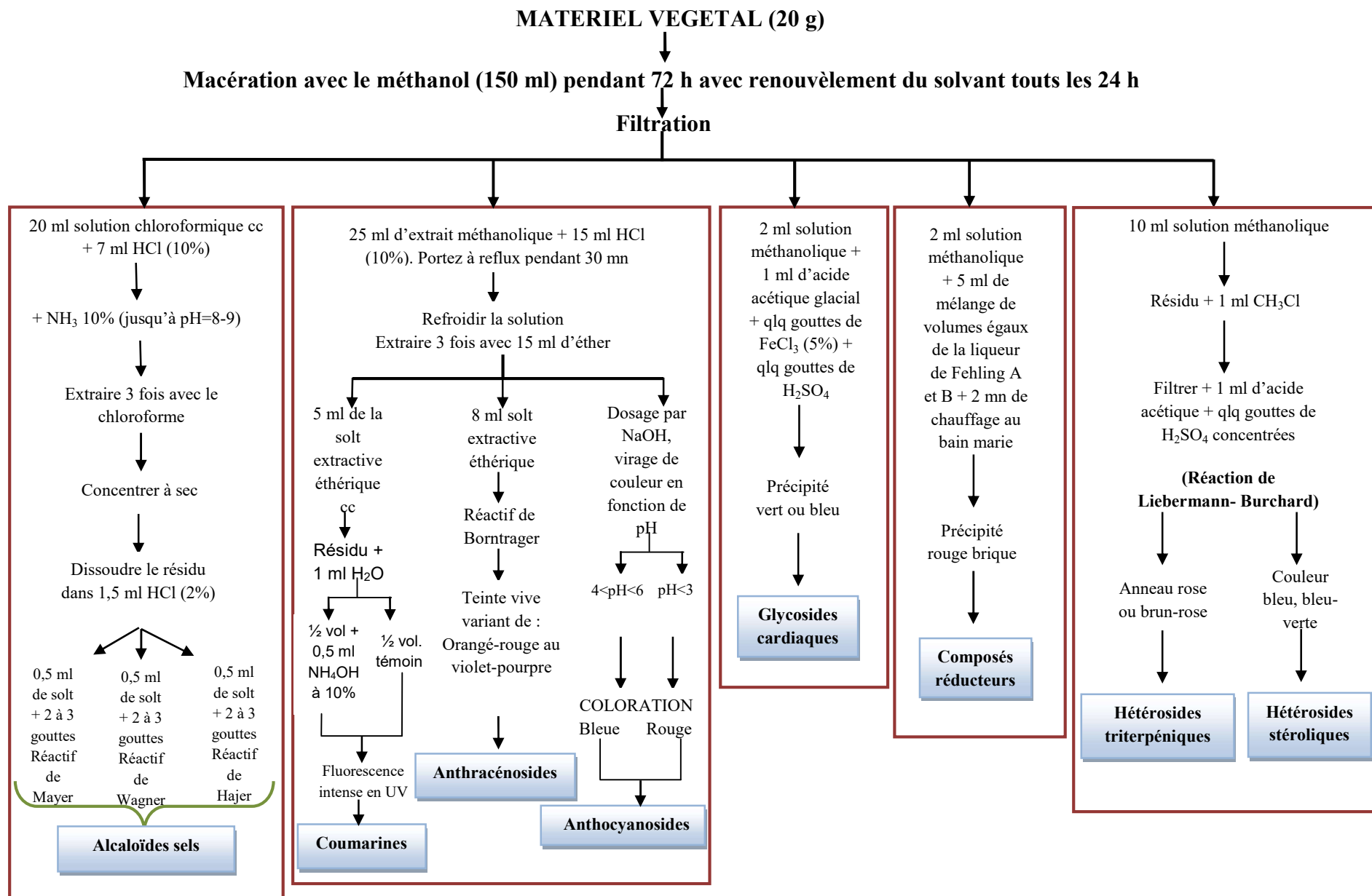


Figure 29 : Représentation des tests phytochimiques à partir de l'extrait chloroformique



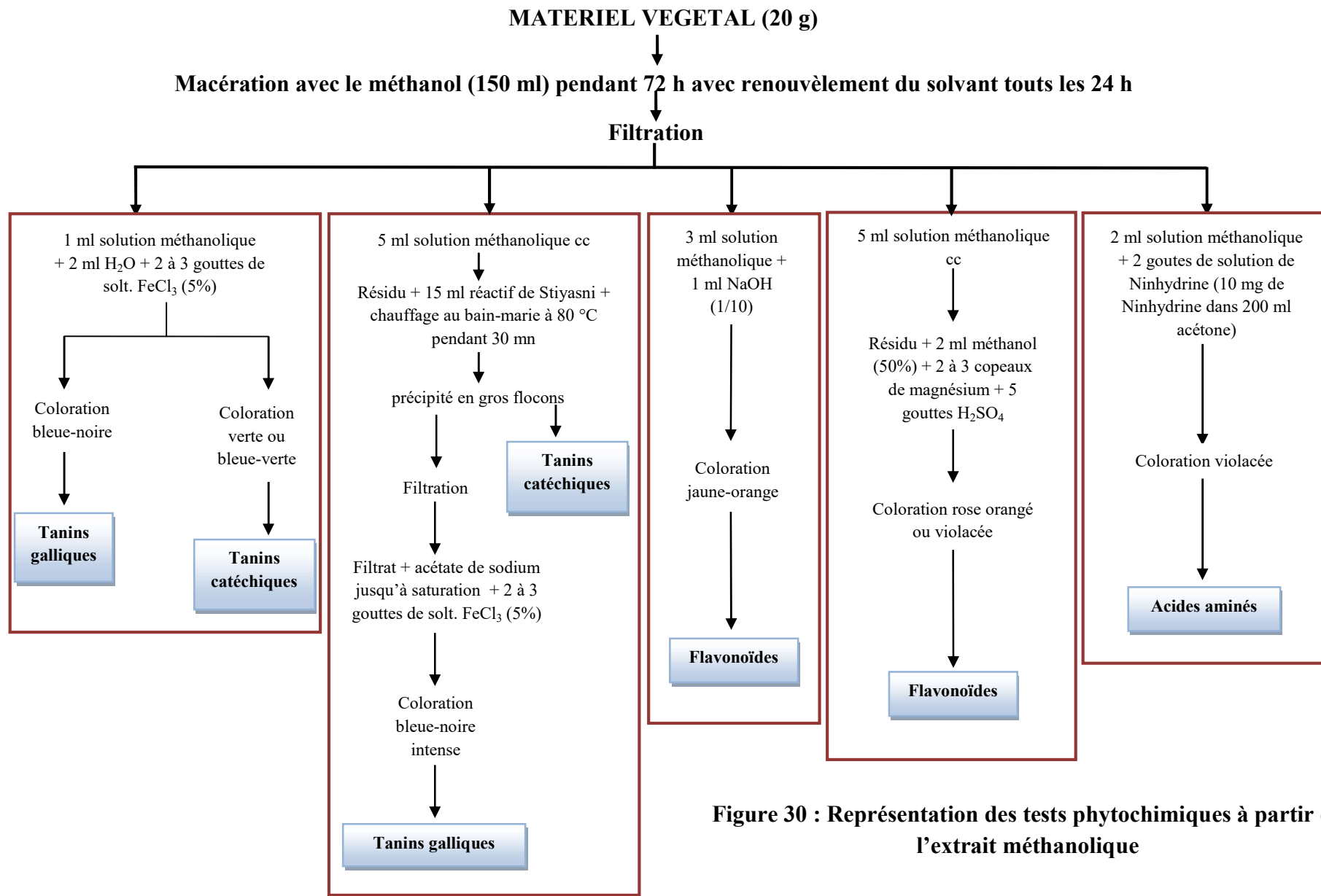


Figure 30 : Représentation des tests phytochimiques à partir de l'extrait méthanolique

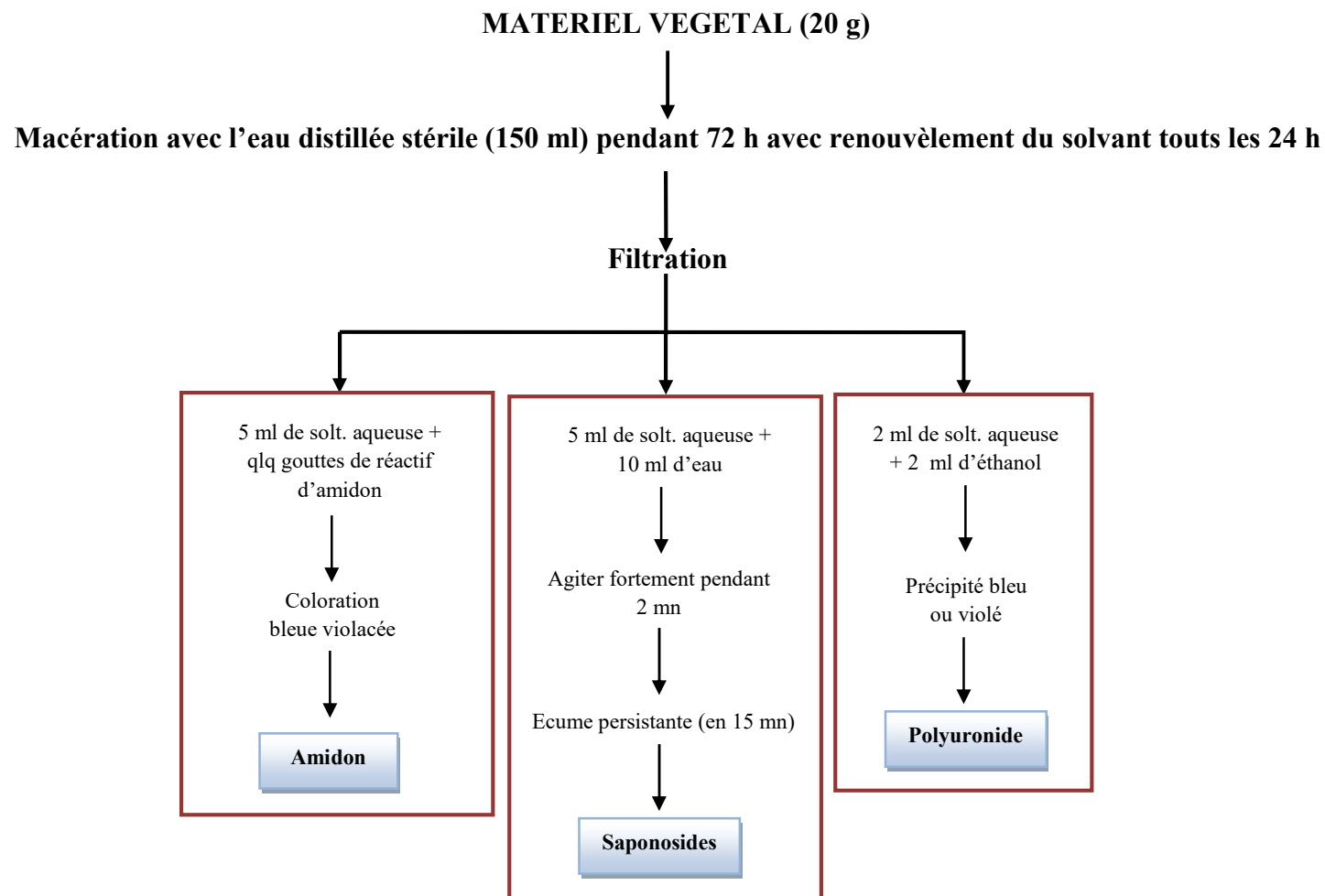


Figure 31 : Représentation des tests phytochimiques à partir de l'extrait aqueux

3.2. Etude phytochimique quantitative

3.2.1. Métabolites primaires

3.2.1.1. Détermination de la teneur en matière sèche

La matière sèche est déterminée par dessiccation d'1g d'échantillon à 105°C jusqu'à poids constant (AOAC, 1990).

3.2.1.2. Détermination de la matière organique et minérale

Les cendres (matières minérales) sont déterminées en incinérant 1g d'échantillon sec dans un four à moufle à 550°C pendant 5 heures (AOAC, 1990). La teneur en matière organique est la différence entre la matière sèche de l'échantillon et les cendres obtenues.

3.2.1.3. Lipides

La teneur en graisse est déterminée à l'aide d'un appareil Soxhlet. La méthode Soxhlet est la méthode de référence utilisée pour la détermination des graisses dans les aliments solides déshydratés. Il s'agit d'une méthode gravimétrique, car l'échantillon est pesé au début et la matière grasse à la fin de l'extraction.

La poudre est pesée (5 g) et placée dans une capsule de cellulose. L'échantillon est extrait en continu avec de l'hexane bouillant qui dissout progressivement la matière grasse. Le solvant contenant la matière grasse retourne dans le ballon par déversements consécutifs provoqués par un jeu de siphon dans le coude latéral. Étant donné que seul le solvant peut se réévaporer, la matière grasse s'accumule dans le ballon et ce jusqu'à la fin de l'extraction. A la suite de l'extraction, l'hexane est évaporé sur un évaporateur rotatif, et la matière grasse est pesée (Lbekwe & Orok, 2010).

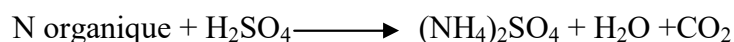
3.2.1.4. Protéines

Le dosage des protéines par la méthode de Kjeldahl (1983) repose sur la minéralisation totale des matières biologiques en milieu acide, suivie de la distillation de l'azote sous forme d'ammoniac. En effet, en présence d'un catalyseur de digestion (mélange de K_2SO_4 , $CuSO_4$ et sélénium), le matériel biologique est minéralisé dans de l'acide sulfurique concentré chaud (H_2SO_4) (600°C) pendant 4 heures. En fin de minéralisation, l'azote existe sous forme minérale $[(NH_4^+)_2, SO_4^{2-}]$. Afin de pouvoir distiller l'azote gazeux par stripping, l'acide sulfurique doit d'abord être neutralisé et l'azote gazeux transformé en

ammoniac gazeux (NH₃). Dans le processus de distillation, l'azote ammoniacal est emporté par la vapeur d'eau et piégé dans de l'acide borique, puis titré avec de l'acide sulfurique (0,1N). Par conséquent, l'opération est réalisée en trois étapes, à savoir la minéralisation, la distillation et le titrage.

Minéralisation

L'échantillon (1 g) est introduit dans le matras de l'appareil à minéralisation (Gerhardt). On ajoute 15 g de sulfate de potassium, une quantité adéquate de catalyseur (1,2 g de sulfate cuivrique et une faible dose de sélénium) et 25 ml d'acide sulfurique pur. Après avoir homogénéisé, on chauffe le matras jusqu'à l'obtention d'une solution claire et verdâtre. Puis laisser refroidir.



Distillation

Cette démarche se fait à l'aide d'une unité de distillation (Gerhardt). Le contenu du ballon a été transféré dans le ballon de distillation. Ajouter ensuite 80 ml d'eau distillée (goutte à goutte) et 80 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium (33%). Un bécher contenant 25 ml d'acide borique (4%) est placé à l'autre extrémité du dispositif. La distillation du mélange a été démarrée en chauffant le ballon pour récupérer plus de 50 ml de distillat.



Titrage

Le titrage est effectué avec H₂SO₄ (0,1N) en plaçant le bécher sous une burette. On laisse couler l'acide sulfurique jusqu'à ce que la couleur passe du jaune clair au rose pâle. On relève le volume de H₂SO₄ correspondant à la neutralisation (Norme Algérienne, 1992).

$$N\% = 0,014 \times 0,1 \times V \times 100 / P$$

V: volume de H₂SO₄ versé dans burette lors de titrage en ml,

P : prise d'essai en gramme,

0,014 : correspondre à l'acide sulfurique,

0,1 : normalité de H₂SO₄.

N : l'azote

$$\text{Protéines \%} = N\% \times 6,25$$

6,25 : facteur de conversion pour les protéines végétales

3.2.1.5. Sucres

Pour déterminer les sucres totaux dans les échantillons, nous avons appliqué la méthode de Dubois et *al.* (1956). La présence d'acide sulfurique à chaud permet de déshydrater les glucides en dérivés du furfural, qui se combinent avec le phénol en produisant une couleur rose saumon permanente (le glucose fournit l'hydroxyfurfural). L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 490 nm.

Le protocole d'extraction consiste à faire bouillir 10 grammes de matière végétale sèche dans 100 millilitres d'éthanol à 60 % pendant 20 minutes. Après refroidissement, l'extrait est filtré (Langemeier & Rogers, 1995).

Pour chaque échantillon, nous procédons comme suit : l'addition de 1 ml d'échantillon à 1 ml de phénol à 5 % m/v (5 g de phénol dans 100 ml d'eau distillée glacée). Tout est homogénéisé par le vortex. Ensuite, nous ajoutons 5 ml de H₂SO₄ concentré. Le mélange est incubé au bain-marie à 100°C pendant 5 minutes. Ensuite, les échantillons ont été incubés à l'obscurité pendant 30 minutes. La lecture de l'absorbance a été réalisée par un spectrophotomètre (JANWAY 6405, UK) à une longueur d'onde de 490 nm sur un blanc contenant toutes les solutions à l'exception de l'extrait. Pour déterminer la courbe d'étalonnage, dix solutions étalons de glucose avec une concentration allant de 0 à 200 µg/ml ont été préparées (l'eau physiologique stérile a été utilisée comme diluant). Une fois l'absorbance de chaque concentration déterminée, une courbe d'étalonnage est établie. La quantité des sucres Q (mg) que renferme chaque échantillon est déterminée selon l'équation suivante :

$$Q = 1xVxC/P$$

C étant la concentration de sucres de l'échantillon, dégagée à partir de la courbe d'étalonnage,

V : volume d'échantillon,

P : poids de l'échantillon.

3.2.2. Métabolites secondaires

Dégraissage du matériel végétal

Une quantité de 2 g du matériel végétal réduit en poudre est dégraissée avec 100 ml d'éther diéthylique pendant 2 h à l'aide de l'appareil soxhlet. Cette poudre sera destinée aux différents dosages des métabolites secondaires (Harisaranraj et *al.*, 2009).

3.2.2.1. Flavonoïdes

Cinq grammes du matériel végétal sont mélangés à 50 ml de méthanol à 80 % ; le processus d'extraction est réalisé à température ambiante. Le mélange est promptement filtré, puis réextrait trois fois par le même solvant. Les différents filtrats recueillis sont réunis et évaporés pour obtenir un résidu sec, dont la masse représente le rendement en flavonoïdes pour 5 g de matériel végétal (Okwu, 2005).

3.2.2.2. Tanins

Les tanins sont extraits avec de l'acétone à 70%. Dix grammes de matériel végétal sont soumis à une macération dans 100 ml du solvant durant 30 minutes. Cette opération est répétée trois fois. Après avoir été filtré et évaporé, le résidu sec est pesé pour déterminer le taux des tannins. (Troszynska et Ciska, 2002).

3.2.2.3. Saponosides

10 grammes de matériel végétal est mélangé avec 100 millilitres d'éthanol à 20 %. L'extraction a été réalisée dans un bain-marie à 55°C sous agitation. Cette phase a duré 4 heures et a été répétée une seconde fois pour le résidu obtenu après filtration. Les filtrats recueillis ont été concentrés jusqu'à un volume égal à 40 ml. Ensuite, nous avons réalisé une série d'extractions liquide-liquide. Pour cela, on utilise deux fois 20 ml d'éther. Ensuite, on élimine la phase d'éther et on commence la deuxième extraction liquide-liquide avec du n-butanol en ajoutant trois fois 40 ml de n-butanol à la phase aqueuse obtenue après l'extraction à l'éther. La phase de n-butanol est lavée deux fois avec 20 ml de solution de NaCl à 5%, puis concentrée en un résidu sec dont le poids représente le rendement en saponine (Harisaranraj et *al.*, 2009).

3.2.2.4. Alcaloïdes

Un mélange de 5 g d'échantillon et 200 ml d'acide acétique à 10 % dans de l'éthanol, est recouvert et laissé pendant 4 heures. On filtre et concentre l'extrait au bain-marie jusqu'à un quart du volume initial. L'hydroxyde d'ammonium concentré a été ajouté goutte à goutte à l'extrait jusqu'à précipitation complète. Le précipité obtenu a été rincé avec une solution diluée d'hydroxyde d'ammonium et filtré. Le résidu est un alcaloïde, qui a été séché et pesé (Doherty *et al.*, 2010).

3.2.2.5. Huiles essentielles

L'hydrodistillation vise à amener à ébullition un mélange d'eau et d'un produit naturel, pour ensuite condenser les vapeurs. L'eau bouillante permet aux cellules du produit naturel de s'éclater, et libèrent les espèces aromatiques. Les huiles essentielles sont très volatiles et sont ensuite emportées par la vapeur (Ruest & Mongrain, 1999).

Le processus a été effectué à l'aide d'un équipement de distillation simple. Dans un ballon de 1 litre, nous avons mis 500 millilitres d'eau distillée et des pierres à ponces puis, on ajoute 120 g de la substance dont nous voulons extraire les huiles essentielles. Le mélange est soumis au reflux. La vapeur d'eau entraîne des produits organiques volatils, qui sont condensés dans le réfrigérant et recueillis à l'autre extrémité du montage. Le distillat obtenu contient deux phases : une phase aqueuse et une phase organique. Les huiles essentielles sont ensuite récupérées par extraction liquide-liquide.

La phase organique renferme la plupart des composés odorants et la phase aqueuse en contient une partie. Afin de récupérer cette quantité, on ajoute du sel au mélange et on agite le mélange jusqu'à ce que le sel soit complètement dissous. L'ajout du sel chasse le peu d'huile qui s'était dissoute dans l'eau : c'est le relargage.

On verse le distillat et l'hexane (v/v) dans l'ampoule à décanter et on agite pendant au moins deux minutes en maintenant le bouchon en place et en n'oubliant pas de relâcher de temps en temps la surpression : le dégazage s'effectue par écoulement de l'air vers le vitre de protection. L'hexane a une densité de 0,684 (Protrade, 1994), la phase aqueuse est donc ici la plus dense : il faut d'abord l'éliminer avant de récupérer la phase organique, qui est la moins dense.

Un agent déshydratant, le sulfate de magnésium anhydre, est utilisé pour éliminer le peu d'eau qui a pu être retenu dans la phase organique. Cette opération correspond au séchage.

Le solvant organique, l'hexane, est éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Il est important de ne pas surchauffer le bain de l'évaporateur rotatif.

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante à utiliser. Le rendement, estimé en pourcentage, est formulé par la relation suivante:

$$R = (P_H / P_P) \times 100$$

Où :

R : rendement en huile essentielle exprimée en pourcentage,

P_H : poids de l'huile en gramme,

P_P : poids de la plante en gramme.

4. Extraction des flavonoïdes

4.1. Préparation des extraits bruts méthanoliques

La procédure de Merghem et *al.* (1995) a été poursuivie pour extraire les flavonoïdes en utilisant des solvants organiques de polarité croissante. Selon cette méthode, 100 g de la poudre sont mélangés à 1 litre de méthanol et d'eau distillée (85/15 v/v). Le mélange a été agité pendant une nuit à 4°C et laissé au repos pendant quelques heures. La fraction flottante a ensuite été filtrée pour obtenir le filtrat 1, ceci est conservé à 4°C. L'extraction a été répétée une fois et le précipité a été complété à 1 litre avec du méthanol à 50% pour obtenir le filtrat 2 qui a été ajouté au filtrat 1.

Les macérations hydroalcooliques sont ensuite rassemblées et évaporées à sec sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu sec est ensuite repris dans de l'eau distillée bouillante (200 ml) qui dissout quantitativement les composés phénoliques ; une décantation de 12 heures au réfrigérateur complétée par une ou plusieurs filtrations permet de débarrasser les "boues" (graisse, résine). Cette purification facilitera largement les analyses chromatographiques.

4.2. Fractionnement

Différentes étapes ont été franchies pour obtenir les différentes fractions (phases). L'extrait brut ainsi obtenu a été confronté plusieurs fois à différents solvants organiques :

- Ether diéthylique : permet de retenir les pigments chlorophylliens, les caroténoïdes et les lipides.
- Acétate d'éthyle : cette extraction a pour effet d'éliminer les mono-glucosides et partiellement les di-o-glucosides.
- Méthyléthylcétone (butanone) : ce solvant permet de retenir essentiellement les di-o-glycosides, tri-o-glycosides et c-glycosides restants.

Ces confrontations sont réalisées dans des ampoules à décanter. La phase aqueuse et le solvant (v/v) sont mélangés vigoureusement en laissant à chaque fois s'échapper les gaz du produit. Après une pause d'une heure et demie, la phase aqueuse et le solvant utilisé, chargé de polyphénols et flavonoïdes, sont séparément récupérés. Pour chaque solvant (chaque partition), l'opération est répétée deux ou trois fois pour un entraînement maximal des groupes polyphénoliques.

Après avoir effectué plusieurs lavages, les phases aqueuses résiduelles sont aussi prises. Les différentes phases sont évaporées à sec au rotavapour et récupérées dans le méthanol pour les dosages, le diagnostic chromatographique et l'activité antioxydante et dans le DMSO pour l'activité antibactérienne.

Le schéma ci-dessous présente les différentes étapes de l'extraction :

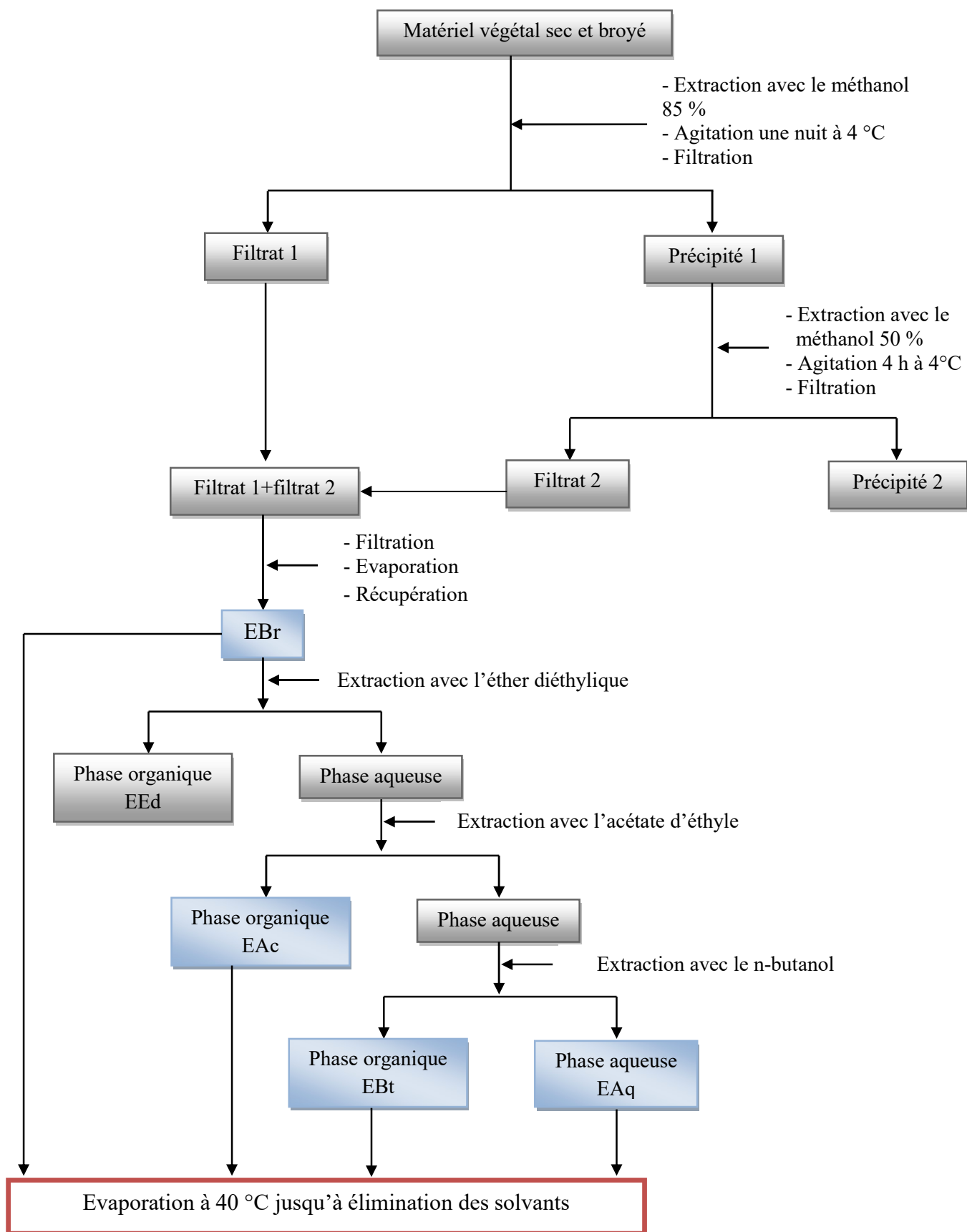


Figure 32 : Etapes de l'extraction des flavonoïdes par la méthode de Merghem *et al.*, 1995.

(EBr) extrait brut, (EEd) extrait d'éther diéthylique, (EAc) extrait d'acétate d'éthyle, (EBt) extrait butanolique, (EAq) extrait aqueux.

4.3. Calcul du rendement en extrait sec

Le rendement des quatre phases (EBr, EAc, EBt, EAq) des trois plantes en extrait sec peut être déterminé en calculant le rapport suivant

$$Rdt (\%) = (P1 - P2) \times 100 / P3$$

P1 : poids du ballon après évaporation,

P2 : poids du ballon avant évaporation (ballon vide),

P3 : poids de la matière végétale de départ.

4.4. Dosage des polyphénols

Les métabolites secondaires représentent un large éventail de molécules végétales, dont le contenu et la nature chimique varient énormément d'une espèce à l'autre. Pour la quantification des phénols totaux, plusieurs méthodes analytiques peuvent être envisagées. Le procédé d'analyse par le réactif de Folin Ciocalteu est le plus employé.

Ce réactif est composé d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3 PW_{12} O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3 PMO_{12} O_{40}$). Par oxydation, il est réduit en un mélange d'oxydes bleus. La coloration obtenue est en relation avec la quantité de polyphénols contenus dans l'extrait analysé (Boizot & Charpentier, 2006).

Les polyphénols ont été quantifiés par analyse spectrophotométrique, conformément au protocole adopté par Miliauskas *et al.* (2004).

Nous procédons à mélanger 1 ml d'extrait (à concentration connue) de la plante avec 5 ml de Folin Ciocalteu (2 M) dilué 10 fois et 4 ml de carbonate de sodium ($Na_2 CO_3$) à une concentration de 75 g/l. Nous mesurons l'absorbance à 765 nm, après 1 heure d'incubation à température ambiante par rapport au blanc (contenant toutes les solutions sauf l'extrait). La courbe d'étalonnage est établie avec l'acide gallique, en appliquant les mêmes étapes du dosage. La concentration des composés phénoliques dans les extraits secs est calculée en utilisant l'équation : $y = 0.001x + 0.020$ obtenue à partir du graphique standard de l'acide

gallique (figure 33) et elle est exprimée en milligrammes équivalents d'acide gallique par grammes du poids d'extrait (mg EAG/g E). Les lectures sont reprises 3 fois.

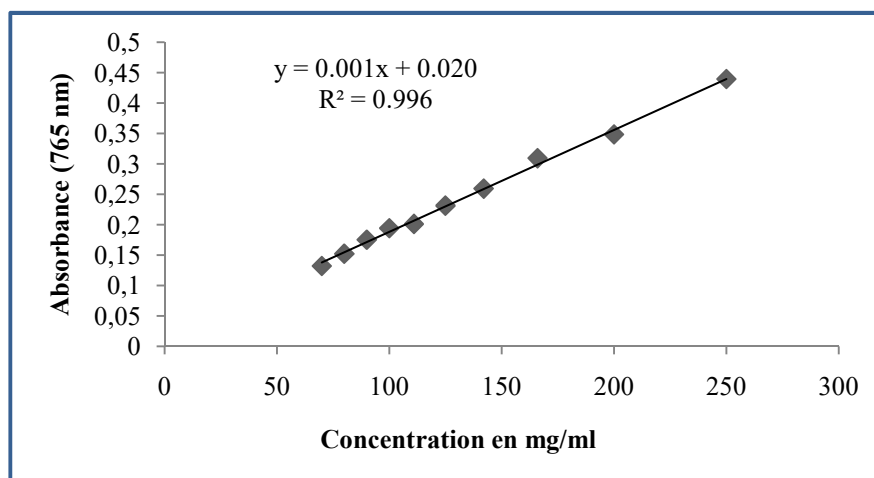


Figure 33 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (mg/ml)

4.5. Dosage des flavonoïdes

La détermination des flavonoïdes est effectuée par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium et à la soude. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe rose qui absorbe dans le champ visible à 510 nm (Weirong et *al.*, 2010).

La détermination des flavonoïdes a été réalisée en utilisant la méthode colorimétrique développée par Ardestani & Yazdanparast (2007). 500 μ l de chaque extrait des trois plantes étudiées ont été mélangés séparément avec 2 ml d'eau distillée, puis 150 μ l d'une solution de nitrite de sodium à 15% (NaNO_2) ont été ajoutés. Après 6 minutes, 150 μ l de chlorure d'aluminium à 10% ($\text{AlCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$) ont été ajoutés au mélange. Ensuite 2 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 1 M est introduit dans le tube et complété immédiatement le volume final à 5 ml. Par rapport au blanc (contenant toutes les solutions sauf l'extrait), la lecture est effectuée par un spectrophotomètre après 15 minutes à 510 nm. En même temps, la catéchine a été utilisée comme contrôle positif, et la courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales. La concentration des flavonoïdes est calculée en utilisant l'équation : $y = 2.619x + 0.022$ obtenue à partir du graphique standard de la catéchine (figure 34) Les résultats sont donnés en milligrammes d'équivalents de catéchine par gramme de matière végétale sèche (mg CE/g E).

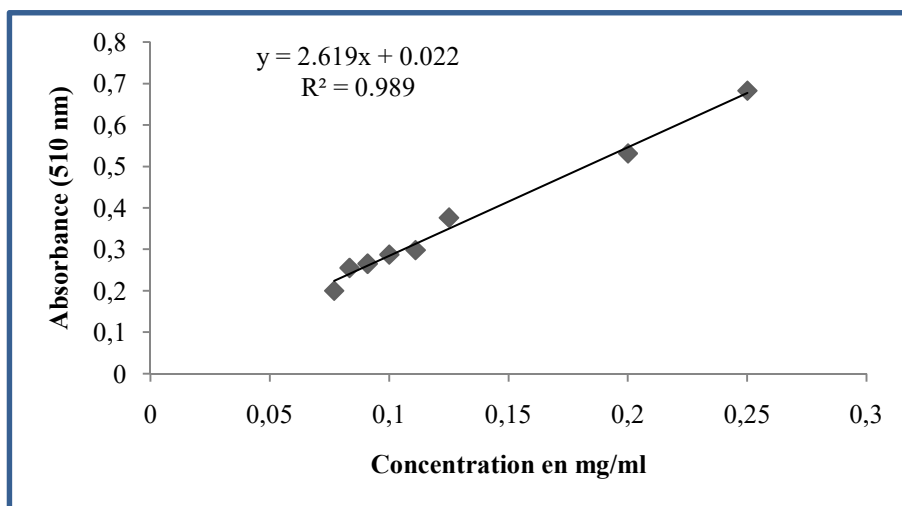


Figure 34 : Courbe d'étalonnage de catéchine (mg/ml)

5. Chromatographie des extraits

La chromatographie solide-liquide est une technique de séparation où le phénomène d'adsorption peut être considéré comme prédominant. Chaque soluté est soumis à deux forces:

- Une force d'entraînement par adsorption sur l'adsorbant fixe polaire,
- Une force d'entraînement par éluant plus ou moins apolaire. L'éluant est composé d'un solvant vecteur peu polaire et peu visqueux et d'un solvant actif plus ou moins polaire dont il faut rechercher la proportion idéale pour obtenir une bonne séparation des solutés (Heftmann, 2004).

5.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Une plaque de CCM se compose d'un support en aluminium sur le quel est fixé une fine couche d'un milieu d'adsorption (gel de silice) comme phase stationnaire. On la place en position verticale ou légèrement inclinée dans une cuve en verre. Elle repose contre l'une des parois et est immergée d'environ 0.5 cm dans la phase mobile, qui est constituée d'un ou plusieurs solvants, et dont les vapeurs auront préalablement saturé la cuve fermée. L'échantillon à étudier, déposé à l'état liquide par une micropipette (5 μ l) et éventuellement séché, sera plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le

haut de la plaque. Le comportement de chaque molécule sur la plaque dépend des interactions existantes entre soluté, phase mobile et phase stationnaire.

Le système utilisé pour les fractions acétate d'éthyle, n-butanol, hydrométanolique et aqueuse est le suivant : Toluène / n-Butanol / Méthanol / Ether de pétrole (40 / 30 / 30 / 05). L'identification des substances isolées se fait par différentes méthodes:

- Directement si les substances sont colorées,
- A l'aide d'un révélateur si elles sont incolores afin de les transformer en taches colorées. La plupart des substances dont l'absorption est supérieure à 230 nm sont étudiées par irradiation avec une lumière UV à ondes courtes (254 nm) ou à ondes longues (366 nm). Le caractère d'une des molécules dans un système déterminé est défini par son R_f (rapport frontal), qui est le rapport entre la distance que parcourt cette molécule et celle que parcourt la phase mobile (front de solvant) et qui est donc compris entre 0 et 1 (Hostettmann et *al.*, 1998).

Après développement du chromatogramme, la plaque est séchée à température ambiante puis examinée à l'UV à la longueur d'onde 256 nm et 366 nm.

5.2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC-DAD-ESI-MS)

La chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (MS) nous permet de séparer et d'identifier qualitativement des constituants d'un mélange liquide. De plus, cette méthode est utilisée pour confirmer la présence des flavonoïdes dans les extraits.

L'identification des différents extraits a été réalisée au niveau du laboratoire de bio-végétale de l'Université « Ebdelhamid Ibne Badice » à Mostaganem.

L'identification chimique des fractions a été réalisée à l'aide d'un appareil HPLC Shimadzu Prominence-I équipé d'une pompe (iLC-2030 3D), d'un détecteur DAD (Surveyor UV-Vis Array) et d'un spectromètre de masse LCQ Advantage (tous de Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), couplés par une source d'ionisation électrospray (ESI). Les flavonoïdes ont été séparés sur une colonne Ascentis Express C-18 (150 mm x 4.6 mm, taille des particules 2.7 μm) à 25°C (Supelco, Bellefonte, PA, USA). L'éluant A était l'acide acétique solution aqueuse (0.075%) et l'éluant B était une solution de méthanol-acide acétique

(0.075%). La séparation a été réalisée dans une étape isocratique : 2% de B pendant 5 min, suivie d'un gradient linéaire de 2% à 20% de B en 15 min, puis à 100% de B en 65 min et 100% de B en 68 min avec un débit de 0.8 ml/min et un volume d'injection de 5 μ l. Les chromatogrammes ont été enregistrés à 280 nm.

6. Evaluation des activités antioxydantes

Préparation des solutions d'extraits

Une gamme de dilution de chacun des extraits a été élaborée pour en déterminer l'activité antioxydante. Le méthanol a été utilisé pour solvabiliser l'extrait sec, les concentrations utilisées étaient : C₁=1000 μ g/ml, C₂=500 μ g/ml, C₃=250 μ g/ml, C₄=125 μ g/ml, C₅=62.5 μ g/ml, C₆=31.25 μ g/ml, C₇=15.625 μ g/ml, C₈=7.81 μ g/ml, C₉=3.90 μ g/ml, C₁₀=1.95 μ g/ml.

6.1. Piégeage des radicaux DPPH[•]

Le pouvoir antiradicalaire d'une molécule peut être apprécié par une technique colorimétrique en utilisant des radicaux de substitution dont le radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl appelé DPPH[•] (figure 35).

Le radical DPPH[•] présente en effet, à température ambiante et en solution, une intense coloration violacée. Son passage à la forme non-radicalaire, après saturation de ses couches électroniques, est accompagné d'une extinction de la coloration violette (Kouamé et *al.*, 2009) (figure 35).

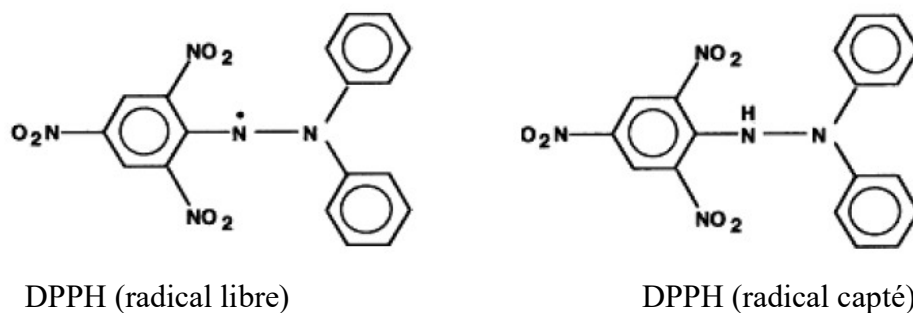


Figure 35 : Forme libre et réduite du DPPH (Kouamé et *al.*, 2009)

Les solutions à analyser pour leur pouvoir antiradicalaire sont solubilisées dans du méthanol à différentes concentrations. 50 μl de ces solutions sont mélangés à 1950 μl d'une solution méthanolique de DPPH \cdot (6.10^{-5} M). Ce mélange est fortement agité pendant 30 secondes, puis incubé durant 30 minutes à température ambiante dans l'obscurité. Ensuite, on mesure l'absorbance du mélange réactionnel à 517 nm par rapport à un blanc de méthanol pur (Shimada et *al.*, 1992). L'acide ascorbique et la catéchine ont été utilisés à des fins de comparaison (figure 36).

Finalement, on a évalué l'activité antiradicalaire des composés testés vis-à-vis d'une solution méthanolique de radicaux DPPH \cdot .

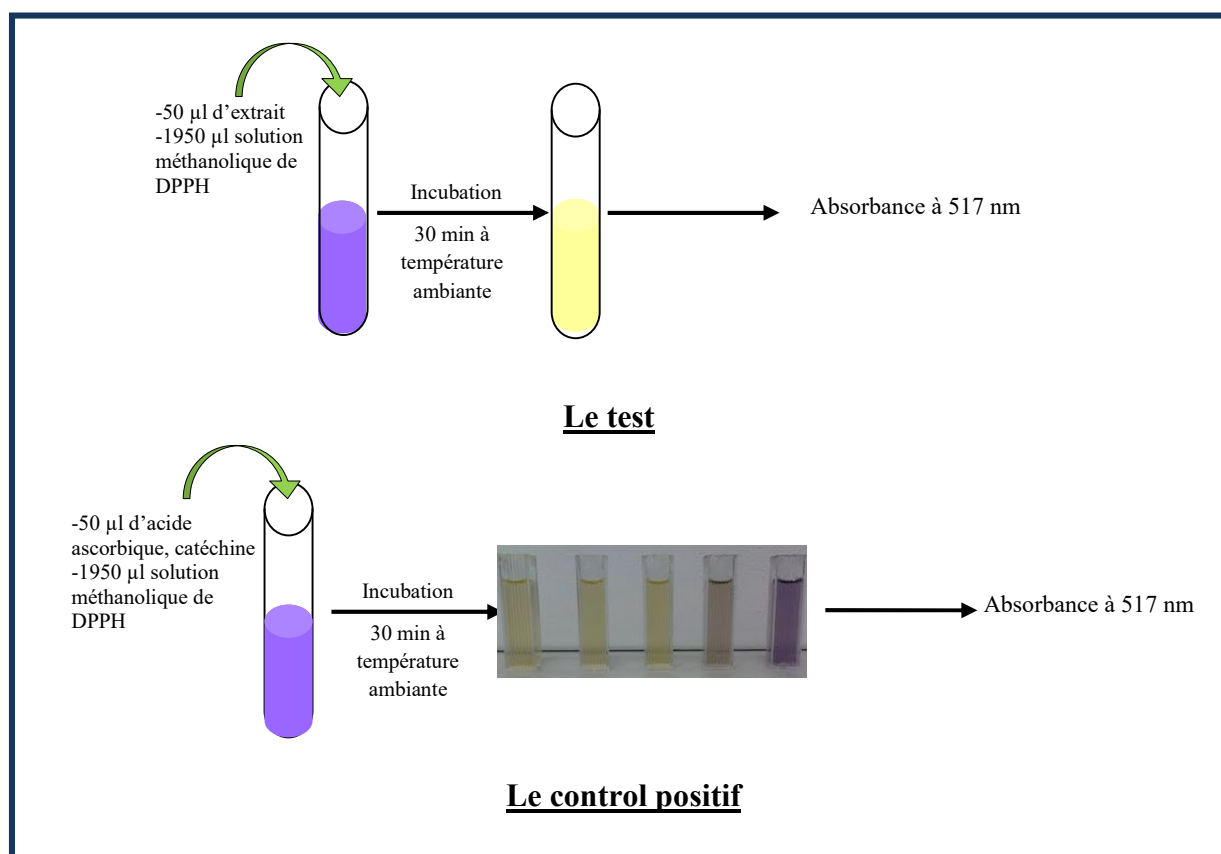


Figure 36: Test de DPPH

Le pourcentage d'inhibition de la production de radicaux libres DPPH \cdot est calculé selon la formule suivante :

$$PI = (1 - DO_{\text{Molécule à tester}} / DO_{100\%}) \times 100$$

PI : pourcentage d'inhibition

DO Molécule à tester : absorbance de la solution des molécules à tester en présence du DPPH[•]

DO 100% : absorbance de la solution contenant uniquement la solution de DPPH[•]

IC₅₀ a été calculée à partir du graphique de régression linéaire et elle correspond à la concentration de substrat qui inhibe 50% des radicaux DPPH[•] présents dans le milieu réactionnel.

6.2. Réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power)

Le potentiel réducteur d'un extrait est en corrélation avec sa capacité antioxydante. L'activité réductrice du fer de nos extraits est évaluée selon la méthode d'Oyaizu (1986), qui repose sur la réduction chimique du fer (III) présent dans le complexe K₃Fe (CN)₆ en fer (II). On détermine l'absorbance du milieu réactionnel à 700 nm. Une hausse de l'absorbance indique une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Hubert, 2006).

À 1 ml de chaque extrait à différentes concentrations dans le méthanol, on ajoute 2.5 ml de tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 ml de ferrocyanure de potassium [K₃Fe (CN)₆, 1%]. Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min dans un bain-marie. Après incubation, 2.5 ml d'acide trichloracétique (TCA 10%) sont ajoutés au mélange, qui est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min. 2.5 ml du surnageant sont mélangés avec 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml d'une solution de FeCl₃ (0.1%) fraîchement préparée dans de l'eau distillée, et le mélange est incubé à 35 °C pendant 20 min (figure 37).

L'absorbance est mesurée à 700 nm par rapport à un blanc contenant toutes les solutions sauf l'extrait et le chlorure ferrique.

La valeur EC₅₀ correspond à la concentration efficace donnant une absorbance de 0.5 pour le pouvoir réducteur et elle a été obtenue à partir d'une analyse de régression linéaire. Le contrôle est réalisé par différentes concentrations de catéchine et d'acide ascorbique.

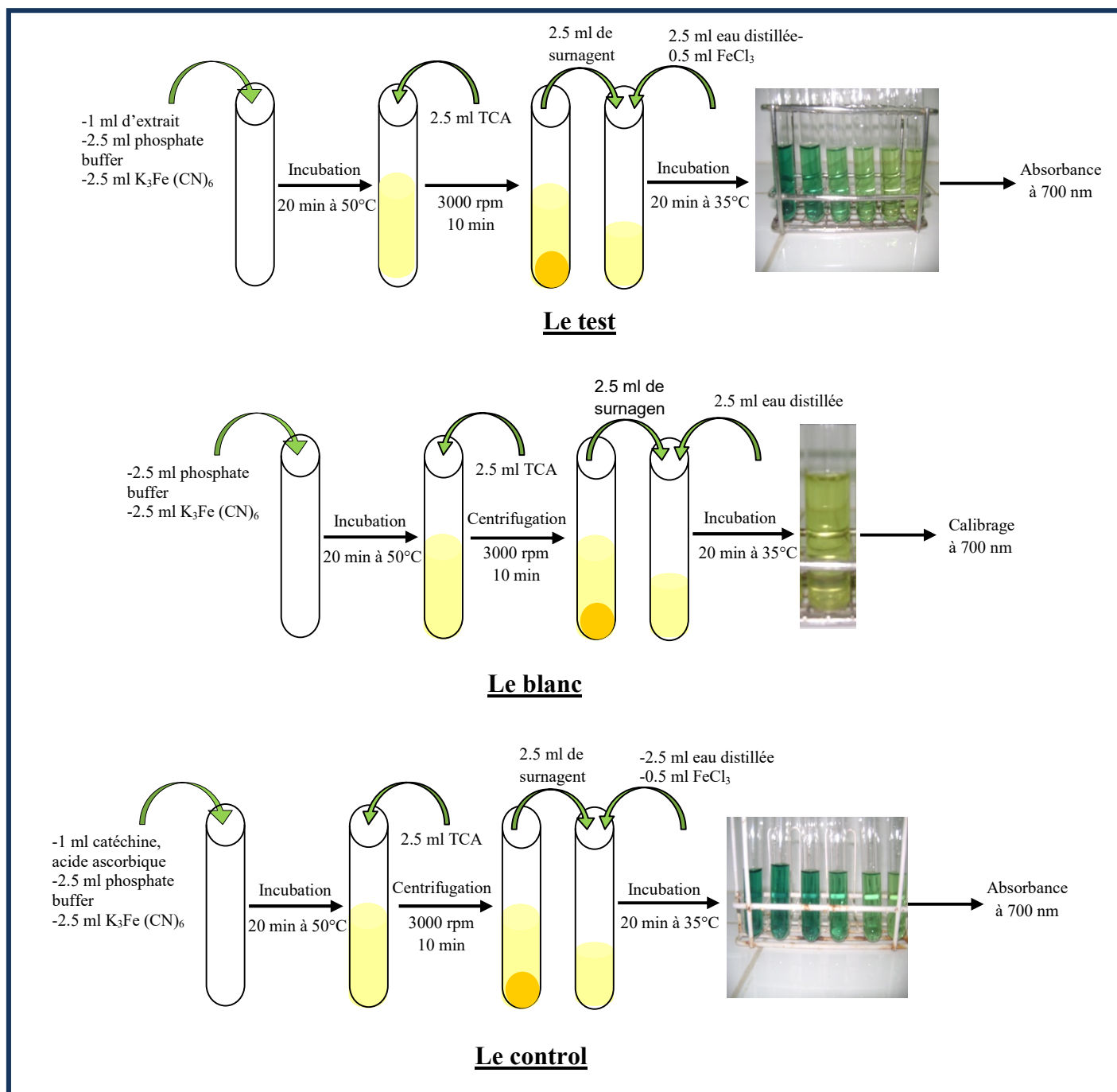


Figure 37 : Test de réduction du fer

6.3. Test de peroxydation lipidique

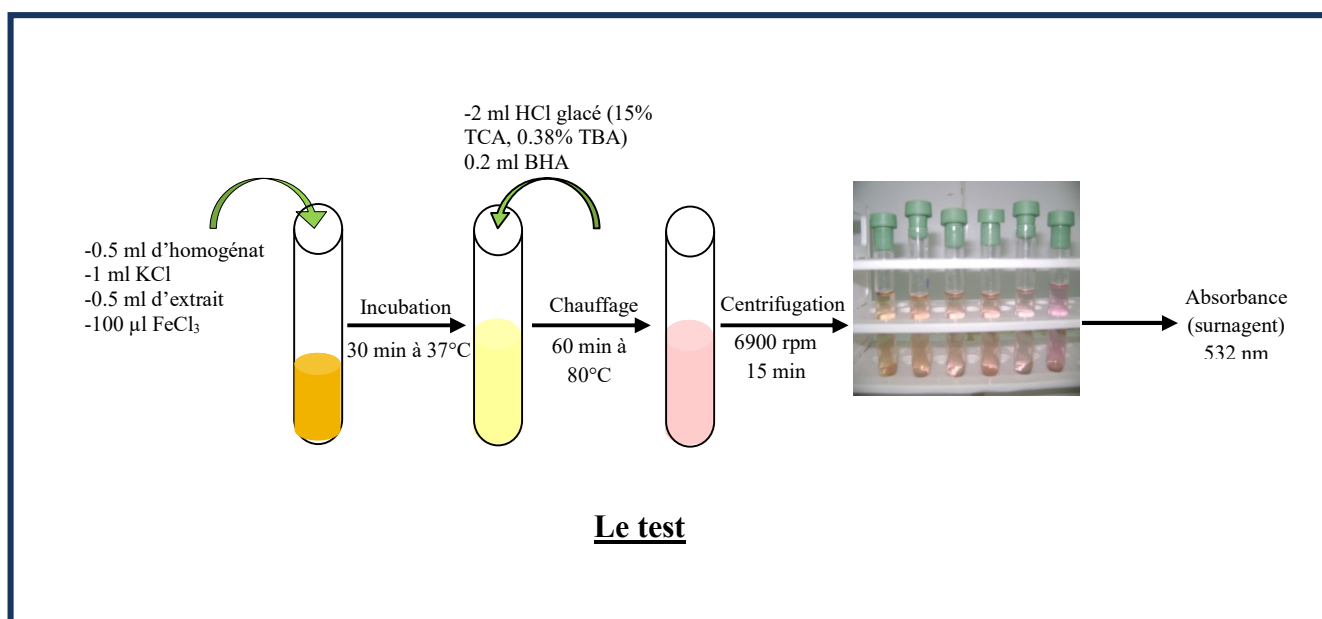
La peroxydation lipidique est un mécanisme bien établi des lésions cellulaires chez les plantes et les animaux et est utilisée comme un indicateur du stress oxydatif dans les cellules et les tissus. Les peroxydes de lipide sont instables et se décomposent pour former une série complexe de composés dont les composés carbonylés réactifs. Les peroxydes d'acides gras

polyinsaturés génèrent le malondialdéhyde (MDA). Le MDA réagit avec le TBA en donnant un pigment rose dont l'intensité est mesurée à 532 nm (Singh *et al.*, 2007).

Le test est réalisé selon le protocole décrit par Tatyia & Saluja (2010). Le mélange contient 0.5 ml d'homogénat (10 %), 1 ml de KCl (0.15 M) et 0.5 ml de différentes concentrations de chacun des extraits. La peroxydation lipidique est initiée par l'ajout de 100 μ l de chlorure ferrique (1 mM). Le mélange réactionnel est incubé pendant 30 min à 37°C. Après incubation, la réaction est stoppée par l'ajout de 2 ml de HCl glacé (0.25 N) contenant 15% acide trichloroacétique (TCA) et 0.38 % acide thiobarbiturique (TBA), et 0.2 ml de Butylated hydroxyl toluene (BHA, 0.05 %). Ces mélanges réactionnels sont chauffés pendant 60 min à 80 °C, refroidie et centrifugée à 6900 rpm pendant 15 min. L'absorbance du surnageant est mesurée à 532 nm contre un blanc qui contenait tous les réactifs à l'exception d'homogénat de foie et l'extrait. Des expériences identiques ont été effectuées pour déterminer le normale (sans extrait et FeCl_3) et le niveau de peroxydation lipidique dans le tissus (avec du FeCl_3 et sans extrait) (figure 38).

Préparation d'homogénat

Après dissection des rats, le foie est rapidement prélevé, bien rincé avec l'eau physiologique et homogénéisé à 4 °C dans une solution de KCL (0.15 M) à raison de 10 %. L'homogénat obtenu est centrifugé à 800 rpm pendant 15 min pour éliminer les débris cellulaires, le surnageant est récupéré pour étudier l'antiperoxydation lipidique *in vitro* (Singh *et al.*, 2007).



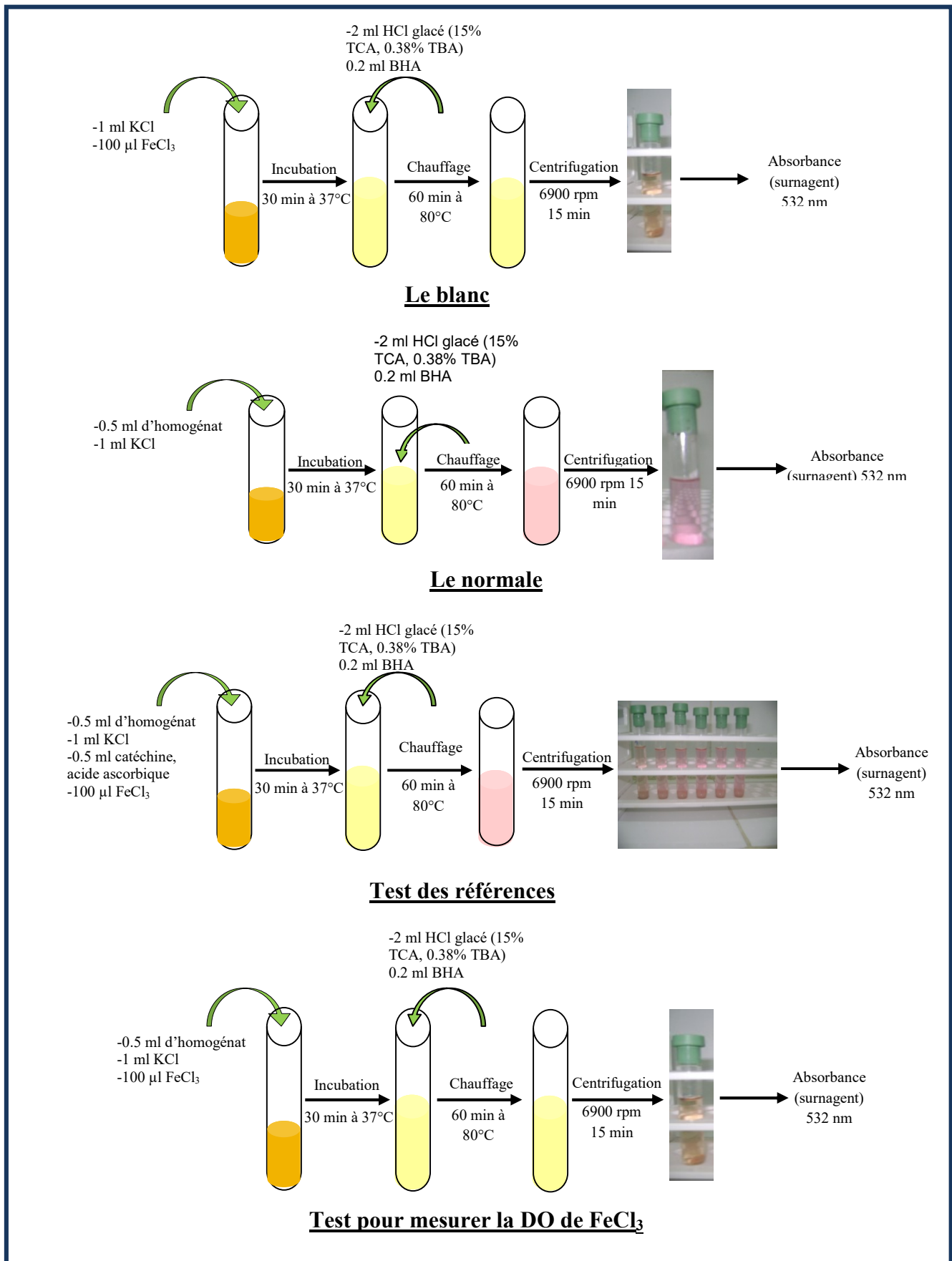


Figure 38 : Test d'activité antiperoxydation lipidique

Le pourcentage d'effet antiperoxydation lipidique (APL%) est calculé par la formule suivante :

$$APL\% = (DO_{FeCl3} - DO_{\text{extrait}}) \times 100 / DO_{FeCl3} - DO_{\text{normal}}$$

L'IC50 est la valeur qui correspond à 50% d'antiperoxydation lipidique, et elle a été obtenue à partir d'une analyse de régression linéaire.

7. Evaluation de l'activité antibactérienne

Dans cette étude, nous avons testé les extraits de différentes espèces végétales contre des souches bactériennes pathogènes qui sont actuellement impliquées dans les infections nosocomiales et dont certaines ont acquis une résistance aux antibiotiques.

Dans un premier temps, nous avons testé l'action de ces extraits par une méthode rapide (la méthode de diffusion sur disque). Les produits qui se sont révélés actifs (résultat révélé par l'apparition d'une zone d'inhibition), ont été évalués pour leur activité par la méthode de microdilution afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB).

7.1. Préparation des solutions d'extraits

Les différentes fractions de flavonoïdes sont évaporées à sec et dessous dans le DMSO. Les extraits sont stérilisés par filtration à travers un papier filtre de 0.45 µm de diamètre (Joffin & Leyral, 2001). Un test préliminaire est réalisé pour déterminer l'effet de DMSO à des pourcentages différents sur la croissance microbienne.

7.2. Souches utilisées

Des souches cliniquement isolées ont été testées : *Vibrio cholerae* (selles), *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus pneumoniae* et *Klebsiella pneumoniae* (crachats). Ainsi que des souches de référence fournies par le Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire (BGMSS) à l'université de Mascara et le Laboratoire des Substances Naturelles à l'université de Tlemcene :

- *Staphylococcus aureus* (Gram positif) : ATCC25923
- *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négatif) : ATCC25853

- *Escherichia coli* (Gram négatif) : ATCC25922
- *Bacillus cereus* (Gram positif) : ATCC10876
- *Salmonella typhimurium* (Gram négatif) : ATCC13311
- *Listeria monocytogenes* (Gram négatif) : ATCC15313
- *Citrobacter freundii* (Gram négatif): ATCC8090

7.3. Revivification et contrôle de pureté des souches

Les souches bactériennes conservées dans de la gélose nutritive inclinée à 4 °C, sont revivifiées dans du bouillon nutritif à 37°±1 °C pendant 24 h, puis ensemencées en strie sur boîte contenant de la gélose au cetrimide pour les *Pseudomonas aeruginosa*, la gélose Hektoen pour les *Enterobacteriaceae* et *Acinetobacter baumannii*, la gélose Chapman pour *Staphylococcus aureus*, la gélose Colombia au sang frais pour les *Streptococcus pneumoniae*, la gélose Oxford pour les *Listeria monocytogenes*, la gélose thiosulfate-citrate-sels biliaires-saccharose (TCBS) pour les *Vibrio cholerae* et la gélose Mossel pour *Bacillus cereus*. Après incubation à 37±1 °C pendant 24 h, on procède à une coloration de Gram afin de vérifier leur pureté.

7.4. Préparation des inoculums

La méthode de préparation des inoculums est celle décrite par Atwal (2003) qui consiste à préparer, à partir d'une culture de 18-24 h de la bactérie étudiée sur le milieu gélosé, une suspension en solution saline (0.85 % NaCl) équivalente au standard MacFARLAND 0.5 (10⁸ UFC / ml). Cette suspension peut être obtenue par la mesure de la densité optique (DO) égale à 0.1 lue à 625 nm.

L'inoculum ainsi préparé est ensuite dilué au 1/100^{ème} dans de l'eau physiologique stérile pour obtenir une concentration finale de 10⁶ UFC / ml.

7.5. Milieu de culture

Les tests ont été réalisés sur milieu gélosé et liquide de Muller-Hinton qui est considéré comme le milieu de référence pour les tests antibactériens selon les recommandations internationales (NCCLS, 2002) du fait qu'il contient tous les éléments requis pour une bonne croissance des bactéries.

7.6. Contrôle de qualité des souches : Antibiogramme

Pour assurer la validité des résultats obtenus, un contrôle de qualité a été effectué par la réalisation d'un antibiogramme vis-à-vis des antibiotiques (tableau 05). Les résultats sont interprétés par mesure du diamètre en mm de la zone d'inhibition autour du disque (Joffin & Leyral, 2001).

L'étude de l'antibiogramme a été effectuée selon la méthode classique de diffusion de l'antibiotique sur gélose conçue par Chabert en 1973.

Pour la préparation des inoculums, on a utilisé la même méthode citée ultérieurement. Les boîtes de Pétri sont coulées etensemencées, ensuite, à l'aide d'une pince stérile, nous avons placé sur la gélose (MH) séchée les différents disques d'antibiotiques choisis, puis les boîtes sont laissées séchées durant 30 minutes à la température ambiante pour avoir une bonne diffusion de l'antibiotique. Elles sont ensuite mises à l'étuve à 37 ± 1 °C pendant 18 à 24 h.

Tableau 03: Antibiotiques choisis pour l'antibiogramme

Antibiotique	Signe	Charge
Érythromycine	E	15 UI
Gentamycine	GM	10 UI
Tétracycline	TE	30 µg
Spiromycine	SP	100 µg
Amoxicilline	AMX	25 µg
Ampicilline	AM	10 µg

7.7. Préparation des disques

Les disques de papier poreux utilisés dans les différents tests de sensibilité ont été préparés comme décrit par Okigbo et *al.* (2009). Des disques de 5 mm de diamètre préparés à partir de papier Wathman No. 1 ont été bouillis pendant 1 heure dans de l'eau distillée pour

libérer les résidus contenus dans le papier. Les disques ont été séchés et autoclavés pendant 20 minutes à 120°C et sont devenus utilisables.

7.8. Tests microbiologiques

7.8.1. La méthode de diffusion des disques sur gélose

Le principe de cette méthode, largement utilisée en microbiologie, est basé sur la diffusion du composé antimicrobien dans un milieu solide, dans une boîte de Pétri, à partir d'un point précis, avec la création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le micro-organisme.

L'effet du produit antimicrobien sur la cible est évalué par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition, la souche de micro-organisme sera classée comme sensible, intermédiaire ou résistante.

Des disques stériles préalablement préparés sont imprégnés de 20 µl d'extraits à une concentration de 100 mg/ml. Le milieu de culture Muller Hinton (MH) est versé dans des boîtes de Pétri stériles. On le laisse se solidifier pendant 15 minutes, sur lequel on place 1 ml d'inoculum préalablement préparé et on l'ensemence avec un râteau. Ensuite, à l'aide d'une pince stérile, les disques chargés d'extraits sont transférés dans la boîte inoculée. Les disques sont espacés de 24 mm au centre (figure 39).

Après incubation à $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 24 h, les résultats sont lus en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition en mm, incluant le disque (Lino & Deogracious, 2006).

L'activité antimicrobienne est considérée comme positive à partir d'un diamètre supérieur à 6 mm selon le comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (Rios *et al.*, 1988).

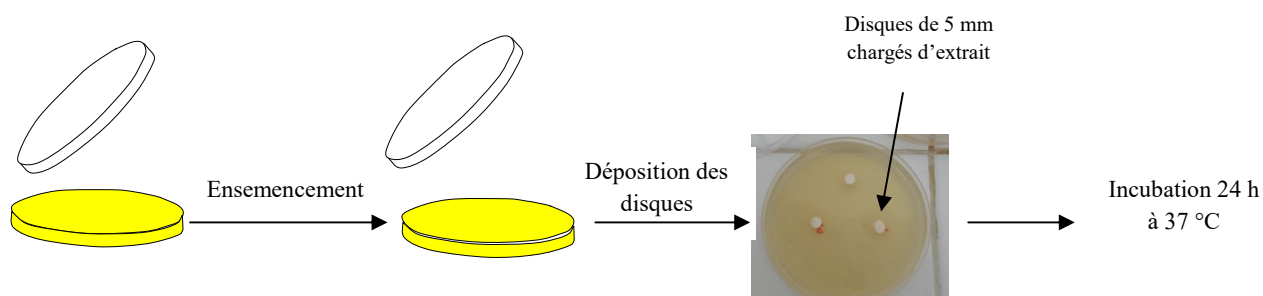


Figure 39 : Méthode de diffusion sur disque

7.8.2. Détermination de la CMI et la CMB par la méthode de microdilution

Ce test est réalisé à l'aide de microplaques stériles à 96 puits selon le protocole décrit par Akomo *et al.* (2009) et Radojevic *et al.* (2012) pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB). Dans chaque puit, on a porté 50 μl de bouillon Muller Hinton, puis 50 μl de l'extrait (100 mg/ml) est ajouté en premier puit, puis une série de dilutions binaire est réalisée (1/2), ensuite 50 μl de la suspension bactérienne de 18 heures (10^6 UFC/ml) sont ajoutés à chaque puits. En parallèle, des tests témoins ont été réalisés. Les plaques sont agitées et incubées à 37°C pendant 24 heures. A l'aide d'un spectrophotomètre et à une longueur d'onde de 620 nm, l'absorbance est lue et la concentration la plus faible ne présentant aucune culture (pas de trouble) est considérée comme la CMI et est exprimée en $\mu\text{g/ml}$ (figure 40).

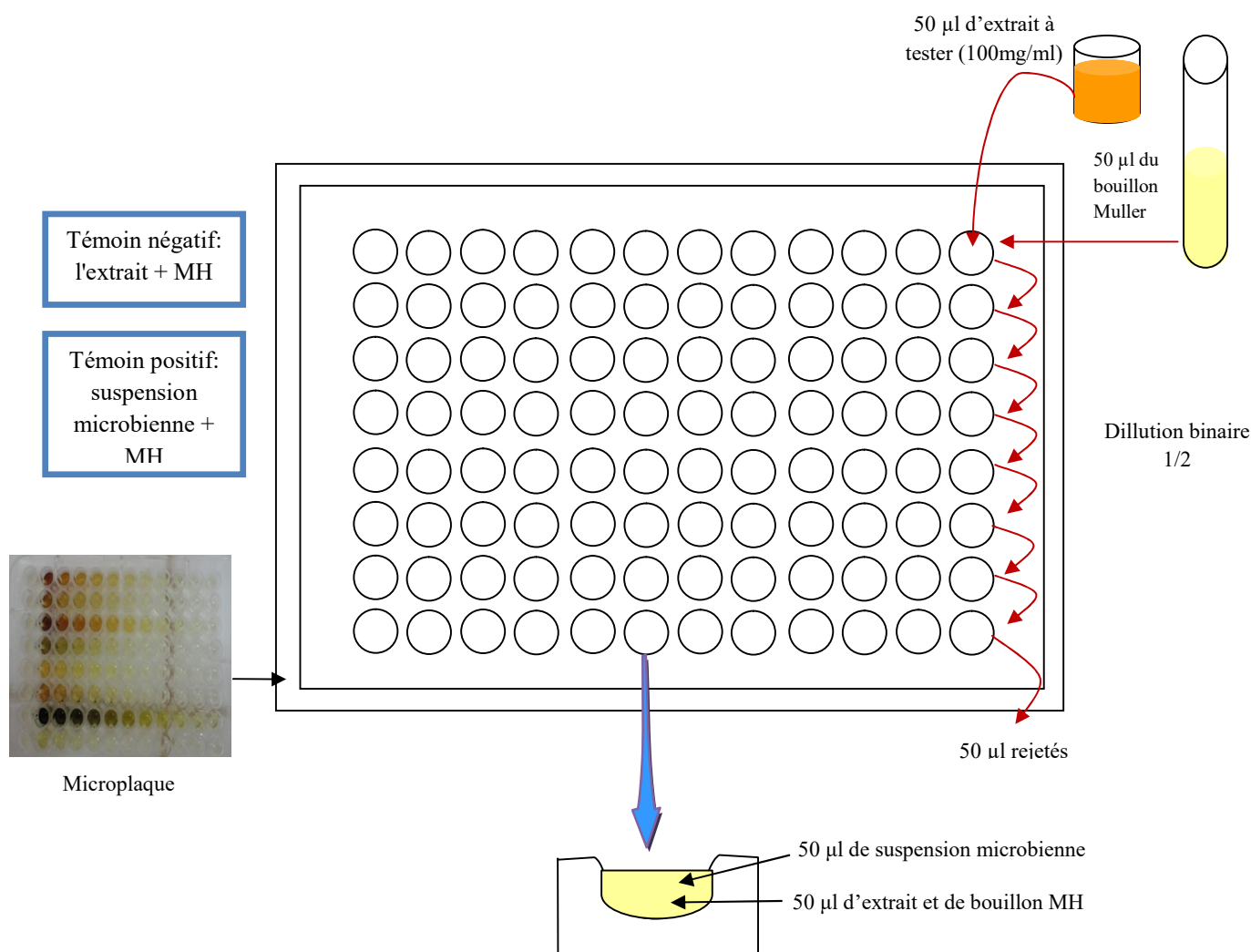


Figure 40: Détermination de la CMI par la méthode de microdilution

La CMB est définie comme la concentration la plus faible qui tue 99,99% de la charge initiale d'inoculum, pour la détermination de la CMB, 100 μ L de chaque puits qui n'a montré aucun changement dans la culture à l'oeil nu sont inoculés sur une gélose nutritive et incubés à 37°C pendant 48 heures et la concentration la plus faible qui ne montre aucune croissance après incubation est considérée comme la CMB.

8. Analyse statistique

Les expériences ont été effectuées en triplicata et les résultats ont été exprimés en moyenne \pm SEM (erreur standard de la moyenne) ($n = 3$). Les résultats des différents tests sont analysés par ANOVA. Les valeurs de p inférieure à 0.05 ($p < 0.05$) sont considérées statistiquement significatifs.

Chapitre 03 :

Résultats et discussion

1. Analyse phytochimie

Les trois plantes étudiées sont soumises à une analyse phytochimique qui permet de déterminer qualitativement et quantitativement les biomolécules qui confèrent la saveur, la couleur et d'autres caractéristiques telles que les activités biologiques.

1.1. Analyse phytochimique qualitative

Les méthodes d'identification consistent en une précipitation ou une coloration par des réactifs spécifiques. L'analyse a révélé que l'amidon, les anthracénosides, les émодols et les caroténoïdes sont des classes de familles chimiques totalement absentes dans les trois espèces (tableaux 04, 05, 06).

Il ressort de cette analyse que les alcaloïdes sels et bases, les polyterpènes, les flavones aglycones, les huiles volatils, les acides gras, les tanins catéchiques, les glycosides cardiaques, les flavonoïdes, les composés réducteurs, les hétérosides stéroliques et terpéniques, les acides aminés et les saponosides sont des classes de familles chimiques présentes dans toutes les espèces étudiées.

Les polyuronides sont présents uniquement chez la lavande, tandis que les coumarines, les anthocyanes et les tanins galliques sont caractérisés seulement chez la petite ivette et la lavande. En revanche, les stérols sont présents chez la lavande et la petite ivette et absents chez le capillaire.

Plusieurs auteurs signalent la présence qualitative de ces métabolites dans les trois plantes (El Hilaly et *al.*, 2004 ; Ben Jannet et *al.*, 2000 ; Ez zoubi et *al.*, 2021 ; Ez zoubi et *al.*, 2016 ; Kashkooe et *al.*, 2021).

Tableau 04 : Analyses phytochimiques qualitatives des extraits chloroformiques

	Principes actifs	Réactions d'identification	<i>A. iva</i>	<i>A. capilus-veneris</i>	<i>L. stoechas</i>
1	Alcaloïdes bases	Réactif de Mayer/ Hadjer/Wagner	(+)	(+)	(+)
2	Stérols	Réaction de Liebermann-	(+)	(-)	(+)
3	polyterpènes	Burchard	(+)	(+)	(+)
4	Caroténoïdes	Réaction de Carr Price	(-)	(-)	(-)
5	Coumarines	Fluorescence UV	(+)	(-)	(-)
6	Flavones aglyones	Réaction à la cyanidine	(+)	(+)	(+)
7	Emodols	Réaction de Bortrager	(-)	(-)	(-)
8	Huiles volatils	Hydrodistillation	(+)	(+)	(+)
9	Acides gras	Test de spot	(+)	(+)	(+)

(+) : présence (-) :

Tableau 05 : Analyses phytochimiques qualitatives des extraits méthanoliques

	Principes actifs	Réactions d'identification	<i>A. iva</i>	<i>A. capilus-veneris</i>	<i>L. stoechas</i>
1	Alcaloïdes sels	Réactif de Mayer/ Hadjer/Wagner	(+)	(+)	(+)
2	Tannins cathéchiques	Réaction au chlorure ferrique	(+)	(+)	(+)
	Tannins galliques	Réaction de Stiasny	(+)	(-)	(-)
3	Glycosides cardiaques	Réaction de Keller-Killani	(+)	(+)	(+)
4	Flavonoides	Réaction à la soude / Réaction à la cyanidine	(+)	(+)	(+)
5	Composés réducteurs	Test de Fehling	(+)	(+)	(+)
6	Anthracénosides	Réaction de Bortrager	(-)	(-)	(-)
7	Anthocyanes	Solution rouge en milieu acide avec changement de couleur	(+)	(-)	(-)
8	Acides aminés	Réaction à la Ninhydrine	(+)	(+)	(+)
9	Hétérosides stéroliques et terpéniques	Réaction de Liebermann-Burchard	(+)	(+)	(+)

(+) : présence (-) :

Tableau 06 : Analyses phytochimiques qualitatives des extraits aqueux

	Principes actifs	Réactions d'identification	<i>A. iva</i>	<i>A. capillus-veneris</i>	<i>L. stoechas</i>
1	Saponosides	Apparition d'une mousse persistante	(+)	(+)	(+)
3	Polyuronides	Coloration avec l'éthanol	(-)	(-)	(+)
4	Amidon	Coloration bleu violacée avec le réactif d'amidon	(-)	(-)	(-)

(+) : présence (-) :

1.2. Analyse phytochimique quantitative

L'analyse chimique est la méthode la plus simple pour apprécier la qualité de la valeur des plantes médicinales. Cette analyse fournit une première évaluation du potentiel nutritif et pharmaceutique des plantes.

1.2.1. Métabolites primaires

L'analyse du potentiel nutritif divise en plusieurs fractions décrites dans la figure 41 : la matière sèche, la matière organique, les cendres, les protéines, les sucres et les lipides. La comparaison des moyennes effectuées par l'Anova à deux facteurs révèle une différence hautement significative entre les trois espèces au niveau de la production des métabolites primaires ($P < 0,05$) et une différence très hautement significative entre les métabolites les unes par rapport aux autres ($P < 0,05$).

La figure 41 montre que *A. iva* et *L. stoechas* présentent une teneur élevée en matière sèche (MS) : 79.11 ± 0.66 % et 89.61 ± 0.42 % respectivement. Par contre *A. capillus-veneris* renferme plus d'eau, sa MS étant de 56.21 ± 1.01 %. Les faibles taux d'humidité sont dus à l'origine aride des plantes. *A. capillus-veneris* est riche en eau car c'est une plante dotée d'un système racinaire profond. La teneur en eau et en matière sèche des plantes dépend de plusieurs facteurs, tels que la nature des fibres, l'âge des plantes, l'état du sol et la durée de stockage de la plante après la récolte.

Les trois plantes renferment un taux relativement élevé de matière organique (MO) (figure 41). La teneur la plus élevée est observée pour *A. capilus-veneris* avec 77.44 ± 1.32 %. *A. iva* et *L. stoechas* présentent des valeurs proches : 89.11 ± 0.65 % et 89.57 ± 0.97 %, respectivement.

Le taux de matière minérale (MM) contenu dans chaque plante est variable (figure 41). *A. capilus-veneris* renferme la plus forte teneur avec 22.86 ± 0.51 % suivie d'*A. iva* et *L. stoechas* qui présentent des teneurs moyennes : 10.86 ± 0.12 % et 10.05 ± 1.29 %, respectivement.

Les protéines, les sucres et les lipides sont des indices de la valeur nutritionnelle des aliments. Les résultats révèlent que nos plantes présentent un bon potentiel nutritif où le taux des protéines le plus élevé est observé chez *A. iva* avec 11.77 ± 0.54 % suivie par *A. capilus-veneris* et *L. stoechas* avec 19.01 ± 0.98 % et 7.78 ± 0.23 % respectivement. Le dosage des lipides et des sucres montre qu'*A. iva* présente les teneurs les plus faibles (3.22 ± 0.87 %, 8.71 ± 1.07 %). Ces faibles valeurs indiquent que cette plante est utilisée comme un agent d'anti obésité (Bouyahya et al., 2020). Les teneurs en sucres et lipides pour *A. capilus-veneris* et *L. stoechas* sont très proches comme représenté dans la figure 41.

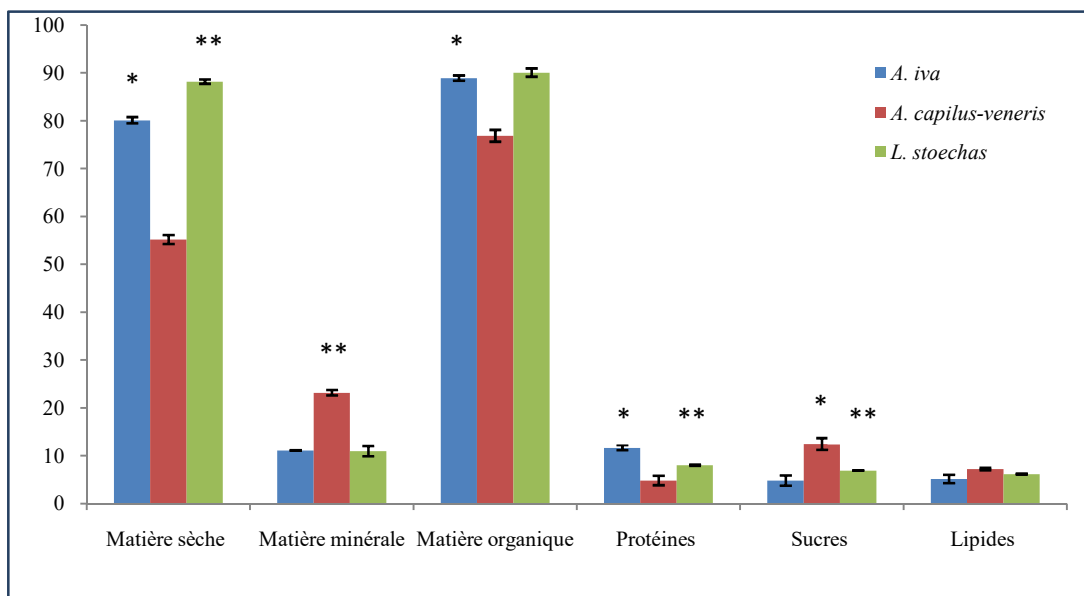


Figure 41 : Teneur en métabolites primaires par rapport à la matière sèche (%)
Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n = 3), * p<0.05, ** p<0.01,

Le graphe des moyennes des métabolites primaires révèle les conclusions suivantes (figure 42) :

- *Ajuga iva* a la plus grande valeur en protéines et les plus faibles valeurs en lipides et sucres.
- *Adiantum capillus-veneris* enregistre les valeurs les plus importantes en matière minérale, sucres et lipides par rapport aux deux autres espèces, par contre la même espèce présente une valeur très basse en matière sèche.
- *Lavandula stoechas* présente des valeurs fortes en matière sèche et en matière organique mais présente une valeur très basse en protéines

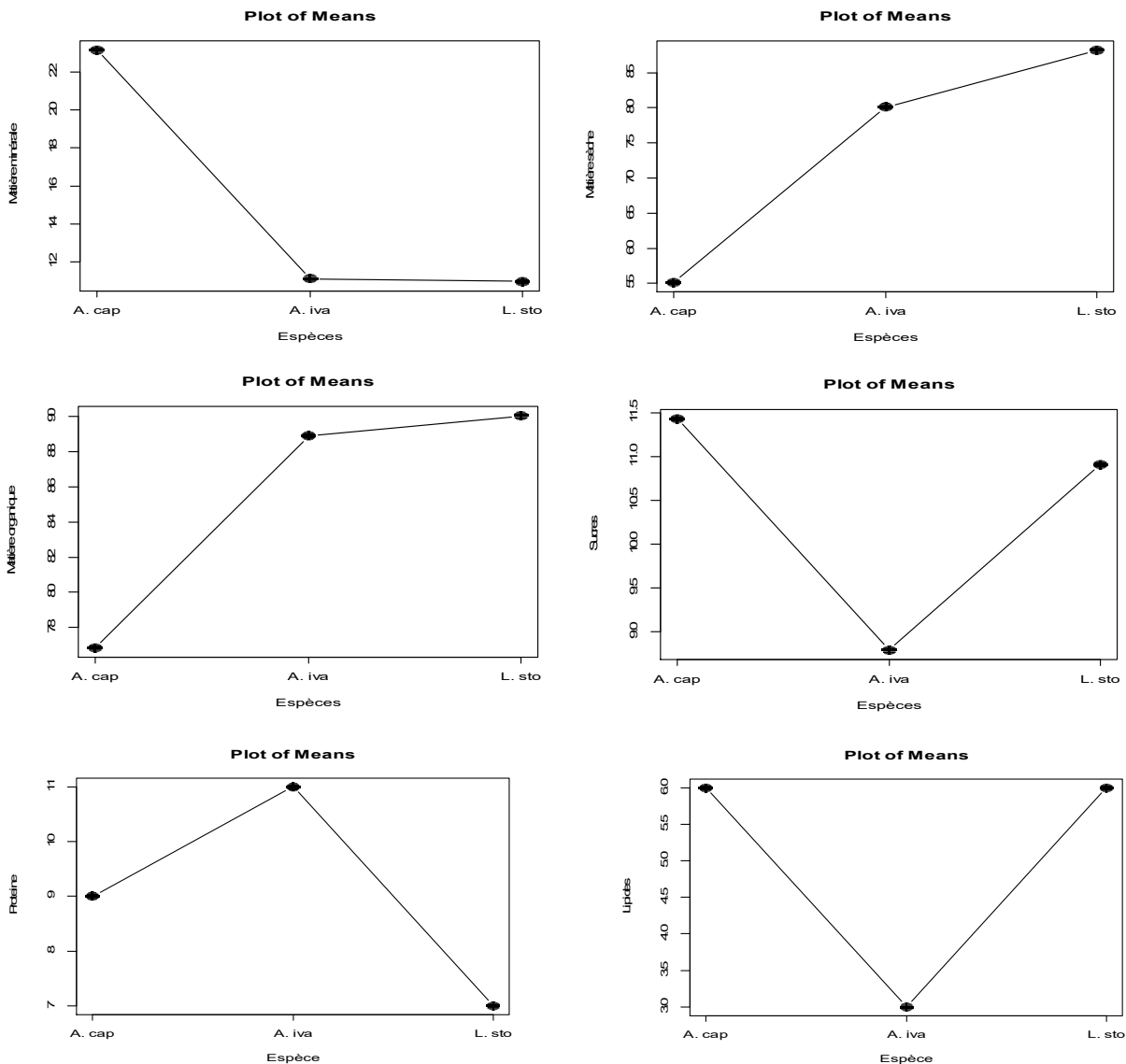


Figure 42 : Répartition des valeurs moyennes des métabolites primaires

Le taux des métabolites primaires peut subir des variations pourraient s'expliquer par les différents stades végétatifs des plantes, par la saison de récolte et surtout par la sécheresse qui caractérise les régions dans lesquelles poussent ces plantes. D'autres facteurs tels que le type de sol, le climat, et le stade de maturité contribuent à faire varier fortement la concentration des éléments minéraux dans les plantes (Lbekwe & Orok, 2010).

En plus de l'utilisation des plantes dans les domaines médicinales, les résultats de dosage des métabolites primaires révèle une bonne valeur nutritionnelle des trois plantes.

1.2.2. Métabolites secondaires

La figure 43 présente le taux des métabolites secondaires. L'analyse de variance révèle l'existence d'une différence très hautement significative ($P < 0,05$) entre les trois espèces, dans la production des métabolites secondaires.

Le taux élevé des flavonoïdes dans les trois plantes (*A. iva* : 69.8 ± 2.17 mg/100 g, *A. capilus-veneris* : 76.98 ± 2.09 mg/100 g, *L. stoechas* : 59.77 ± 1.31 mg/100g) révèle que ces plantes ont des vertus thérapeutiques sur les maladies cardiovasculaires et le stress oxydatif. Les flavonoïdes en combinaison avec les vitamines et les enzymes peuvent aider l'organisme à une meilleure défense contre les maladies liées au stress oxydant (Palozza, 1998). L'oxydation des lipoprotéines à basse densité (LDL) joue un rôle important dans l'athérosclérose, les cellules immunitaires (les macrophages) s'accumulent l'une sur l'autre contribuant à la formation d'une plaque provoquant ainsi une sténose des artères. Plusieurs études confirment que les flavonoïdes ont la capacité de prévenir l'oxydation des LDL (Donald & Cristobal, 2006).

La teneur élevée des alcaloïdes dans *A. iva* et *L. stoechas* (50.56 ± 1.08 mg/100g, 37.84 ± 2.41 mg/100g) (figure 43) permettent d'expliquer des utilisations thérapeutiques traditionnelles signalées par plusieurs auteurs, comme Nacoulma (1996) qui indique que les plantes contenant des valeurs importantes en alcaloïdes sont utilisées contre les maux de ventre du fait des alcaloïdes tropaniques, réputés contre les spasmes gastro-intestinaux. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques exercent un effet ocytocique et donc sont utiles pour faciliter les accouchements. En plus, grâce aux alcaloïdes, ces deux plantes contribuent au traitement des ulcères gastriques (plaies d'estomac), en réduisant la douleur et l'acidité (Bouquet & Debray, 1974).

La teneur élevée en saponosides dans *L. stoechas* (31.26 ± 1.34 mg/100g) (figure 43) confère à cette plante une activité anti-asthmatique (Koffi et al., 2009).

Les faibles teneurs en tanins dans *A. capilus-veneris* (1.08 ± 1.12 mg/100g) et *L. stoechas* (1.05 ± 0.56 mg/100g) (figure 42), indiquent la non toxicité des deux plantes puisque la dose létale est de 5 % (Adebayo et al., 2000). La teneur en tanins dans *A. iva* (13.51 ± 0.34 mg/100g) (figure 43) lui confère une activité hémostatique (Bruneton, 1999).

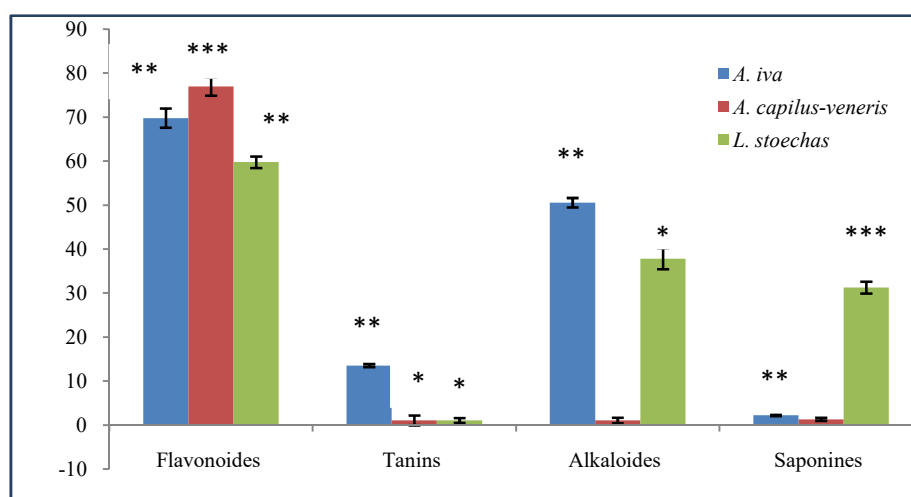


Figure 43 : Teneur en métabolites secondaires par rapport à la matière sèche (mg/100g).

Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n = 3), * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

Les huiles essentielles ont été extraites de matériel végétale frais, le rendement en huile essentielle varie beaucoup selon la plante utilisée, le matériel employé pour l'extraction et la méthode choisie d'extraction.

Le rendement est largement variable, lisiblement montré dans la figure 44 où la *L. stoechas* présente le rendement le plus élevé (2.82 ± 0.84 %). La même espèce récoltée dans la région de Telemcen présente un rendement inférieur à 1% (Mohammedi, 2006). *L. stoechas* provenant de la région Ouchba et Zarifet (Telemcen) a comme teneurs en huiles essentielles : 0.94 % et 0.70 % respectivement (Sidi Boulouar & Ziane, 2003), ce qui confirme que la région d'origine influence beaucoup la sécrétion en huile essentielle d'une plante aromatique. *A. iva* présente un rendement de 0.23 ± 0.52 %. En revanche *A. capilus-veneris* présente le rendement le plus faible avec 0.11 ± 0.45 %.

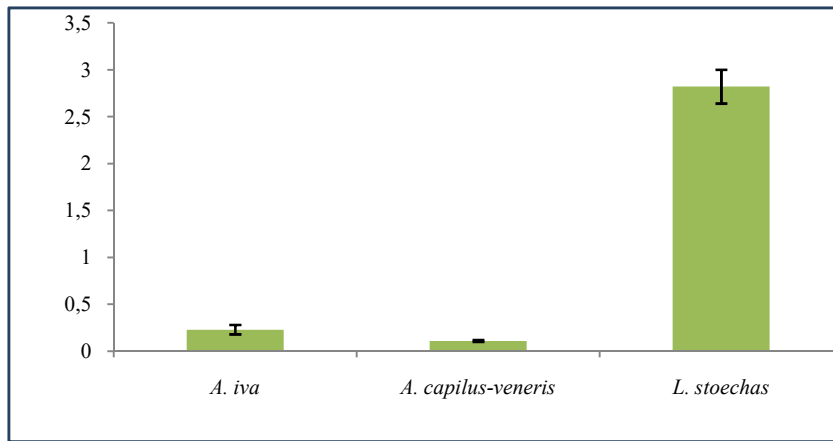


Figure 44 : Rendements en huiles essentielles des trois plantes (%)

Le graphe des moyennes des métabolites secondaires révèle les conclusions suivantes (figure 45) :

- *Ajuga iva* enregistre les valeurs les plus importantes en alcaloïdes et tanins.
- *Adiantum capillus-veneris* a la plus grande valeur en flavonoïdes et la plus faible valeur en alcaloïdes.
- *Lavandula stoechas* présente des valeurs fortes en huiles essentielles et saponines.
- Les trois espèces présentent des valeurs importantes en flavonoïdes par contre les taux des tanins sont moins importants.

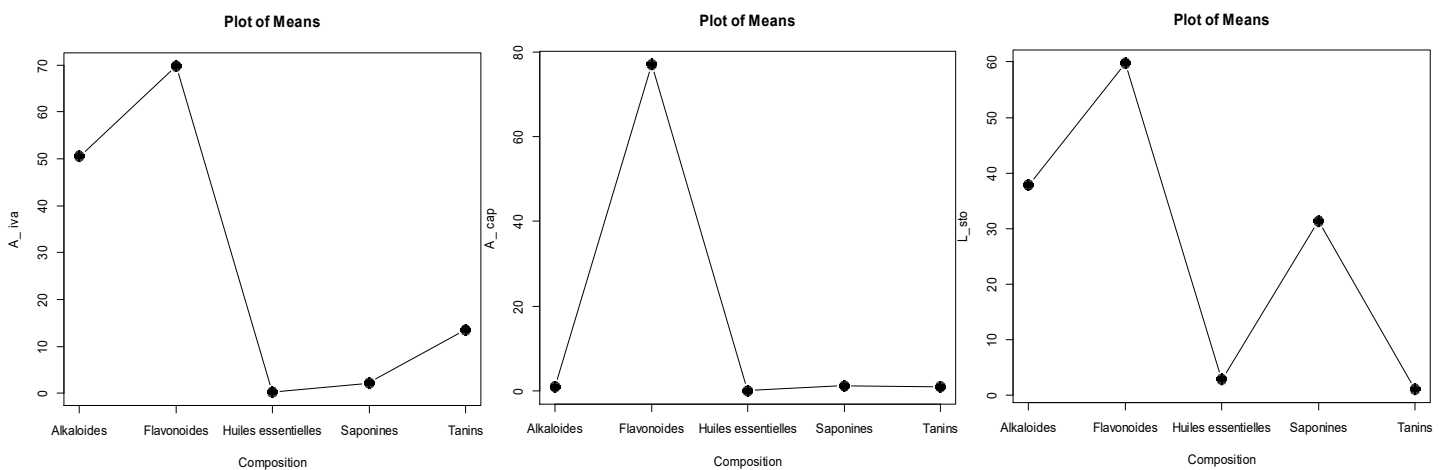


Figure 45 : Répartition des valeurs moyennes des métabolites secondaire

Les teneurs en métabolites secondaires peuvent être, en partie, attribuées aux conditions climatiques et surtout aux variations saisonnières de température qui déterminent la composition chimique de la plante. Le stade végétatif au moment de la récolte semble aussi influencer la teneur en huile essentielle (Reyes-Jurado et *al.*, 2015).

2. Extraction des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes a été effectuée par les solvants organiques à partir d'une poudre végétale. Cette extraction a permis d'obtenir quatre extraits. Selon Markham et *al.* (1995) les composés que pourraient contenir les différents extraits préparés seraient comme suit: l'extrait brut hydro méthanolique peut contenir des flavonoïdes, des aminoacides, des terpènes et des tannins, l'extrait d'éther diéthylique qui est en générale constitué de lipides et de cires est éliminé, l'extrait d'acétate d'éthyle contient les flavonoïdes glycosylés en particulier mono, di et tri-glycosylés, l'extrait butanolique est plus riche en flavonoïdes aglycones et l'extrait aqueux peut être constitué des flavonoïdes les plus polaires.

Le calcul des rendements par rapport au poids sec de la poudre végétale (figure 46) et le graphe des moyennes (figure 47) ont montré que l'EBr représente le rendement le plus élevé pour les trois plantes (*L. stoechas* : 5.41 ± 0.43 %, *A. capilus veneris* : 3.63 ± 0.062 %, *A. iva* : 3.37 ± 0.53 %), ensuite l'extrait aqueux (*L. stoechas* : 3.31 ± 0.26 %, *A. capilus veneris* : 2.61 ± 0.07 %, *A. iva* : 1.01 ± 0.05 %), suivie par l'extrait butanolique (*L. stoechas* : 1.85 ± 0.08 %, *A. iva* : 1.6 ± 0.22 %, *A. capilus veneris* : 0.71 ± 0.3 %) et en dernier lieu l'extrait à acétate d'éthyle. Selon la figure ci-dessous (figure 45), les trois plantes ont donné des masses en extraits sec d'acétate d'éthyle inférieures à 1g/100g. La lavande a donné un taux moyen de 0.36 ± 0.037 %, par contre le capillaire est la plante qui possède le rendement le plus faible au alentour (figure 47) de 0.2 ± 0.014 %. La petite ivette présente le rendement le plus élevé avec 0.51 ± 0.082 %.

La comparaison des moyennes effectuées par l'Anova à deux facteurs révèle une différence nettement significative entre les trois espèces du point de vue rendement en extrait sec et une différence significative entre les fractions les unes par rapport aux autres, cela correspond à une probabilité d'erreur inférieure à 5 %.

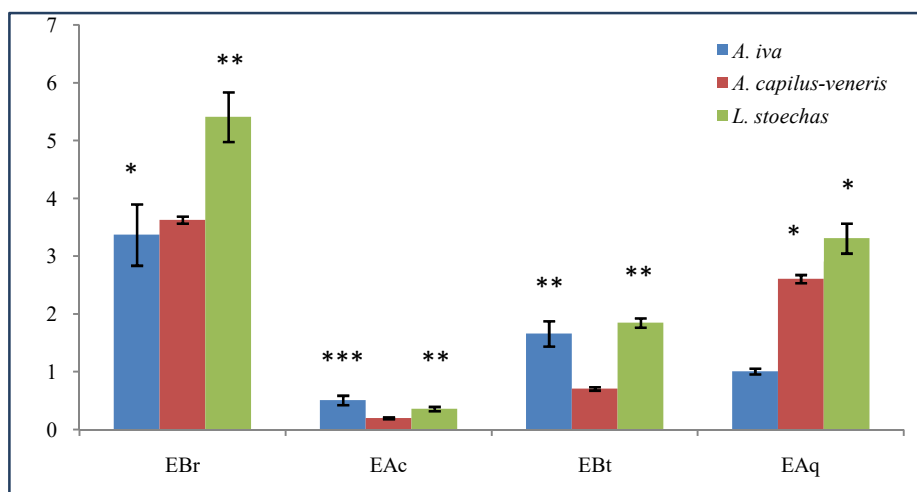


Figure 46 : Rendements en extrait sec des fractions des flavonoïdes (%)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

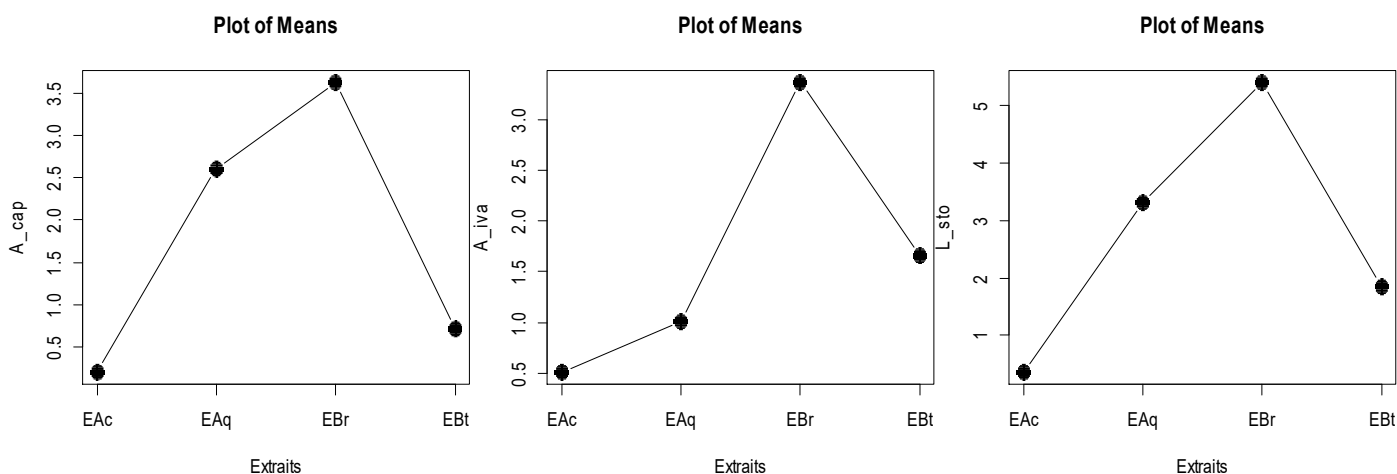


Figure 47 : Répartition des valeurs moyennes des extraits secs

Un des paramètres principaux influençant l'efficacité de l'extraction est la polarité du solvant, ainsi que la composition de la matière végétale. Il a été prouvé que souvent l'efficacité de l'extraction du matériel végétal augmente avec l'augmentation de la polarité du solvant (Rafińska et al., 2019). Comme la montre la figure 44, les solvants polaires (hydro-méthanolique et n-butanol) ont donné le meilleur rendement d'extraction comparativement aux solvants de faible polarité ou non polaires (acétate d'éthyle et eau). Ce résultat a déjà été rapporté par Krimat et al. (2015).

Car la macération est une méthode discontinue, le dissolvant devrait être remplacé jusqu'à ce que la matière végétale soit épuisée, il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie, le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. La méthode d'extraction affecte également tout le contenu total en phénols et flavonoïdes et les capacités antioxydantes et antimicrobiennes (Dhanani et al., 2017).

3. Teneur en phénols totaux et flavonoïdes des extraits secs

Ajuga iva

Les résultats des taux de polyphénol, tels que présentés dans la figure 48, ont montré que les valeurs les plus élevées de polyphénol ont été enregistrées dans les fractions acétate d'éthyle (149.74 ± 3.94 mg GAE/g E) et butanolique (50.09 ± 1.27 mg GAE/g E), tandis que les fractions hydrométhanolique (9.57 ± 0.33 mg GAE/g E) et aqueuse (3.5 ± 1.27 mg GAE/g E) ont présenté les valeurs les plus faibles. Cet ordre des fractions a été confirmé par les résultats de Adjadj (2009) qui a trouvé que la fraction acétate d'éthyle est la plus riche en polyphénols et la fraction aqueuse est la plus pauvre. Les teneurs obtenues dans notre étude ne sont pas en conformité avec les rapports précédents qui ont prouvé que le méthanol et l'eau sont les solvants les plus efficaces pour l'extraction des polyphénols (Makni et al., 2013). Il convient toutefois de mentionner que les résultats de la présente étude sont clairement supérieurs à ceux relevés par Krimat et al. en 2014 (3.96 mg GAE/g E) qui ont appliqué un différent procédé extractif pour l'*Ajuga iva* Algérienne.

Les extraits de butanol (40.14 ± 0.33 mg EC/g E) et d'acétate d'éthyle (33.60 ± 2.98 mg EC/g E) contenaient des concentrations importantes en flavonoïdes, contrairement aux fractions hydrométhanolique (5.1 ± 0.27 mg EC/g E) et aqueuse (1.23 ± 0.02 mg EC/g E) (figure 49) qui en contenaient de faibles quantités. Salem et al. (2016) ont déterminé la concentration des flavonoïdes dans trois extraits méthanolique, acétonique et chloroformiques, cette teneur a été estimée à 32.6 ± 0.86 mg EQ/g E, 2.3 ± 0.08 mg EQ/g E, 2 ± 0.09 mg EQ/g E dans les trois extraits respectivement, Ce résultat est relativement très faible.

Adiantum capillus-veneris

Les résultats expérimentaux ont indiqué que le taux de polyphénol contenu dans les extraits d'*Adiantum capillus-veneris* était maximum dans l'EAc (101.85 ± 2.84 mg GAE/g E), suivie par l'EBt (81.90 ± 0.42 mg GAE/g E), l'EBr (23.44 ± 0.14 mg GAE/g E) et l'EAq (10.24 ± 0.69 mg GAE/g E) (figure 48). Les résultats obtenus par Yuan *et al.* (2012) suggèrent la même distribution générale des composés phénoliques entre les différentes fractions mais avec des quantités plus élevées et c'était comme suit : 421.1 ± 0.02 mg GAE/g E pour l'EAc, 334.7 ± 0.07 mg GAE/g E pour l'EBt, 175.4 ± 0.03 mg GAE/g E pour l'EBr et 113.9 ± 0.04 mg GAE/g E pour la fraction aqueuse résiduelle. Le taux de polyphénols augmente avec la polarité du solvant jusqu'à ce qu'il atteigne le maximum dans la fraction acétate d'éthyle, puis il diminue progressivement. Yazdani & Jookar (2021) ont rapporté que le contenu phénolique total de l'extrait méthanolique d'*A. capillus-veneris* L. était de 83.62 ± 1.87 mg GAE/g E ce qui est très élevé par rapport à nos valeurs.

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits d'*Adiantum capillus-veneris* est présentée dans la figure 49. Les résultats expérimentaux ont montré que la teneur totale maximale en flavonoïdes a été obtenue dans l'EBt et l'EAc (34.43 ± 0.42 mg EC/g E, 31.60 ± 1.48 mg EC/g E respectivement) et la teneur minimale a été obtenue dans l'EBr et l'EAq (4.66 ± 0.097 mg EC/g E, 0.18 ± 0.002 mg EC/g E respectivement). Ces résultats étaient similaires au rapport précédent de Yuan *et al.* (2012), selon lequel le contenu flavonique de différentes fractions d'*A. capillus-veneris* originaire de la Chine, a révélé de manière surprenante que la fraction d'acétate d'éthyle et la fraction butanolique présentaient la teneur la plus élevée, et les extraits hydrométhanolique et aqueux présentaient la teneur la plus faible. Les travaux réalisés par Ako *et al.* (2018) sur *Adiantum capillus-veneris* en provenance d'Iran ont indiqué une teneur en flavonoïdes fortement élevée (123 mg de quercétine équivalente/g E) en comparant avec nos résultats.

Lavandula stoechas

D'après les résultats présentés dans la figure 48, l'EAc est le plus riche en polyphénols suivi par l'EBt puis l'EBr et enfin l'EAq (189.16 ± 2.12 mg EAG/g E, 104.67 ± 1.98 mg EAG/g E, 43.15 ± 0.51 mg EAG/g E, 36.02 ± 0.76 mg EAG/g E). Concernant l'extrait butanolique, ses résultats sont corrélés aux résultats des études de Celep *et al.* (2018) qui ont trouvé que le contenu phénolique est de (87.27 ± 2.07 mg EAG/g E). Le contenu des

composés polyphénolique obtenu par Chograni et *al.* (2021) (84.92 ± 1.09 mg GAE/g DW) de la tunisienne *Lavandula stoechas* est nettement inférieur à nos valeurs. Encore une fois les gains publiés par El Guiche et *al.*, (2015) sur le taux de polyphénols liés à *Lavandula stoechas* récoltée du Maroc, indiquent des teneurs deux fois inférieures à la lavande Algérienne.

La détermination des taux des flavonoïdes révèle que l'EBt représente la fraction la plus riche en flavonoïdes (90.83 ± 2.01 mg EC/g E), en suivie par l'EAc (88.75 ± 1.79 mg EC/g E) suivi par l'EBr (35.06 ± 0.31 mg EC/g E) puis l'EAq (14.71 ± 0.29 mg EC/g E) (figure 49). Adjadj et ces collaborateurs (2009) ont trouvé les mêmes résultats que nous, ils ont signalé que la fraction d'EBt est la plus riche et la fraction aqueuse est la plus pauvre en flavonoïdes. La quantification des flavonoïdes présentée par Dif et *al.* (2016) met en évidence que le taux de flavonoïdes dans l'extrait hydrométhanolique des feuilles est de 19.83 ± 0.11 mg EC/g E ce qui est largement inférieure à nos valeurs.

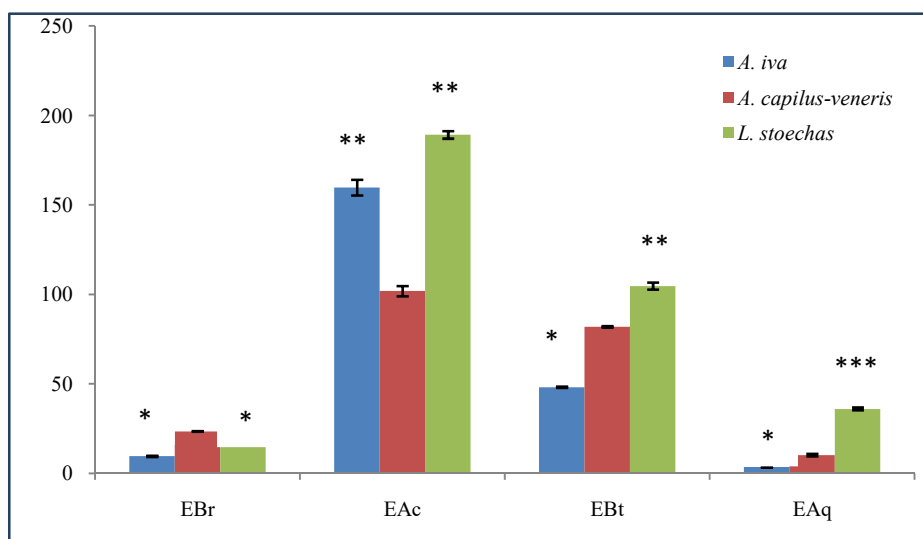


Figure 48 : Quantité moyenne des polyphénols en mg EAG/g E

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

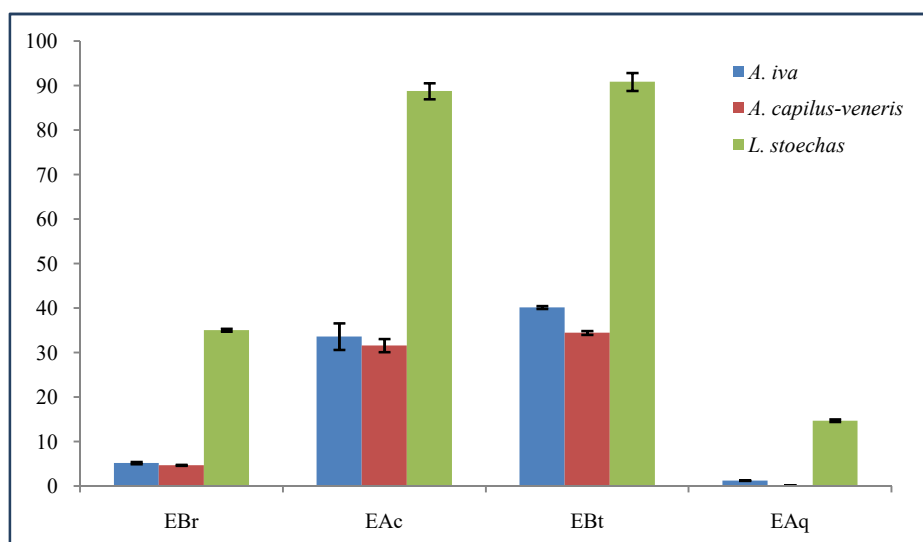


Figure 49 : Quantité moyenne des flavonoïdes en

L'analyse de variance à deux facteurs révèle une différence nettement significative entre les composants (polyphénols et flavonoïdes), les extraits (EBr, EAc, EBt, EAq) et les espèces (*A. iva*, *A. capillus-veneris*, *L. stoechas*).

Les boîtes à moustaches nous aident à voir le centre et la distribution des données (figure 50) :

- *Lavandula stoechas* présente les valeurs les plus fortes.
- Les valeurs des polyphénols sont très importantes par rapport aux flavonoïdes

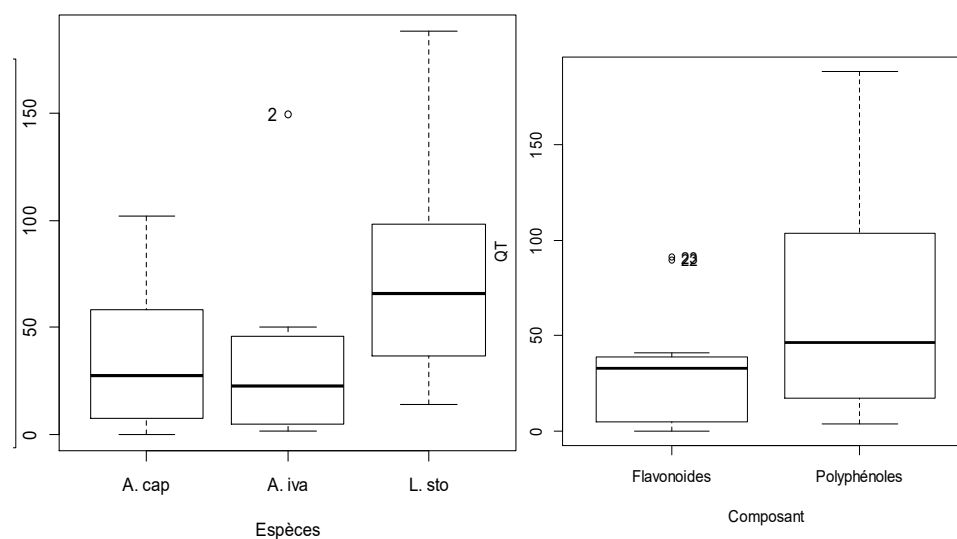


Figure 50 : Box-plot des composants et des espèces

La quantité des polyphénols totaux est en relation avec la composition chimique des plantes. En effet, le taux de polyphénols des substrats, dont dépend la dégradabilité, est susceptible d'être influencé par le mode de culture, le stade phénologique (avec le temps les plantes ont tendance à durcir par lignification et leur valeur nutritive décline), la nature du sol (les sols arides sont sablonneux, infertiles et pauvres en éléments nutritifs), le climat au moment du prélèvement (température et pluviométrie), de même que par la constitution de l'échantillon (proportion tiges-feuilles-fleurs) (Miliauskas et *al.*, 2004).

Il a été prouvé que les teneurs des polyphénols totaux sont élevées lorsque le milieu de vie de la plante n'est pas adéquat, dans ce cas la plante favorise la synthèse des métabolites secondaires afin de s'adapter et survivre (Ashraf et *al.*, 2018).

Le traitement des échantillons pour l'expérimentation (séchage, broyage et stockage) est également un facteur susceptible de faire varier les résultats (Deng et *al.*, 2018). Les écarts enregistrés peuvent être en partie attribués à des facteurs génotypiques qui régulent la biosynthèse et l'accumulation de ces métabolites secondaires dans la plante (Ashraf et *al.*, 2018).

Le contenu polyphénolique est variable d'une plante à l'autre, ce qui peut être attribué à la spécificité de la méthode chimique de quantification des composés phénoliques mais aussi à la nature de l'étalon employé (Ez zoubi et *al.*, 2021).

4. Chromatographie des fractions des flavonoïdes

4.1. Chromatographie sur couche mince

Le déroulement de la méthode de chromatographie sur couche mince dépend non seulement du choix de la phase mobile pour la séparation, mais aussi du choix de la phase stationnaire, de la technique de développement retenue, de la taille de la chambre de développement et de l'espace vapeur, qui ont un effet notable sur la séparation (Yrjönen, 2004).

La chromatographie sur couche mince a montré que les différentes fractions sont très riche en flavonoïdes (figure 51, 52, 53). Les résultats de la séparation des composés phénoliques par CCM des extraits sont présentés dans les tableaux 07, 08 et 09.

Chez *A. iva*, nous avons identifié 7 composés dans l'extrait brut, 7 composés dans la phase acétate d'éthyle, 5 composés dans l'extrait butanolique et 2 composés dans la phase résiduelle aqueuse. Ces composés sont flavonol, flavone, aurone, acide phénol et Anthocyanidine 3-glycosides. Le pool flavonique chez cette espèce est dominé par : les flavonols et les acides phénols (tableau 07) (figure 51).

Tableau 07 : Résultat de la chromatographie sur couche mince des extraits d'*Ajuga iva*

Extrait brute			Extrait d'acétate d'éthyle		
Couleur (365 nm)	RF	Type flavonoides possible Markham (1982)	Couleur (365 nm)	RF	Type flavonoides possible Markham (1982)
Vert	0,02	Flavonol, flavone, aurone	Vert	0,02	Flavonol, flavone, aurone
Bleu	0,05	Acide phénol	Bleu	0,05	Acide phénol
Mauve	0,27	Anthocyanidine 3-glycosides	Jaune	0,27	Flavonol
Violet	0,39	Flavone	Jaune	0,38	Flavonol
Jaune	0,43	Flavonol	Jaune	0,44	Flavonol
Bleu	0,65	Acide phénol	Violet	0,67	Flavonol
Violet	0,77	Anthocyanidine 3-glycosides	Bleu clair	0,77	Acide phénol
Extrait butanolique			Extrait aqueux		
Couleur (365 nm)	RF	Type flavonoides possible Markham (1982)	Couleur (365 nm)	RF	Type flavonoides possible Markham (1982)
Vert	0,02	Flavonol, flavanone, aurone	Bleu	0,24	Acide phénol
Bleu	0,05	Acide phénol	Jaune	0,43	Flavonol
Jaune	0,39	Flavonol			
Violet	0,44	Flavone			
Bleu	0,73	Acide phénol			

Les composés identifiés chez *A. capilus-veneris* sont 5 dans l'extrait brut, 2 dans la phase d'acétate d'éthyle, 6 dans la phase de n-butanol et un seul composé dans la phase aqueuse. Les composés font partie des flavonols, flavones, et acides phénols dont les acides phénols sont les plus dominants (tableau 08) (figure 52).

Tableau 08 : Résultat de la chromatographie sur couche mince des extraits d'*Adiantum capillus-veneris*

Extrait brute			Extrait d'acétate d'éthyle		
Couleur (365 nm)	RF	Type flavonoïdes possible Markham (1982)	Couleur (365 nm)	RF	Type flavonoïdes possible Markham (1982)
Vert	0,04	Flavonol, flavanone, aurone	Jaune	0,38	Flavonol
Bleu	0,05	Acide phénol	Jaune	0,72	Flavonol
Bleu	0,24	Acide phénol			
Violet	0,39	Flavone			
Jaune	0,43	Flavonol			
Extrait butanolique			Extrait aqueux		
Couleur (365 nm)	RF	Type flavonoïdes possible Markham (1982)	Couleur (365 nm)	RF	Type flavonoïdes possible Markham (1982)
Bleu	0,05	Acide phénol	Violet	0,93	Flavone
Bleu vif	0,08	Acide phénol			
Violet	0,19	Flavone			
Bleu	0,24	Acide phénol			
Bleu	0,37	Acide phénol			
Bleu	0,73	Acide phénol			

Pour *L. stoechas*, 8 composés ont été identifiés dans l'extrait brut, 4 composés dans la phase d'acétate d'éthyle, 9 composés dans l'extrait butanolique et 4 composés dans l'extrait aqueux. Ces composés sont sous forme de flavones, phénols, flavonols, acides phénols, Anthocyanidine 3-glycosides et Anthocyanidine 3,5-diglycosides. Le pool flavonique chez cette espèce est dominé par les flavones et les acides phénols (tableau 09) (figure 53).

En comparant les Rf et la coloration des spots avec ceux des étalons, on a pu identifier la catéchine chez *A. capillus-veneris*. En ce qui concerne la lavande, deux composés ont été identifiés : la catéchine et l'acide gallique. Mohammedi (2006) a identifié la rutine et l'acide ferulique en utilisant la chromatographie sur couche mince.

Tableau 09 : Résultat de la chromatographie sur couche mince des extraits de *Lavandula stoechas*

Extrait brute			Extrait d'acétate d'éthyle		
Couleur (365 nm)	RF	Type flavonoides possible Markham (1982)	Couleur (365 nm)	RF	Type flavonoides possible Markham (1982)
Bleu	0,02	Acide phénol	Jaune	0,38	Flavone
Bleu	0,05	Acide phénol	Jaune	0,44	Flavone
Violet	0,11	Flavone	Jaune	0,48	Flavone
Violet	0,22	Flavone	Bleu	0,53	Acide phénol
Rouge	0,45	Anthocyanidine 3-glycosides			
Rouge	0,48	Anthocyanidine 3-glycosides			
Rose	0,53	Anthocyanidine 3,5-diglycosides			
Violet	0,59	Flavone			
Extrait butanolique			Extrait aqueux		
Couleur (365 nm)	RF	Type flavonoides possible Markham (1982)	Couleur (365 nm)	RF	Type flavonoides possible Markham (1982)
Violet	0,25	Flavone	Jaune	0,32	Flavonol
Marron	0,34	Phénol	Bleu pale	0,37	Acide phénol
Bleu	0,37	Acide phénol	Pourpre sombre	0,38	Flavonol, flavone, chalcone, isoflavone, flavanone
Violet	0,39	Flavone	Pourpre sombre	0,45	Flavonol, flavone, chalcone, isoflavone, flavanone
Violet	0,40	Flavone			
Violet	0,41	Flavone			
Jaune	0,44	Flavonol			
Jaune	0,51	Flavonol			
Bleu	0,58	Acide phénol			

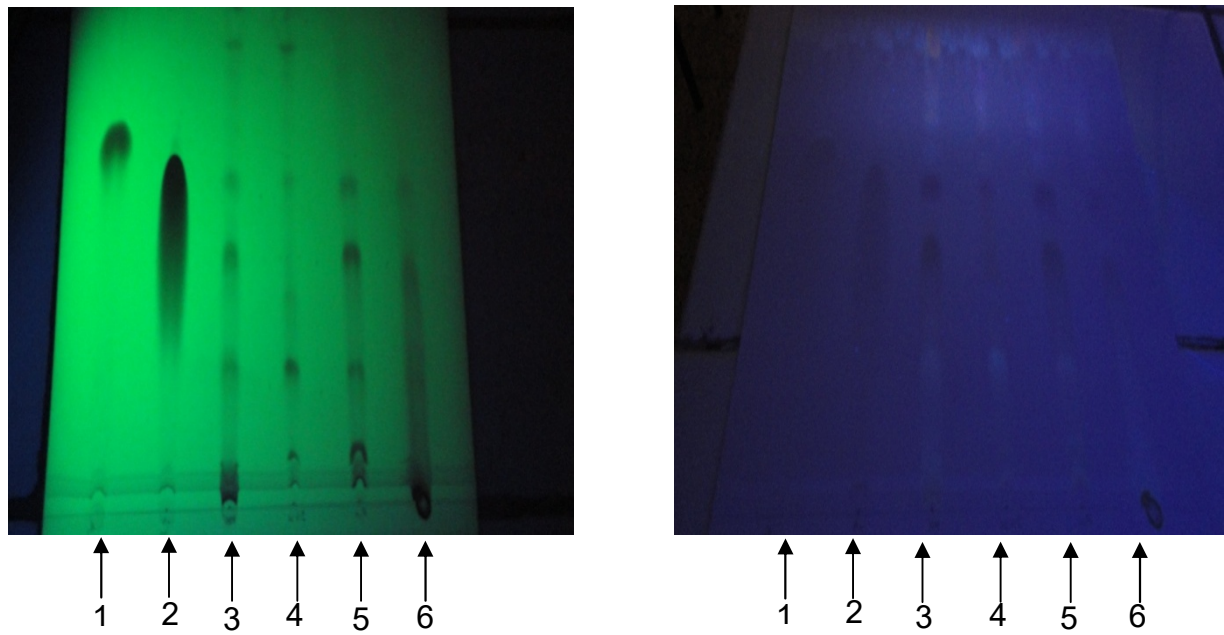


Figure 51 : Chromatogrammes résultant de l'analyse des fractions des flavonoïdes d'*A. iva* par chromatographie sur gel de silice (révélation à l'UV)

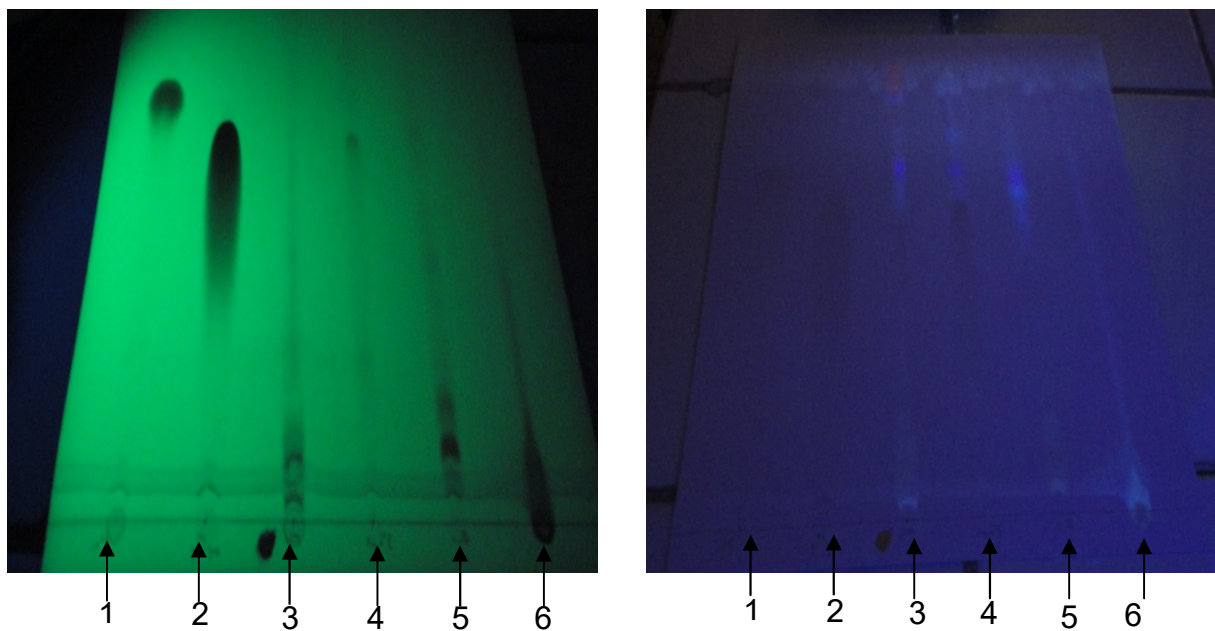


Figure 52 : Chromatogrammes résultant de l'analyse des fractions des flavonoïdes d'*A. capilus-veneris* par chromatographie sur gel de silice (révélation à l'UV)

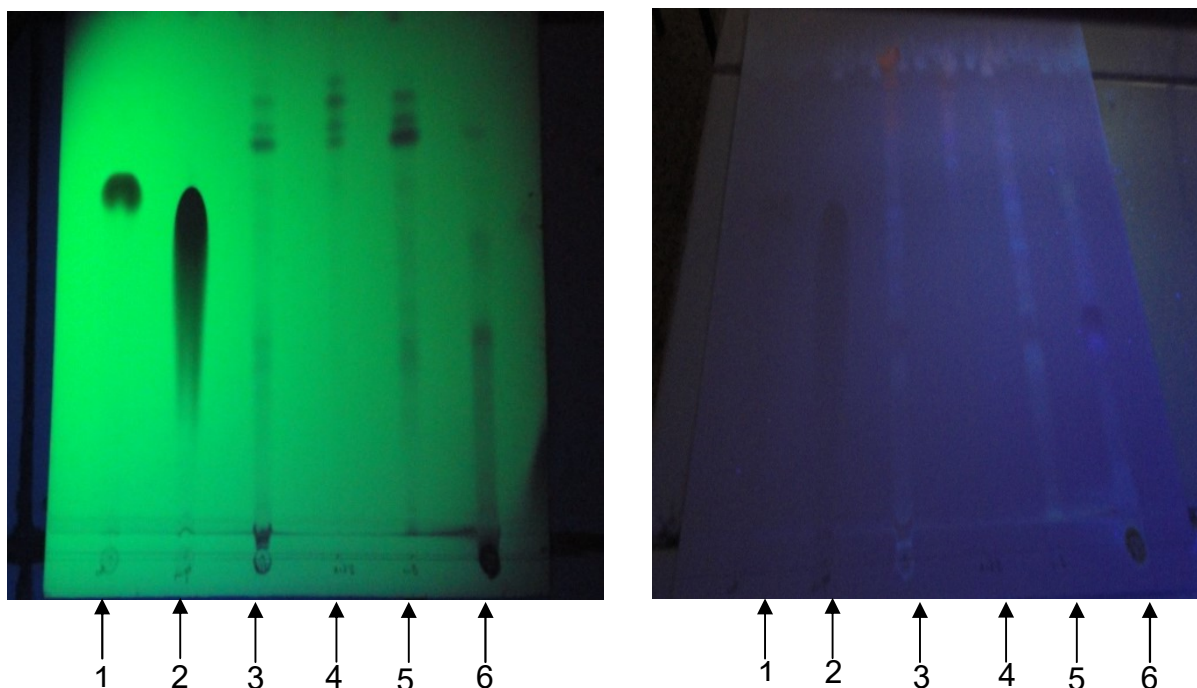


Figure 53 : Chromatogrammes résultant de l'analyse des fractions des flavonoïdes de *L. stoechas* par chromatographie sur gel de silice (révélation à l'UV)

Légende des figures 51, 52, 53 : 1 : Catéchine, 2 : Acide gallique, 3 : EBr, 4 : EAc, 5 : EBt, 6 : EAq

4.2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC-DAD-ESI-MS)

Cette étude nous a permis d'identifier les différents composés phénoliques dans les extraits et de confirmer la présence de flavonoïdes dans trois plates étudiées.

Ajuga iva

Le profil chromatographique de l'extrait hydrométhanolique (figure 54) a révélé la présence de trois acides phénoliques : Acide quinique, acide p-coumaroylquinique et acide 3,4-di-caffeoylquinique et cinq flavonoïdes : apigénine 6,8-di-C-glucoside, kaempférole-3-O-rutinoside, naringénine-O-glucoside, apigénine-8-C-hexoside, naringénine-hexoside et sorhamnetin-3-O-di-glucoside. Les principales composants identifiés sont l'acide p-coumaroylquinique (1275,1 µg/g) et la naringénine-hexoside (921 µg/g) (tableau 10).

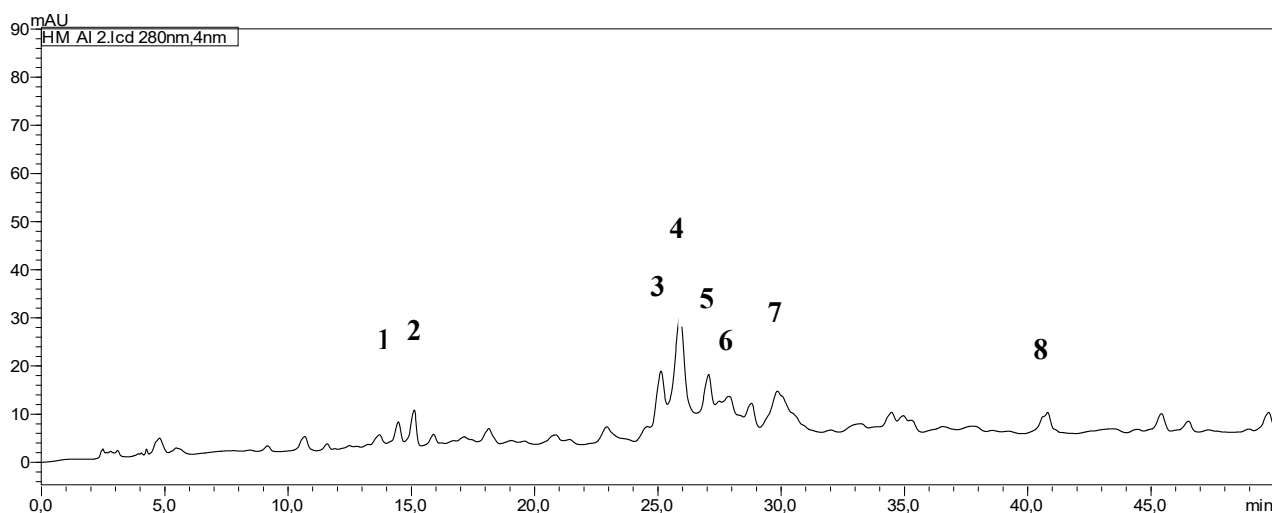


Figure 54 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction hydrométhanolique d'*Ajuga iva*

Tableau 10 : Identification par HPLC-DAD des composés phénoliques de l'extrait hydrométhanolique d'*Ajuga iva*

Pic	TR (min)	Concentration (µg/g)	λ max	MH-	Composants
1	14,473	164,2	260	197	Acide quinique
2	15,117	198,5	338	593	Apigénine 6,8-di-C-glucoside
3	25,129	522,3	268, 348	593	Kaempferole-3-O-rutinoside
4	25,900	1275,1	326, 298	337	Acide p-coumaroylquinique
5	27,060	562,7	327	515	Acide 3,4-di-cafféoylquinique
6	27,871	493,6	271, 332	271	Naringénine-O-glucoside
7	29,854	921,0	238, 285	434	Naringénine-hexoside
8	40,811	187,8	278, 340	639	Sorhamnetin-3-O-di-glucoside

Le profil chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle (figure 55) nous a permis d'identifier 06 acides phénoliques (Acide p-coumaroylquinique, acide 3,4-di-cafféoylquinique, acide ferulique, acide rosmarinique, méthyl rosmarinat et dérivé d'acide ferulique) et 07 flavonoïdes (Apigénine 6,8-di-C-glucoside, quercitrine, naringénine-hexoside, catéchine 7-O-glucoside, apigénine-7-O-glucoside, rutine et luteoline). Le composant prédominant est l'apigénine-7-O-glucoside (3588,5 µg/g) (tableau 11).

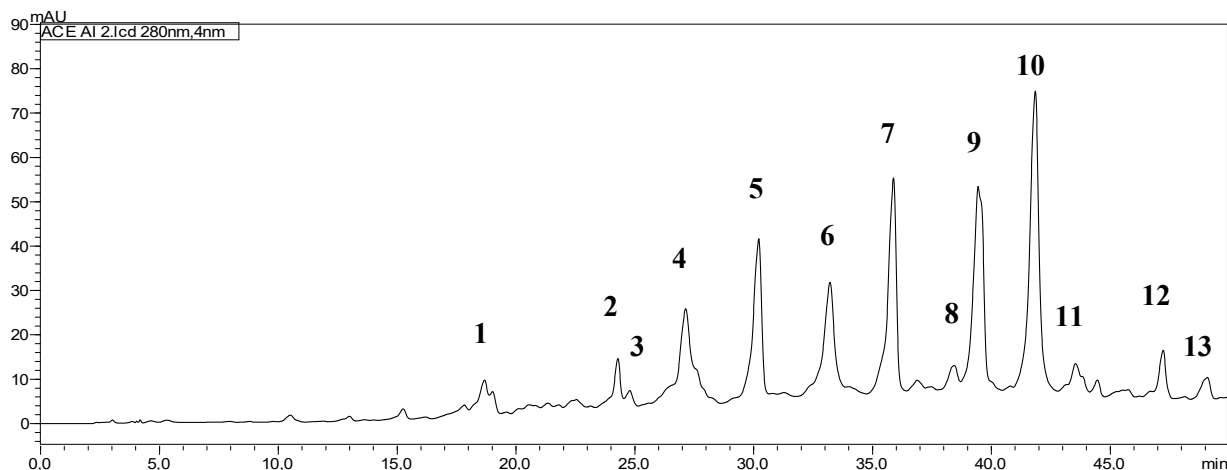


Figure 55 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction acétate d'éthyle d'*Ajuga iva*

Tableau 11 : Identification par HPLC-DAD des composés phénoliques de l'extrait acétate d'éthyle d'*Ajuga iva*

Pic	TR (min)	Concentration (µg/g)	λ max	MH-	Composants
1	18,677	175,6	338 280	593	Apigénine 6,8-di-C-glucoside
2	24,288	246,3	327, 290	338	Acide p-coumaroylquinique
3	24,790	92,1	352 338	447	Quercitrine
4	27,142	922,1	327	515	Acide 3,4-di-cafféoylquinique
5	30,215	868,6	281	434	Naringénine-hexoside
6	33,214	879,4	278	451	Catéchine 7-O-glucoside
7	35,885	3588,5	289 340	431	Apigénine-7-O-glucoside
8	38,435	254,7	256, 355	609	Rutine
9	39,443	1241,5	238 323	193	Acide ferulique
10	41,848	1545,5	328 330	359	Acide rosmarinique
11	43,542	163,7	280 325	373	méthyl rosmarinat
12	47,287	178,6	222 288	339	Dérivé d'acide ferulique
13	49,095	106,1	229 277	285	Lutéoline

Le chromatogramme obtenu de l'extrait butanolique (figure 56) nous a permis d'identifier neuf composés bioactifs (tableau12) : deux acides phénolique (Acide 4,5-di-cafféoylquinique et le dérivé hydroxycinnamique) et huit flavonoïdes (Apigénine-dihexoside, naringénine-hexoside, apigénine-7-O-glucoside, isorhamnetine-3-O-di-glucoside,

kaempferole, kaempferole-3-O-glucoside et apigenine-O-hexuronide). L'apigenine-7-O-glucoside (881,3 µg/g), est le principal composant.

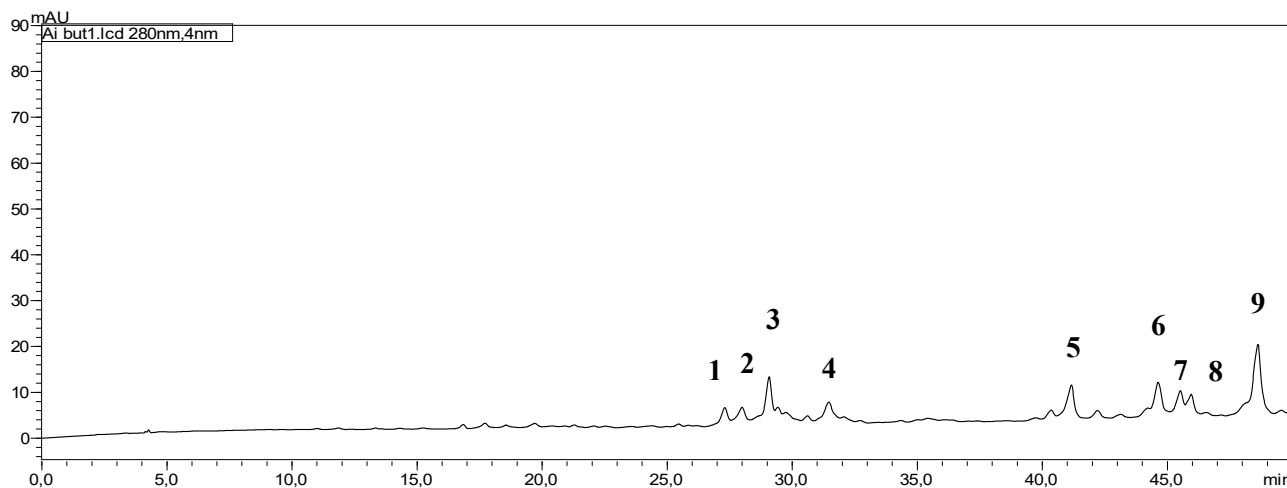


Figure 56 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction butanolique d' *Ajuga iva*

Tableau 12 : Identification par HPLC-DAD des composés phénoliques de l'extrait butanolique d' *Ajuga iva*

Pic	TR (min)	Concentration (µ/g)	λ max	MH-	Composants
1	27,305	312,6	334, 270	594	Apigenine-dihexoside
2	27,997	388,1	281 330	434	Naringenine- hexoside
3	29,079	881,3	270 334	431	Apigenine-7-O-glucoside
4	31,467	523,5	300 327	515	Acide 4,5-di-caffeoylquinique
5	41,163	594,4	274 341	639	Isorhamnetine-3-O-di-glucoside
6	44,632	614,0	256 352	285	Kaempferol
7	45,522	416,4	271 285	447	Kaempferol-3-O-glucoside
8	45,955	338,8	269	445	Apigenine-O-hexuronide
9	48,621	151,06	291 309	349	Dérivé hydroxycinnamique

Le profil phénolique de la fraction aqueuse (figure 57) est moins important que celui des autres fractions, seul 06 composés phénoliques ont été identifiés (tableau 13). Les

acides phénoliques sont présentés par l'acide 3,5-di-caffeoylquinique et le dérivé d'acide ferulique. Les flavonoïdes sont présentés par : naringenine-hexoside, apigenine-7-O-glucoside, epicatechine-7-O-rutinoside et quercetine-rhamno-di-hoxoside dont l'apigenine-7-O-glucoside (743,2 µg/g) est le principale composant.

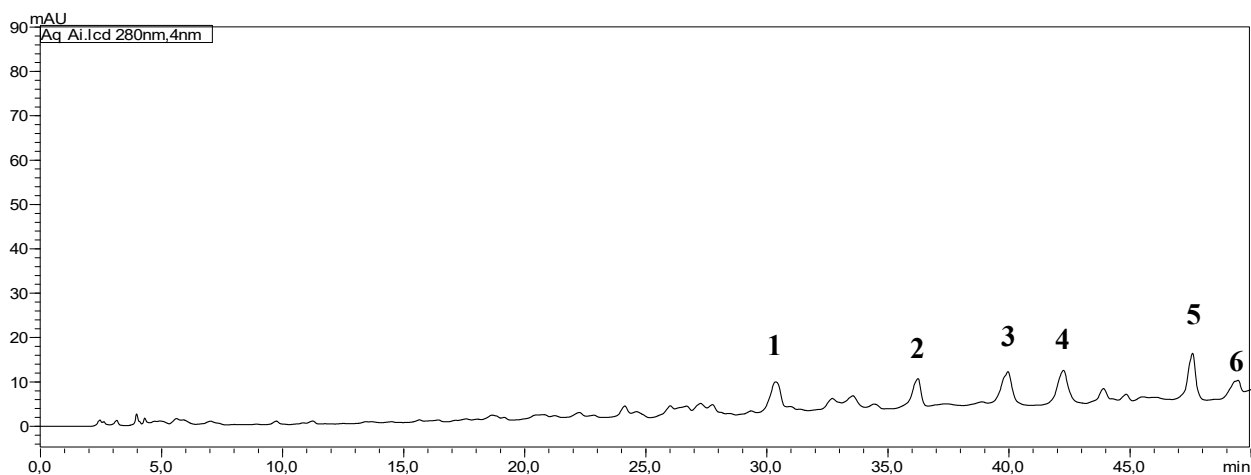


Figure 57 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction aqueuse d'*Ajuga iva*

Tableau 13 : Identification par HPLC-DAD des composés phénoliques de l'extrait aqueuse d'*Ajuga iva*

Pic	TR (min)	Concentration (µ/g)	λ max	MH-	Composants
1	30,360	696,8	300 326	515	Acide 3,5-di-caffeoylquinique
2	36,242	515,5	330	434	Naringenine-hexoside
3	39,963	743,2	337	431	Apigenine-7-O-glucoside
4	42,252	725,4	265 348	597	Epicatechine-7-O-rutinoside
5	47,288	713,4	222 288	389	Dérivé d'acide ferulique
6	49,464	275,5	256	771	Quercetine-Rhamno-di-hoxoside

La naringenine et l'apigenine identifiés dans notre étude étaient également déterminés par plusieurs auteurs. Ghedira et *al.* (1991) ont rapporté l'isolement et l'élucidation de la structure de deux flavonoïdes communs, l'apigénine 7-O-néohespéridoside et la naringine

(naringénine 7-O-rutinoside) de *A. iva*. Le même composé, la naringine, a également été cité dans des travaux précédents (Taleb-Senouci et al., 2009a ; Taleb-Senouci et al., 2012b).

Stocker et al. (2004) ont trouvé une autre classe de polyphénols, à savoir des dérivés de l'acide hydroxycinnamique, dans l'extrait hydroalcoolique des parties aériennes de cette plante, mais aucun flavonoïde n'a été détecté par la méthode utilisée. El-Hilaly et al. (2004) ont mentionné la présence de flavonoïdes dans l'infusion aqueuse d'*A. iva*, sans donner plus de détails.

Boudjlel et al. (2015) ont montré que deux flavonoïdes semblaient prédominer, l'apigénine et la naringénine, dans l'infusion aqueuse d'*Ajuga iva*. Cependant, Khattelia et al. (2020) ont signalé la présence d'acide caféique, d'acide *p*-coumarique, de rutine et de lutéoline dans la partie aérienne de l'*Ajuga iva*. Ces constatations sont en accord avec nos résultats.

L'apigénine-7-O-glucoside a été très actif contre une large gamme de bactéries à Gram positif. Wang et al. (2020) ont mentionné que l'apigénine-7-O-glucoside a une activité antioxydante forte. Ces résultats suggèrent que cette plante pourrait être un potentiel médicamenteux efficace pour le stress oxydatif et les maladies infectieuses.

Adiantum capillus-veneris

Le spectre d'absorption de l'extrait brut (figure 58) a révélé la présence de 16 composés phénoliques (acide gentisique, acide chlorogénique, acide *p*-Coumarique, dérivés d'acide caféique, acide ferulique, kaempferole, quercétine, acide 3-*p*-coumaroylquinique, apigénine-7-O-glucoside, acide 3,5-di-O-cafféoylquinique, isorhamnetine-3-O-di-glucoside, quercétine 3-O-glucoside, epicatechine 7-O-rutinoside, kaempferole 3-O-glucoside, dérivé d'acide ferulique, dérivé hydroxycinnamique) dont la quercétine 3-O-glucoside est le principal composé identifié (949,5 µg/g), suivi de l'acide 3,5-Di-O-caféoylquinique (769,0 µg/g), du dérivé hydroxycinnamique (404,3 µg/g) et du kaempférol 3-O-glucoside (359,6 µg/g) (tableau 14).

L'extrait acétate d'éthyle renferme les composants suivants : Acide gentisique, quercitrine, quercétine, apigénin-6,8-di-C-glycoside, apigénin-7-O-glucoside, isorhamnetine-3-O-di-glucoside, quercétine 3-O-glucoside, kaempferole 3-O-glucoside, dérivé d'acide ferulique. L'isorhamnetine-3-O-di-glucoside et la quercétine 3-O-glucoside ont été les

majeurs composés identifiés (431,9 $\mu\text{g/g}$, 1307,7 $\mu\text{g/g}$ respectivement) (figure 59) (tableau 14).

Neuf composés phénoliques ont été identifiés dans l'extrait butanolique qui sont : Acide gentisique, apigénine-7-O-glucoside, isorhamnétine-3-O-di-glucoside, quercétine 3-O-glucoside, épicatechine 7-O-rutinoside, kaempferole 3-O-glucoside, 2 dérivé d'acide ferulique, dérivé hydroxycinnamique, où la quercétine 3-O-glucoside représente la substance dominante avec 2322,0 $\mu\text{g/g}$ (figure 60) (tableau 14).

Dans l'extrait aqueux, on a pu caractériser : acide gentisique, acide chlorogénique, acide *p*-coumarique, dérivés d'acide caféique, acide ferulique, kaempferol, quercétine, apigénin-6,8-di-C-glycoside, apigénin-7-O-glucoside, acide 3,5-di-O-caféoylquinique, isorhamnétine-3-O-di-glucoside, quercétine 3-O-glucoside, épicatechine 7-O-rutinoside, acide trans *p*-coumarique, kaempferol 3-O-glucoside, dérivés d'acide ferulique, Dérivés Hydroxycinnamique, avec prédominance des dérivés Hydroxycinnamique (1413,0 $\mu\text{g/g}$) et des dérivés d'acide ferulique (946,6 $\mu\text{g/g}$) (figure 61) (tableau 14).

Yuan et al. (2012) ont rapporté que les feuilles d'*Adiantum capillus-veneris* contiennent du kaempferole-3-glucosides en quantité élevée. De même, Zeb & Ullah (2017) ont identifié le kaempferol-3-sophorotrioside à une concentration élevée (58,7 mg/g), ce qui n'est pas en concordance avec nos résultats où kaempferole-3-sophorotrioside n'est pas été identifiée mais la kaempferole-3-glucosides a été détectée avec des concentrations importantes. Les principaux composés polyphénoliques dans l'extrait aqueux préparé par reflux du matériel végétal séché et grossièrement pulvérisé pendant 15 min, se sont avérés être l'acide ellagique (5,48 mg/g) et la quercétine-3-O-glucoside (3,96 mg/g) dans l'étude d'Al-Hallaq et al. (2015). Ces données ne correspondent pas à nos résultats où l'acide ellagique n'a pas été identifié dans les extraits.

Ces résultats permettent de mieux comprendre la composition réelle des composés bioactifs, qui peuvent être responsables des propriétés antioxydantes et antibactériennes de la partie aérienne d'*A. capillus-veneris*. En effet, la quercétine et ses glycosides, le composé majoritaire est considéré comme un ingrédient alimentaire fonctionnel de grande valeur, doté d'un large éventail d'applications thérapeutiques telles que des utilisations anticancéreuses, antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires. Cette plante peut être utilisée comme source possible de nutraceutiques ou comme ingrédient alimentaire fonctionnel.

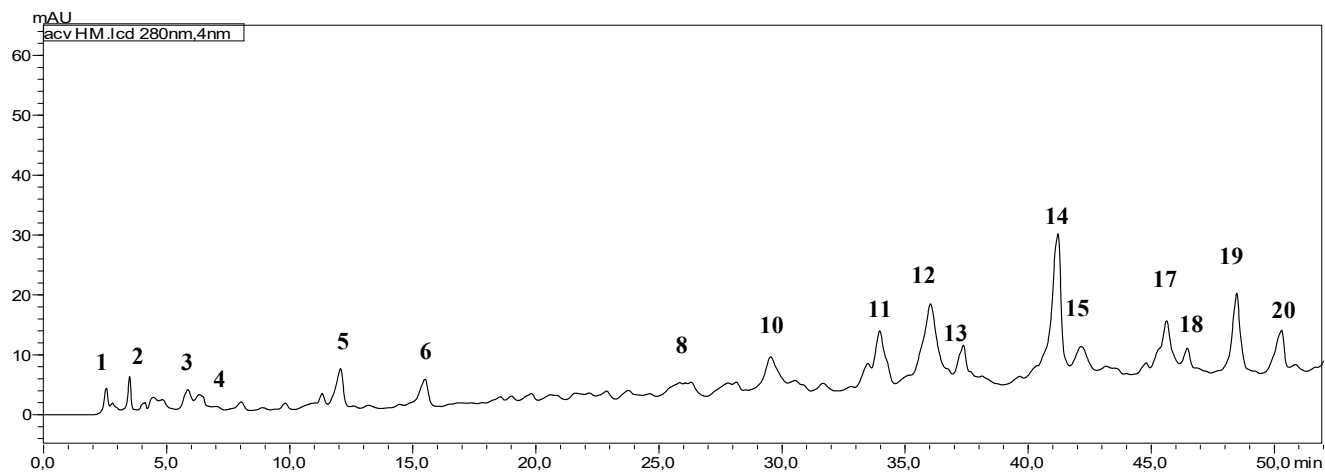


Figure 58 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction hydrométhanolique d'*Adiantum capillus-veneris*

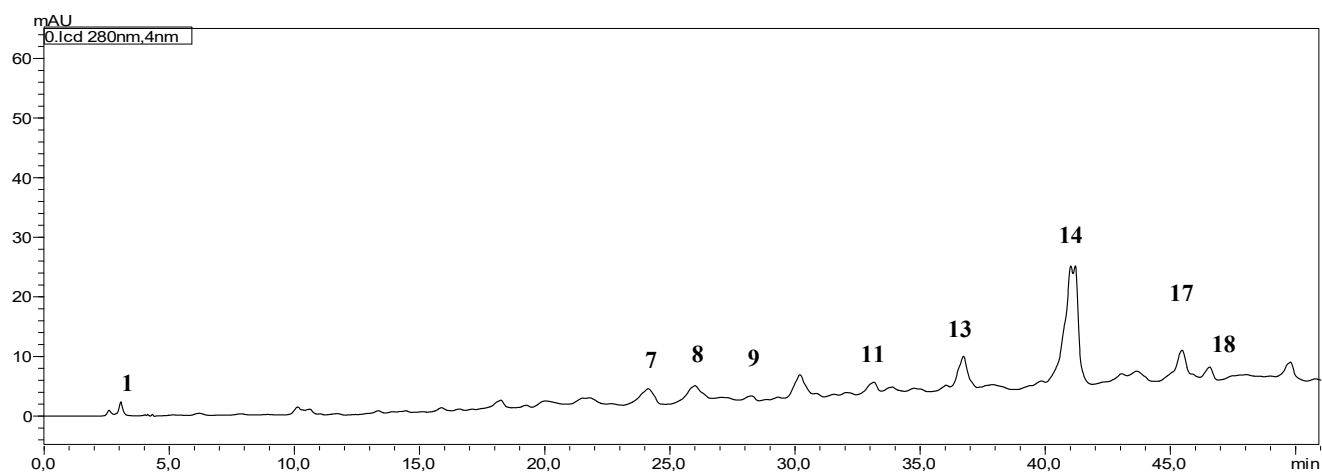


Figure 59 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction acétate d'éthyle d'*Adiantum capillus-veneris*

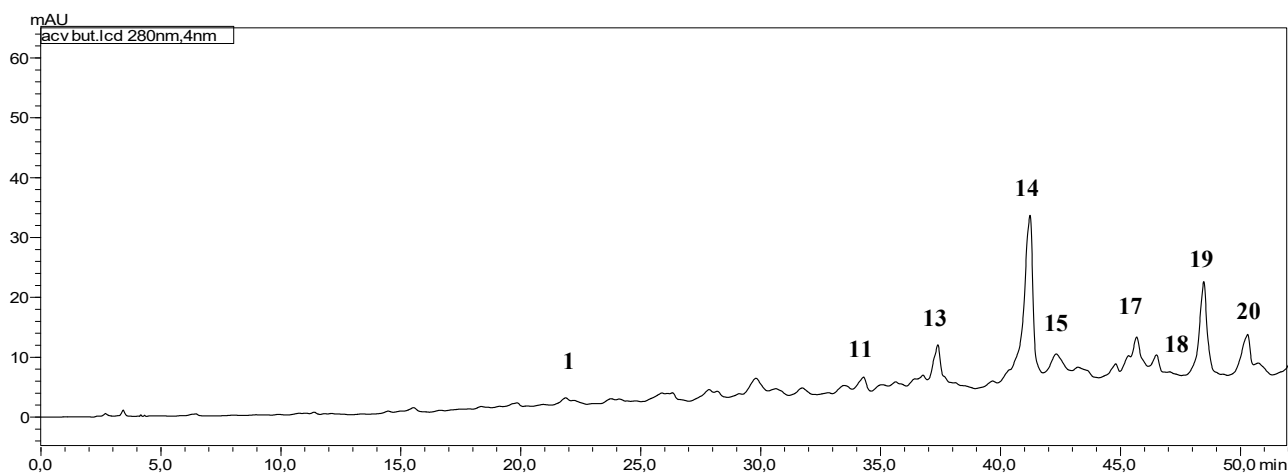


Figure 60 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction butanolique d'*Adiantum capillus-veneris*

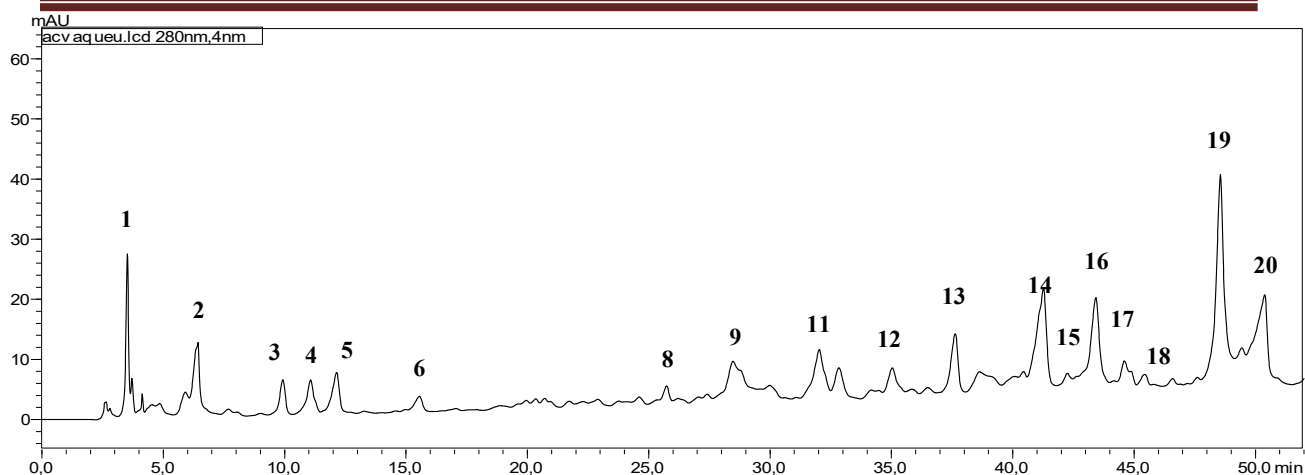


Figure 61 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction aqueuse d'*Adiantum capillus-veneris*

Tableau 14 : Identification par HPLC-DAD des composés phénoliques des extraits d'*Adiantum capillus-veneris*

Pic	TR (min)	Extraits (µg/g)				λ max	MH-	Composants
		EBr	EAc	EBt	EAq			
01	3.52	72.8	71,2	23,7	34,11	272	153	Acide gentisique
02	6.43	60.9	0	0	396,7	262	353	Acide chlorogenique
03	9.92	19.9	0	0	146,8	307	163	Acide <i>p</i> -coumarique
04	11.07	51.8	0	0	192,4	267	489	Dérivé d'acide caffeique
05	12.14	183.8	0	0	229,2	332, 283	193	Acide ferulique
06	15.49	149.7	0	0	89,2	356, 255	284	Kaempferole
07	24.13	0	268,5	0	0	352	447	Quercitrine
08	25.73	108.1	253,0	0	76,3	271 332	301	Quercetine
09	28.47	0	45,5	0	313,0	268 337	331	Apigénine-6,8-di-C-glycoside
10	29.54	325.8	0	0	0	306, 313	337	Acide 3- <i>p</i> -coumaroylquinique
11	33.97	353.4	158,9	179,1	196,7	255 353	431	Apigénine-7-O-glucoside
12	36.03	769.0	0	0	191,4	204 345	515	Acide 3,5-di-O-caffeoylquinique
13	37.37	257.3	431,9	576,0	293,3	231 277	639	Isorhamnetine-3-O-di-glucoside
14	41.21	949.5	1307,7	2322,0	776,6	255 353	463	Quercetine 3-O-glucoside
15	42.15	255.5	0	556,7	111,2	265 348	597	Epicatchine 7-O-rutinoside
16	43.42	0	0	0	675,6	308	165	Acide trans <i>p</i> -coumarique
17	45.62	359.6	407,2	417,7	151,1	271 285	447	kaempferole 3-O-glucoside
18	46.46	110.1	127,5	158,2	89,3	288 414	389	Dérivé d'acide ferulique
19	48.47	404.3	0	990,0	1413,0	291 309	349	Dérivé hydroxycinnamique
20	50.30	219.6	0	477,8	946,6	276 435	389	Dérivé d'acide ferulique

Lavandula stoecha

L'analyse chimique par chromatographie liquide à haute performance (figure 62, 63, 64), a révélé la présence de : quercétine 3-glucoside, kaempferol 3-O-rutinoside, quercétine 3-O-rhamnoside, catechin-7-O-glucoside, l'acide 3-p-coumaroylquinique, l'acide rosmarinique, l'acide vanillique, luteoline 7-O-glucuronide et l'acide 4-Hydroxybenzoic 4-Oglucoside dans tous les extraits, à l'exception du quercétine 3-glucoside, qui n'était pas présente dans l'extrait hydrométhanolique. Le dérivé de l'acide caféique, l'Apigénine 6-C-glucoside, l'Apigénine 7-O-glucoside sont présents uniquement dans l'extrait hydrométhanolique. L'acide 4-hydroxybenzoic 4-Oglucoside est le principal composé identifié, suivi du luteoline 7-O-glucuronide et de l'acide 3-p-coumaroylquinique dans toutes les fractions (tableau 15).

Conformément à nos résultats, la présence de lutéoline 7-glucoside, d'acide, d'apigénine et d'acide caféique a été confirmée dans l'extrait méthanique (Hawryl et al., 2019).

Suite aux résultats de cette analyse, il a été établi que les composés isolés de *Lavandula stoechas* peuvent être responsables d'une partie de l'activité antioxydante de l'extrait total et pourraient jouer un rôle important dans l'efficacité thérapeutique de *Lavandula stoechas*.

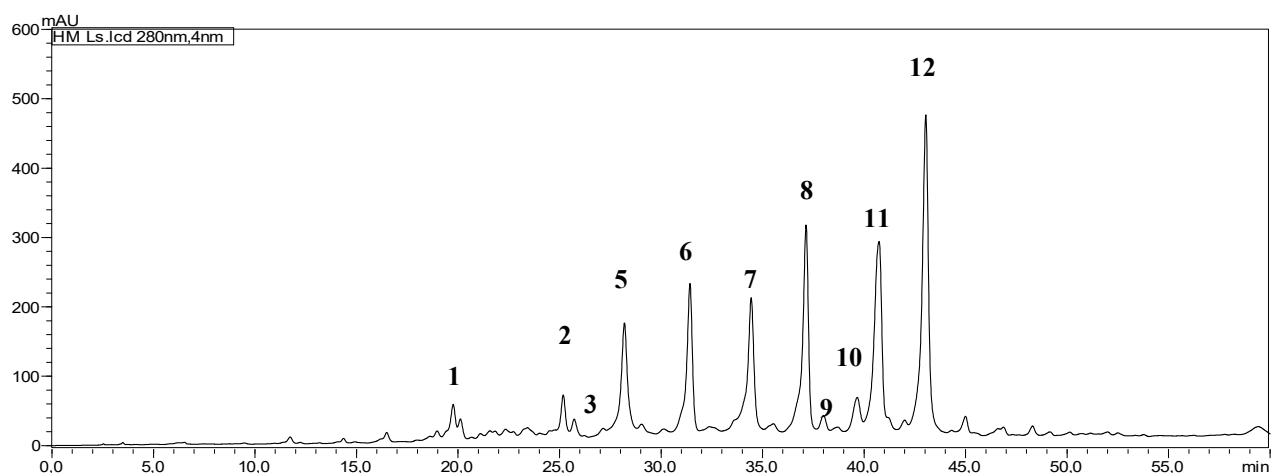


Figure 62 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction hydrométhanolique de *Lavandula stoechas*

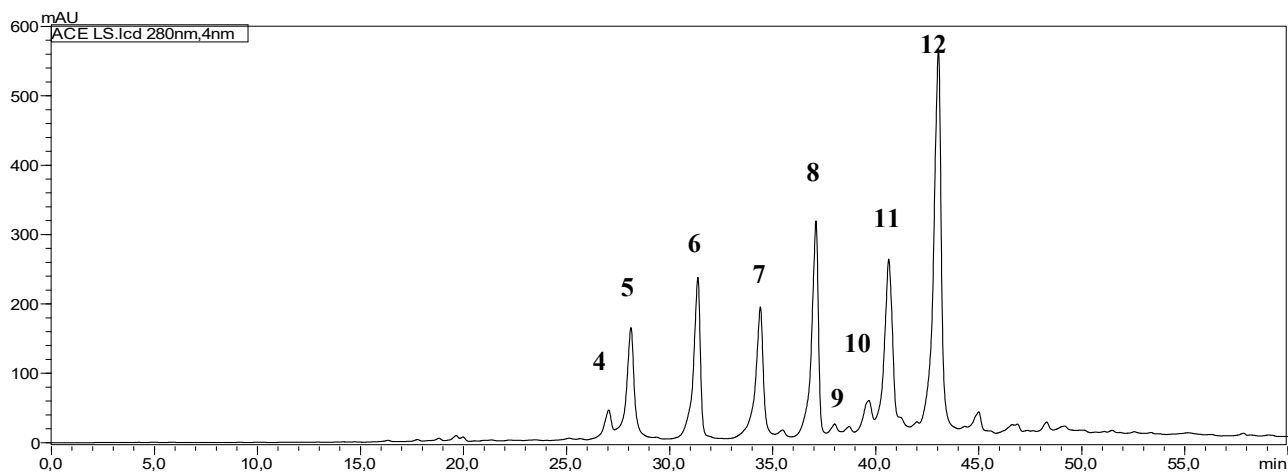


Figure 63 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction acétate d'éthyle de *Lavandula stoechas*

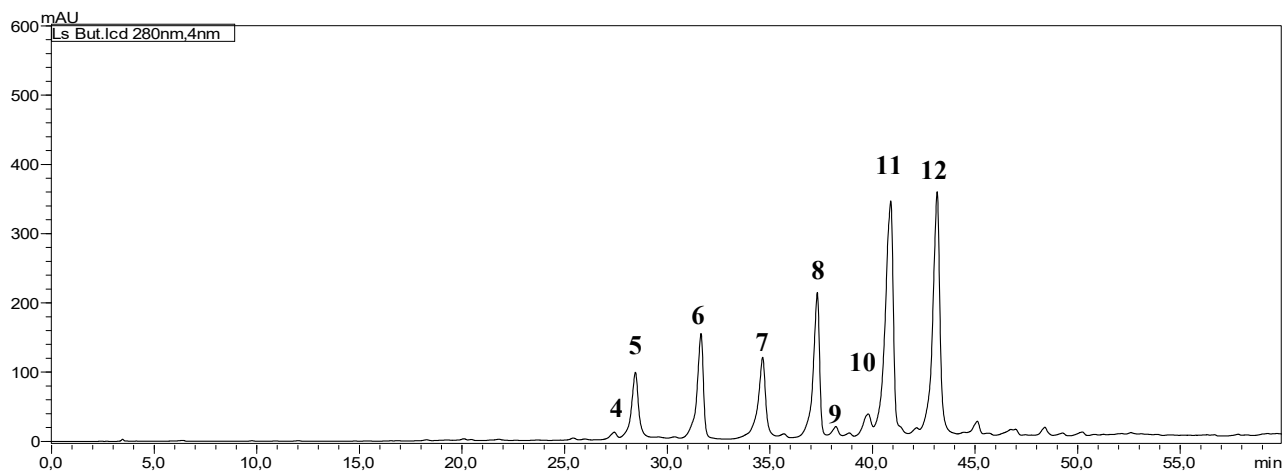


Figure 64 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction butanolique de *Lavandula stoechas*

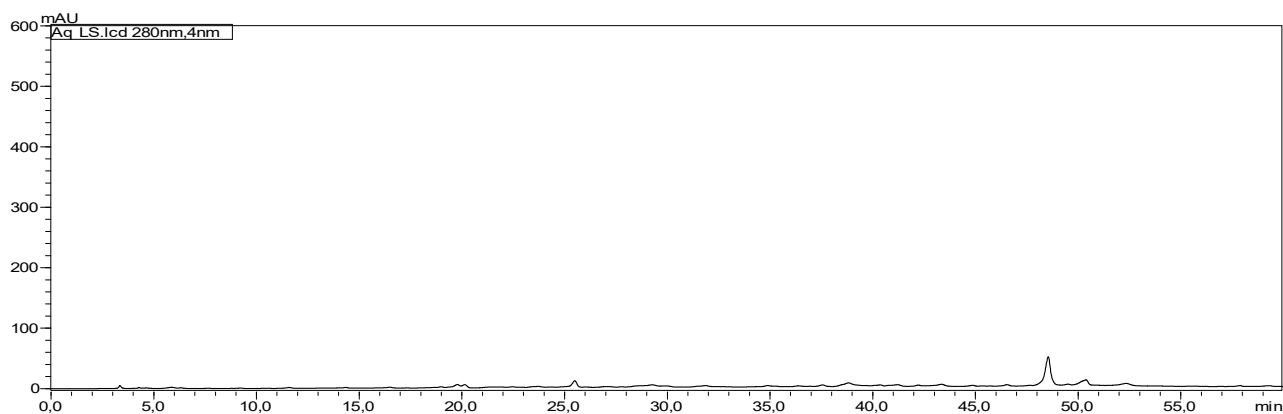


Figure 65 : Chromatogramme typique d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction aqueuse de *Lavandula stoechas*

Tableau 15 : Identification par HPLC-DAD-ESI-MS des composés phénoliques des extraits de *Lavandula stoechas*

Pic	TR (min)	Extraits (µg/g)			λ max	MH-	Composants
		EBr	EAc	EBt			
01	19.76	17,47	0	0	283 325	489	Dérivé d'acide caféique
02	25.18	18,96	0	0	270 334	431	Apigénine 6-C-glucoside
03	25.72	9,95	0	0	267 337	431	Apigénine 7-O-glucoside
04	27.4	0	19,55	6,32	353	463	Quercétine 3-glucoside
05	28.12	68,34	75,73	62,84	345	593	Kaempferol 3-O-rutinoside
06	31.64	76,28	94,13	86,37	256 352	447	Quercétine 3-O-rhamnoside
07	34.44	91,83	88,03	81,18	278	451	Catéchine 7-O-glucoside
08	37.31	105,97	120,96	117,03	310	337	Acide 3-p-oumaroylquinique
09	38.21	13,53	10,63	10,37	288 329	359	Acide rosmarinique
10	39.79	27,02	30,42	25,47	289	409	Acide vanillique
11	40.89	124,01	134,44	242,74	269 346	461	Lutéoline 7-O-glucuronide
12	43.15	215,61	314,08	246,34	256	301	Acide 4-Hydroxybenzoic 4-O glucoside

4. Résultats de l'étude de l'activité antioxydante

4.1. Piégeage des radicaux DPPH

Plusieurs méthodes ont été développées pour évaluer l'activité antioxydante des végétaux par le piégeage des radicaux libres synthétiques en solution dans des solvants polaires comme le méthanol à température ambiante. Les radicaux les plus fréquemment utilisés incluent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

La capacité de la réduction du radical libre DPPH pendant le temps de 30 mn par les extraits des trois plantes est représentée par les graphes des figures 66, 67, 68, 69, 70 qui représentent les pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations en extrait, en catéchine et en acide ascorbique.

Ajuga iva

Les fractions des flavonoïdes d'*A. iva* présentent une activité antioxydante moyenne qui ne dépasse pas 75 % à la concentration de 1000 µg (figure 66). En comparant les concentrations efficaces de chacune des fractions, on s'aperçoit que les extraits étudiés n'ont pas le même pouvoir antioxydant. Effectivement, la fraction à acétate d'éthyle possède la plus forte activité antioxydante ($IC_{50} = 39.53 \mu\text{g/mL}$). La fraction butanolique et hydrométhanolique révèlent un indice IC_{50} égal à 44.17 µg/mL et 55.04 µg/mL respectivement (tableau 16). Nos résultats permettent de montrer que l'activité antioxydante de la phase aqueuse est 50 fois moins que celles des antioxydants standards (figure 66). Les extraits d'*Ajuga iva* ont montré une activité antioxydante plus puissante par rapport aux études rapportées par Medjeldi et al. (2018) sur la même espèce du nord-ouest et Movahhedini et al. (2016) avec une $IC_{50}=0.43 \text{ mg/mL}$, $IC_{50} = 0.330 \text{ mg/mL}$ respectivement.

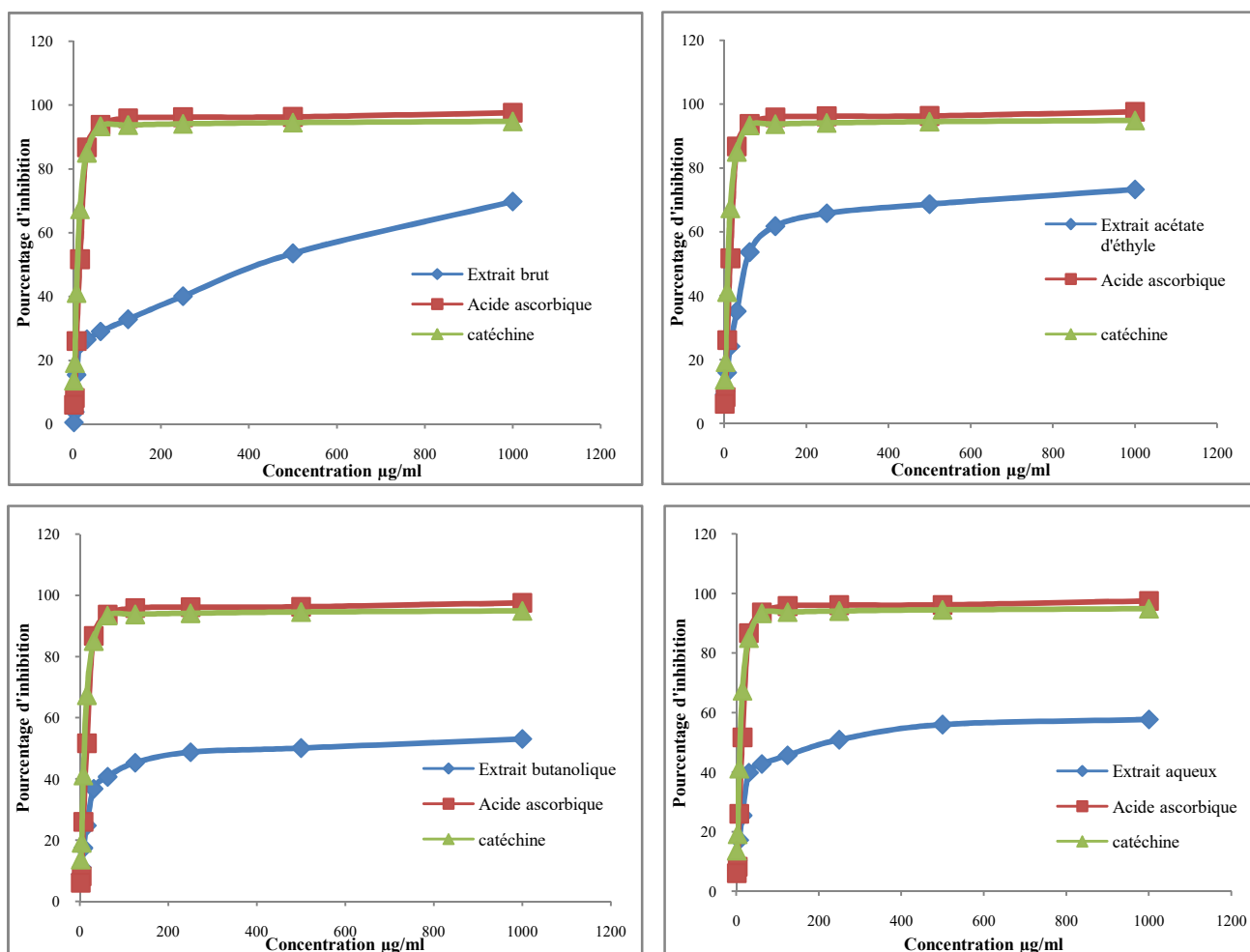


Figure 66 : Pouvoir antioxydant testé par la méthode de piégeage des radicaux DPPH des extraits flavonoïdiques d'*Ajuga iva*

Adiantum capillus-veneris

Les extraits ont montré un effet de neutralisation du radical DPPH[•] élevé, ceci est démontré par l'allure du graphe qui trace une courbe exponentielle avec la présence d'une phase stationnaire, qui définit la réduction presque complète du DPPH[•] en sa forme non radicalaire. Le pourcentage d'inhibition dépasse 90 % à une concentration de 1000 µg dans toutes les fractions (figure 67), et ces résultats sont proches de celles trouvées avec l'acide ascorbique et la catéchine ($97.53 \pm 4.72 \%$, $94.87 \pm 1.78 \%$ respectivement).

Parmi les quatre extraits de la partie aérienne d'*A. capillus-veneris*, la fraction acétate d'éthyle était la plus active avec une IC₅₀ de l'ordre de 27,66 µg/mL. L'extrait butanolique et l'extrait brut ont montré une activité antiradicalaire modérée. En revanche, la fraction aqueuse semble avoir une activité antioxydante plus faible (140.61 µg/mL). Les valeurs d'IC₅₀ restent

inférieurs à ceux des antioxydants de référence, la catéchine (14.26 $\mu\text{g/mL}$) et l'acide ascorbique (17.21 $\mu\text{g/mL}$) (tableau 16).

Plusieurs études ont été réalisées sur l'activité antioxydante de la partie aérienne d'*Adiantum capillus-veneris*. Boudjema et al. (2020) ont rapporté que l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Adiantum capillus veneris* récoltée de Boumerdes présente un effet antioxydant puissant correspondant à une valeur IC_{50} de 280 $\mu\text{g/ml}$, ce qui est 4 fois plus élevée que la valeur obtenue dans notre étude. De leur côté, Roy et al. (2019) ont également signalé une faible activité antioxydante de l'extrait acétate d'éthyle obtenu avec une valeur de 1.5 $\mu\text{g/ml}$. Cette valeur est 26 fois inférieure que la valeur enregistrée dans notre étude.

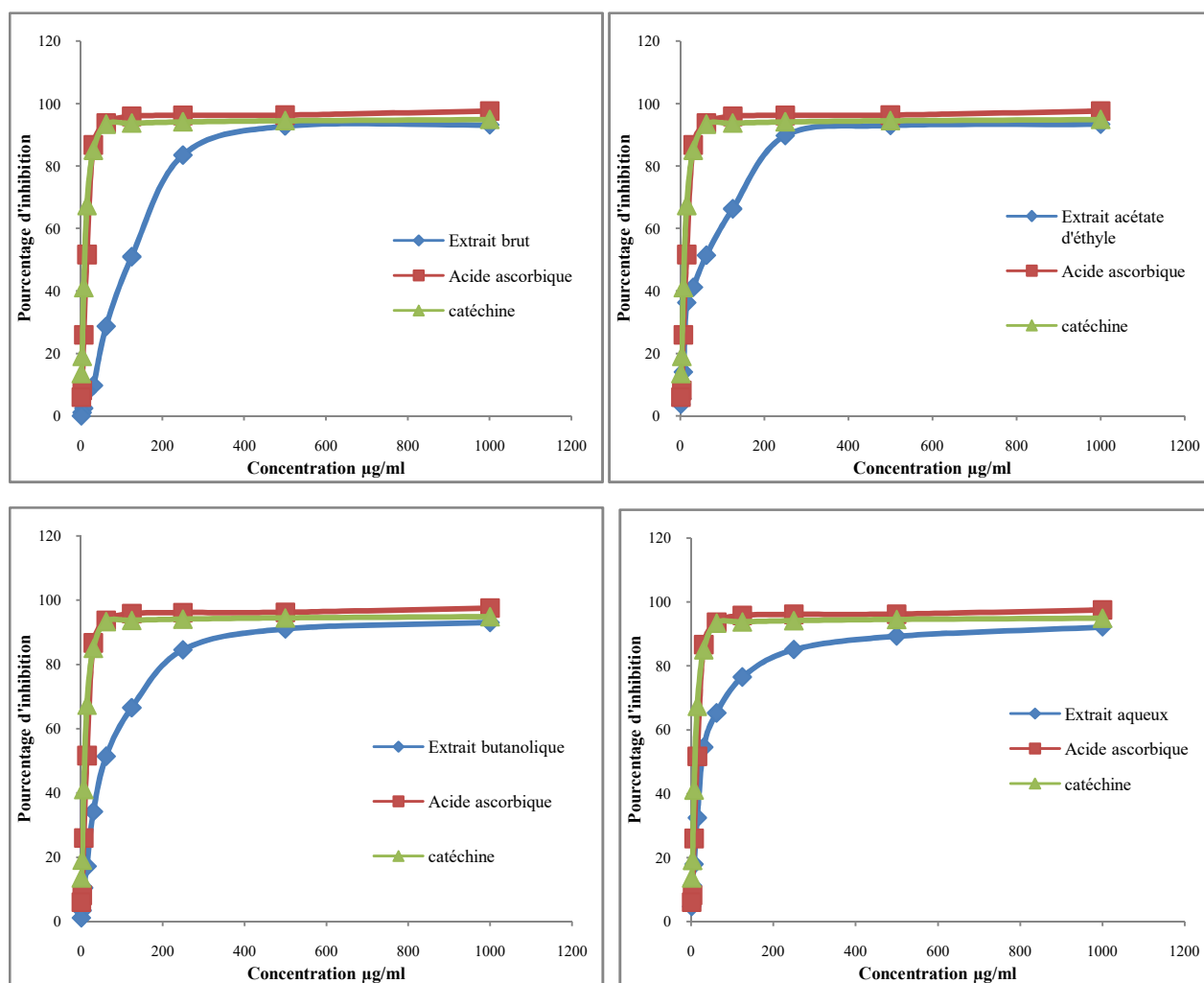


Figure 67 : Pouvoir antioxydant testé par la méthode de piégeage des radicaux DPPH des extraits flavonoïdiques d'*Adiantum capillus-veneris*

Lavandula stoechas

Les extraits ont révélé une activité élevée de piégeage du radical libre DPPH. Nous avons remarqué qu'à de faibles concentrations, il existe des pourcentages d'inhibition élevés, tel est le cas pour la phase butanolique qui a donné un pourcentage d'inhibition égale à $81.45 \pm 4,14$ % à une concentration de $31,25 \mu\text{g/ml}$. Les pourcentages d'inhibition sont très proches de celles de l'acide ascorbique et de la catéchine (figure 68). La phase acétate d'éthyle de la lavande présente une IC_{50} inférieure à celle de l'acide ascorbique et de la catéchine avec $13.70 \mu\text{g/ml}$. Il en est de même pour la fraction butanolique avec $15.45 \mu\text{g/ml}$. En outre, l'extrait brut et l'extrait aqueux sont caractérisés par un important effet antioxydant avec des valeurs IC_{50} de $68.09 \mu\text{g/ml}$ et $71.19 \mu\text{g/ml}$ respectivement (tableau 16).

Le potentiel antioxydant des extraits de notre espèce était plus fort que le potentiel antioxydant des extraits éthanoliques rapporté dans l'étude de Ceylan et *al.* (2015) ($300 \mu\text{g/ml}$). *L. stoechas* récolté en Algérie avait une valeur d' IC_{50} de $67.38 \mu\text{g/mL}$ (Sirohi et *al.*, 2019), ce qui était proche de ce qui a été noté pour l'extrait méthanolique et aqueux dans notre étude.

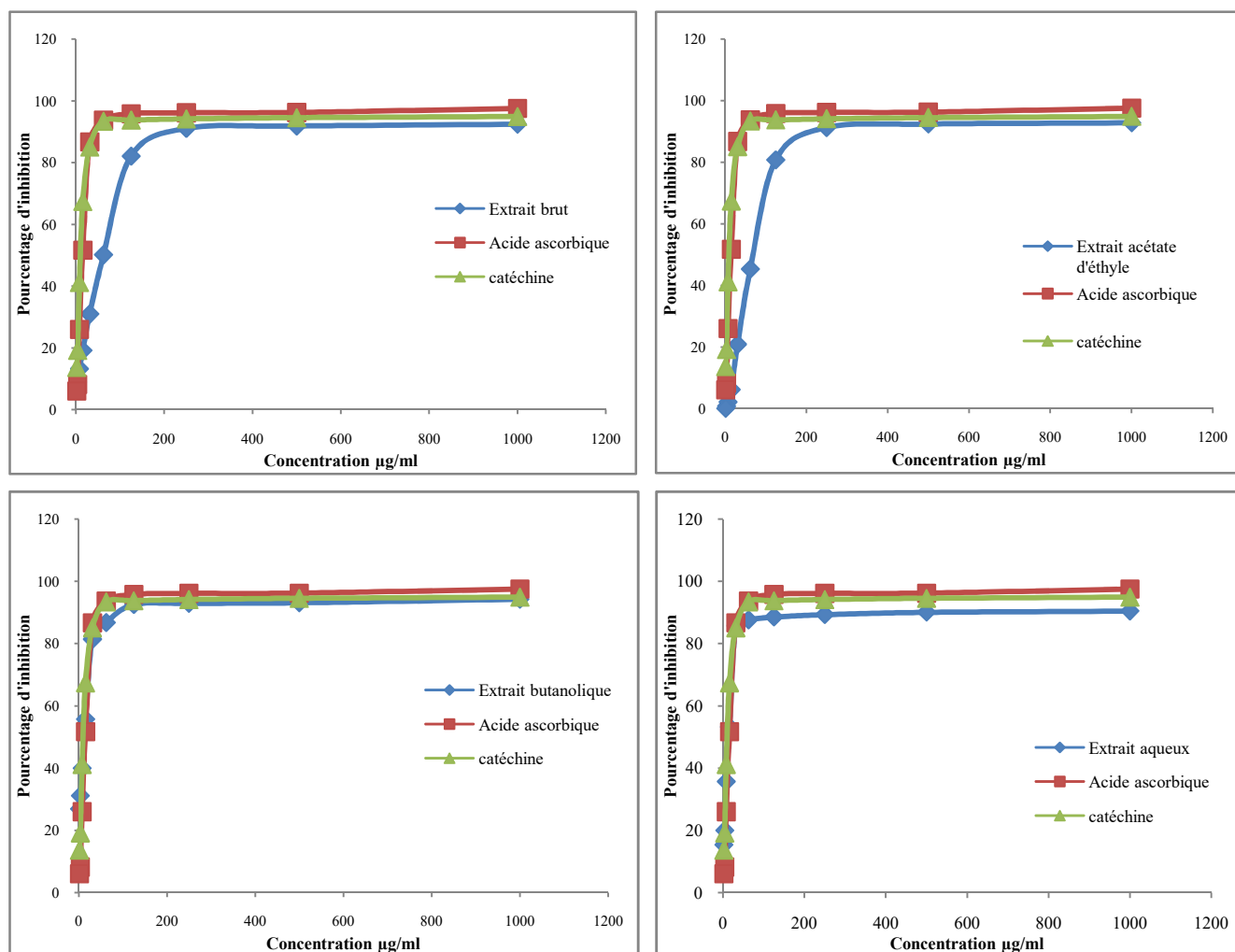


Figure 68 : Pouvoir antioxydant testé par la méthode de piégeage des radicaux DPPH des extraits flavonoïdiques de *Lavandula stoechas*

Tableau 16 : Valeurs des IC₅₀ (µg/ml) trouvés pour les différents extraits des trois plantes étudiées

	EBr	EAc	EBt	EAq
<i>Ajuga iva</i>	55.04	39.53	44.17	512.25
<i>Adiantum capilus-veneris</i>	65.85	27.66	57.42	140.61
<i>Lavandula stoechas</i>	68.09	13.70	15.45	71.19
Acide ascorbique	17.21			
Catéchine	14.26			

Selon la boîte de moustache (figure 69), la présente étude a fait ressortir que les extraits étudiés ont une capacité antioxydante dose dépendante et le pourcentage d'inhibition du radical DPPH augmente significativement ($P \leq 0.05$) avec l'augmentation de la concentration. Ce pouvoir est confirmé par des valeurs basses d' IC_{50} et des forts pourcentages d'inhibition. La différence est très nettement significative entre *Lavandula stoechas* et *A. iva*.

Le Box-plot des extraits révèle que l'ordre des fractions, du plus puissant au moins puissant, était $EAc > EBr > EBr > EAq$ (figure 69). L'extrait d'acétate d'éthyle était l'antioxydant le plus puissant, ce qui suggère que l'activité antioxydante des parties aériennes des trois plantes est principalement due à des constituants non polaires. Similaire à cette observation, l'extrait acétate d'éthyle des feuilles de *Piper retrofractum* possède une activité antioxydante élevée (Jadid et al., 2017). L'acétate d'éthyle a été choisi pour extraire certains composés phénoliques et azotés. Ces composés sont bien connus pour éliminer les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (ROS), y compris l'anion superoxyde, les radicaux hydroxyles et l'oxygène singulet (Poojary et al., 2015).

Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le $DPPH^{\bullet}$ dépend de la conformation structurale de l'antioxydant. Quelques composés se réagissent très vite avec le $DPPH^{\bullet}$ en réduisant un nombre de molécules de $DPPH^{\bullet}$ égal à celui des groupements hydroxyles de l'antioxydant. L'effet scavenger des flavonoïdes sur les radicaux libres dépend de la présence des groupements OH libres, en particulier 3-OH, avec une configuration 3',4'-rthodihydroxy (Heim et al., 2002).

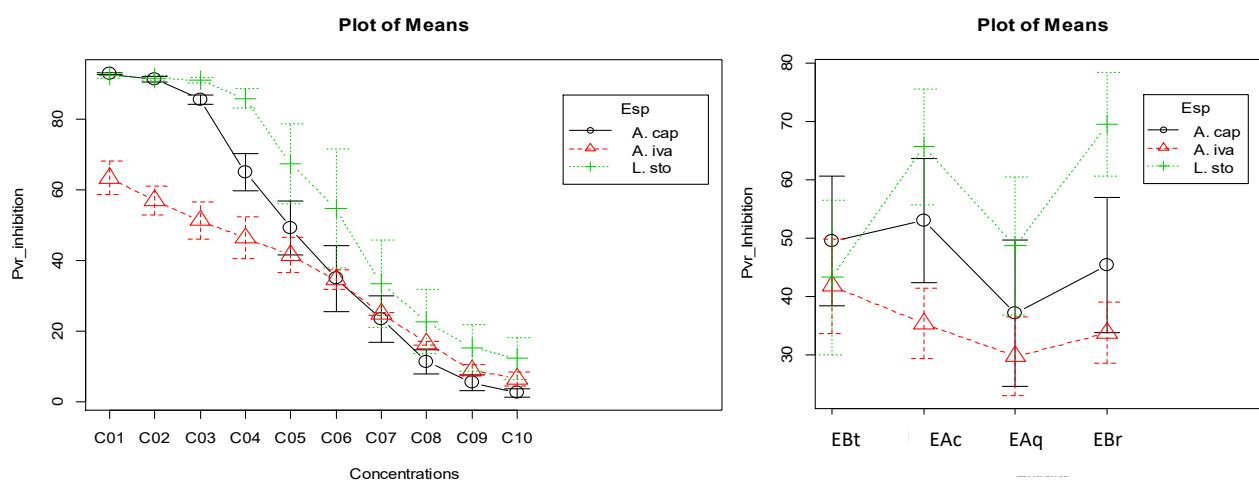


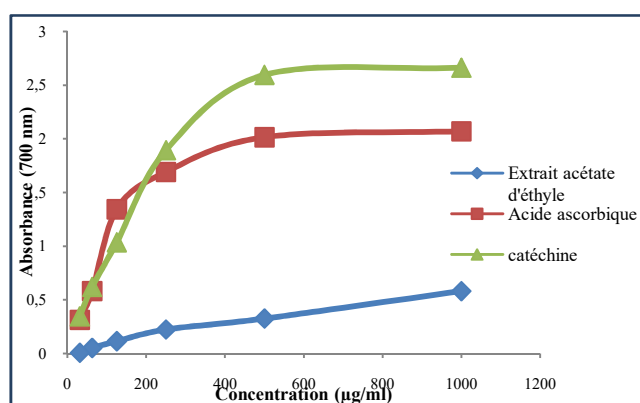
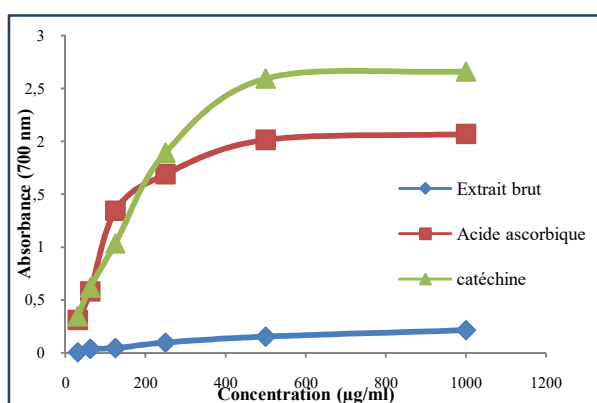
Figure 69 : Box-plot des extraits et des espèces

4.2. Réduction du fer : FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

La puissance de réduction est l'un des mécanismes antioxydants. La présence des réducteurs dans un milieu donné cause la réduction du complexe Fe^{3+} ferrocyanide à la forme Fe^{2+} . En effet, la formation de Fe^{2+} peut être suivie par spectrophotométrie en mesurant la densité de la couleur bleu du complexe ferreux du milieu réactionnel à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance signifie une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Ozturk et al., 2007).

Ajuga iva

Nous remarquons que toutes les fractions ont présenté une très faible activité pour réduire le fer, observées par des valeurs de densité optique qui ne dépassent pas 0,5, alors que l'acide ascorbique et la catéchine fournissent une DO de 2.069 ± 0.03 et 2.66 ± 0.016 à la même concentration (1000 $\mu\text{g/ml}$) (figure 70). L'extrait d'acétate d'éthyle a fait preuve d'un pouvoir réducteur plus puissant ($\text{EC}_{50} = 780.16 \pm 1.56 \mu\text{g/ml}$) que les autres extraits. Cependant, le pouvoir réducteur de l'acide ascorbique ($\text{EC}_{50} = 49.09 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$) et de la catéchine ($\text{EC}_{50} = 46.82 \pm 1.01 \mu\text{g/mL}$) était plus prononcé que celle des différents extraits d'*Ajuga iva*. L'extrait brut, butanolique et aqueux ont présenté une activité antioxydante faible (tableau 17).



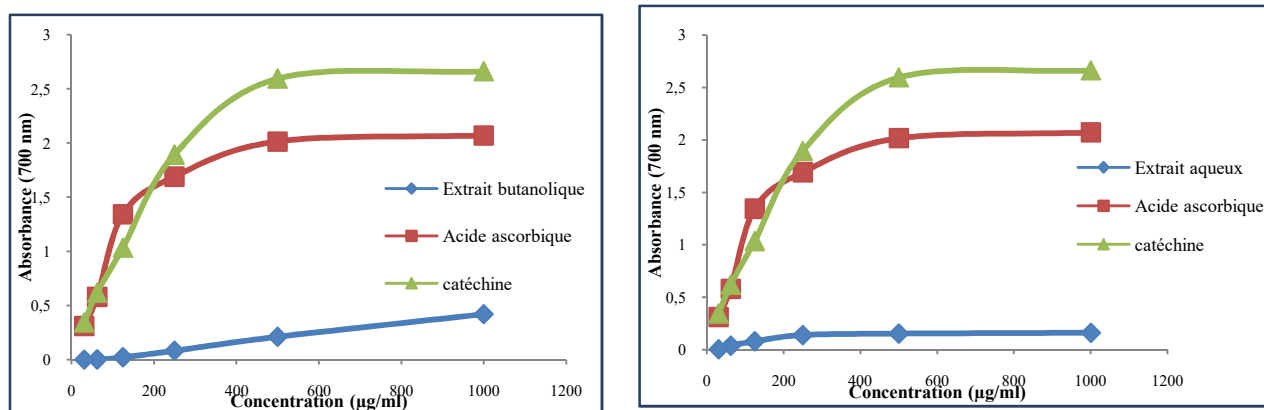


Figure 70 : Pouvoir réducteur des flavonoïdes d'*Ajuga iva* testé par la méthode FRAP

Baghiani et *al.* (2011) ont trouvé que les extraits d'*Ajuga iva* donnent un pouvoir réducteur supérieur aux standards. Conformément à nos résultats, les travaux réalisés par Senhaji et *al.* (2020) signalent que Les extraits aqueux avaient le pouvoir réducteur le plus faible et le pouvoir antioxydant le plus élevé a été observé pour les extraits méthanoliques.

Adiantum capilus-veneris

Nous constatons que toutes les fractions à l'exception de l'extrait aqueux ont présenté des activités considérables vis-à-vis la réduction du fer (figure 71). En effet, la fraction acétate d'éthyle a présenté un pouvoir très proche à celui de l'acide ascorbique avec une densité optique nettement élevée (2.44 ± 0.04 à la concentration de 1000 µg/ml) et une EC_{50} importantes (55.85 µg/ml). Alors que l'extrait brut et butanolique ont fait l'exception par des EC_{50} modérés (225.5 µg/ml, 243.5 µg/ml respectivement). L'extrait aqueux présente le pouvoir réducteur le plus faible avec une EC_{50} égale à 570 µg/ml (tableau 17).

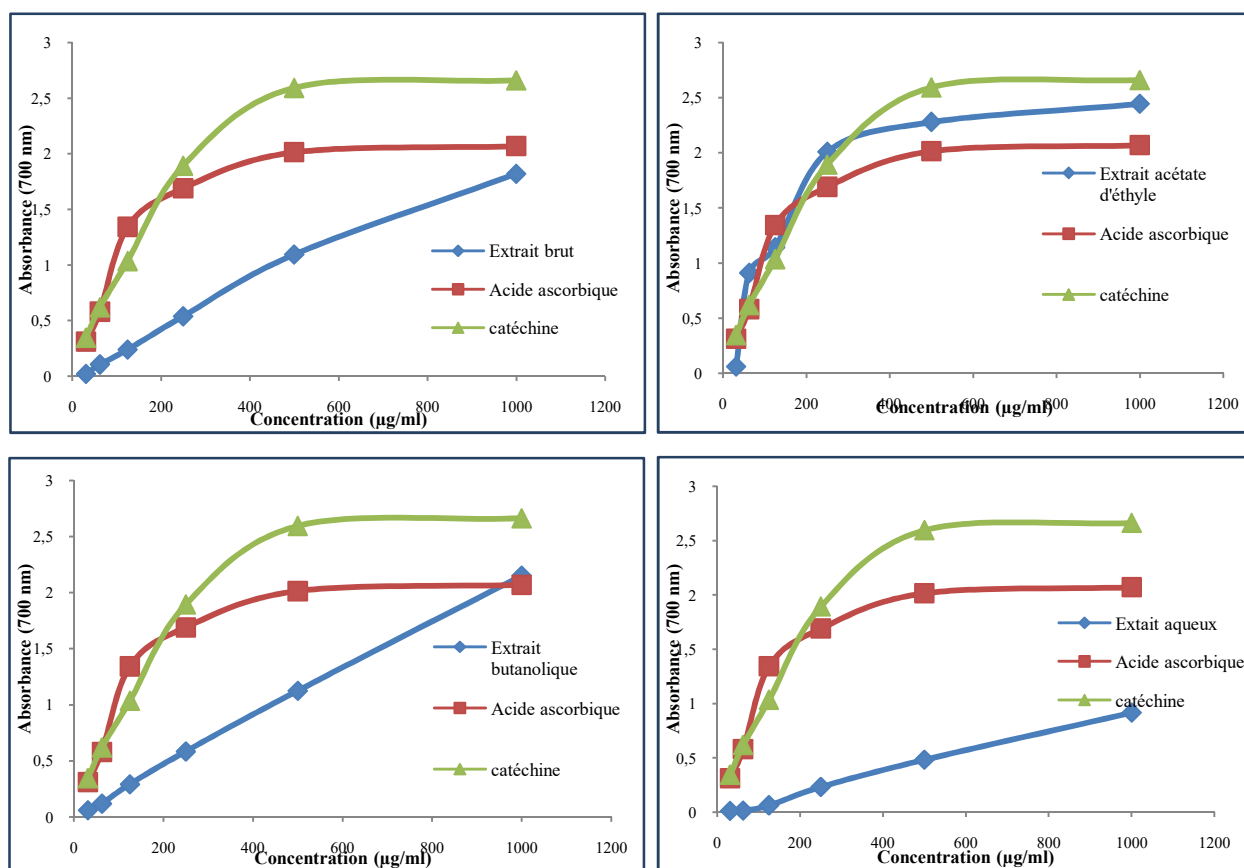


Figure 71 : Pouvoir réducteur des flavonoïdes d'*Adiantum capillus-veneris* testé par la méthode FRAP

Lavandula stoechas

D'après les résultats présentés sur les graphes de la figure 72 et le tableau 17, on note que la phase acétate d'éthyle présente le plus d'activité pour réduire le fer par rapport aux autres fractions avec une EC_{50} moyenne (84.09 µg/ml). En effet l'extrait butanolique et l'extrait hydrométhanolique ont présenté un pouvoir réducteur faible. L'extrait aqueux présente une capacité antioxydante très basse et qui n'a pas dépassé 0.08 à la concentration de 1000 µg/ml. Néanmoins, le pouvoir réducteur de l'acide ascorbique et de la catéchine était comparativement plus élevé que celui des extraits. Nos résultats sont comparables à ceux de Menaceur & Hazzit (2014) qui indiquent qu'à la concentration de 100 µg/ml l'absorbance de l'extrait éthanolique était 0.739 ± 0.035 , alors que l'absorbance de l'extrait méthanolique à la concentration de 125 µg/ml était 0.67 ± 0.008 dans notre étude.

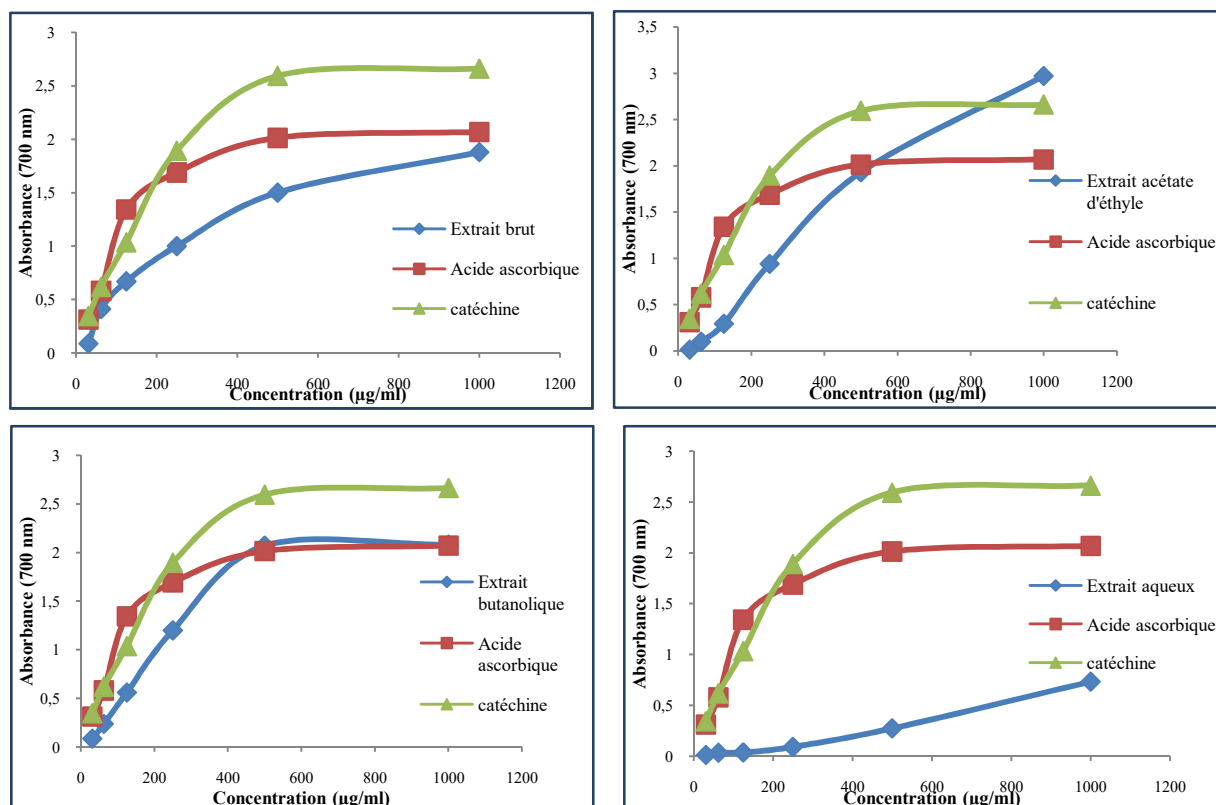


Figure 72 : Pouvoir réducteur des flavonoïdes de *Lavandula stoechas* testé par la méthode FRAP

Tableau 17 : valeurs des EC₅₀ (µg/ml) trouvés pour les différents extraits des trois plantes étudiées

	EBr	EAc	EBt	EAq
<i>Ajuga iva</i>	2352	780.16	1173.52	4531.83
<i>Adiantum capillus-veneris</i>	225.5	55.85	243.5	570
<i>Lavandula stoechas</i>	84.09	164.66	123.25	710.19
Acide ascorbique	49.09			
Catéchine	46.82			

L'analyse de variance révèle une différence nettement significative entre les extraits. La différence entre les espèces est très nette entre *L. stoechas* et *A. iva* et entre *A. capillus-veneris* et *A.iva*. La boîte de moustache montre que les extraits présentaient une activité dose dépendante et *Ajuga iva* présente le pouviur réducteur le plus efficace. Le Box-plot des extraits révèle que l'orde des fractions, du plus puissant au moins puissant, était EAc>EBr>EBt>EAq (figure 73).

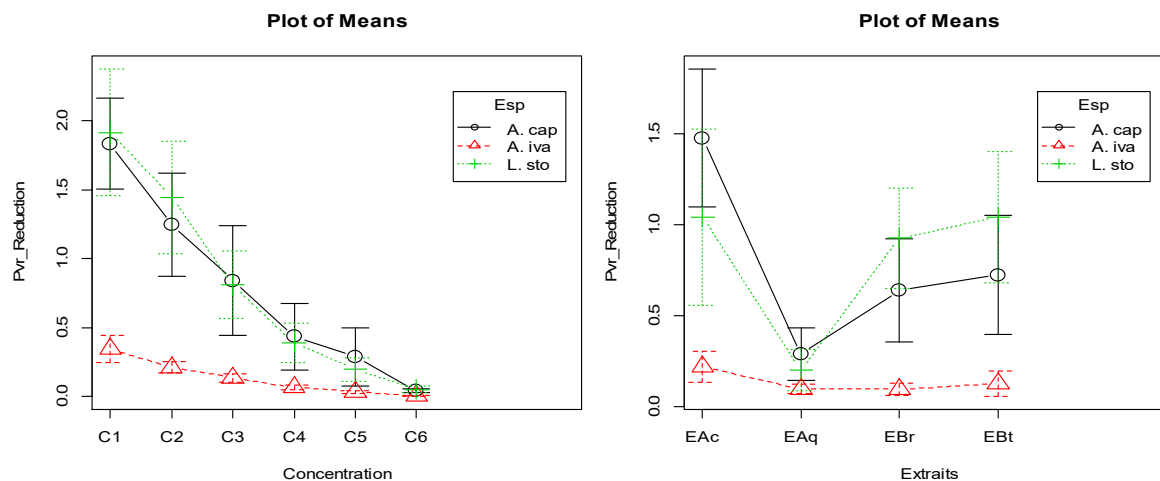


Figure 73 : Box-plot des extraits et des espèces

Une recherche sur la capacité de réduction du fer des polyphénols végétaux a démontré que l'anneau catéchol est la seule structure qui est directement associée au pouvoir réducteur. Selon cette étude, cette structure augmente le pouvoir réducteur d'un composé de 36% par rapport à un composé qui ne la contient pas. Ils ont proposé que cette activité soit due à la participation des groupes -OH liés à l'anneau de catéchol.

L'oxydation initiale du catéchol par Fe^{3+} conduit à la génération de Fe^{2+} et d'une structure semi-quinonique. La semi-quinone peut réagir avec l' O_2 dissous dans le mélange réactionnel avec une libération ultérieure d'ions superoxyde. L'ion superoxyde peut également réduire l'ion Fe^{3+} . Ainsi, l'oxydation de 2 groupes -OH peut entraîner la réduction de 2 ions Fe^{3+} .

L'activité des groupes -OH dans le catéchol peut être modulée par une variété de substituants sur le cycle aromatique. Une substitution sur le cycle phénolique d'un groupe donneur d'électrons (-CH₃, -CH₂-CH₃, ou autre substituant aliphatique), permettra de promouvoir des réactions dans lesquelles les cycles phénoliques acquièrent une tendance à donner des électrons via un groupe -OH, et finalement d'augmenter leur capacité à réagir comme réducteurs.

Par ailleurs, la double liaison du substituant aliphatique conjugué au cycle aromatique diminue la réactivité du groupe -OH (Degraft-Johnson et *al.*, 2007).

4.3. Peroxydation lipidique

la méthode de peroxydation lipidique permet d'évaluer le pouvoir antiperoxydation lipidique en provoquant une cascade de réactions d'oxydation et en essayant de les bloquer ou de neutraliser la présence des radicaux libres.

Ajuga iva

L'activité la plus forte a été présentée par la fraction acétate d'éthyle ($IC_{50} = 419.63 \pm 1.71 \mu\text{g/ml}$) tandis que la fraction butanolique affiche une bonne puissance d'antiperoxydation des lipides ($507.88 \pm 0.47 \mu\text{g/mL}$) et le pouvoir le plus faible a été démontré par l'extrait brut et aqueux ($1569.85 \pm 2.38 \mu\text{g/ml}$, $2231.83 \pm 2.53 \mu\text{g/ml}$ respectivement) (tableau 18). Les valeurs obtenues dans notre étude sont inférieures aux données rapportées par Taleb-Senouci et *al.* (2009), lors de l'étude de l'extrait aqueux de l'*Ajuga iva* tunisienne où les pourcentages d'antiperoxydation lipidique les valeurs IC_{50} sont très proches

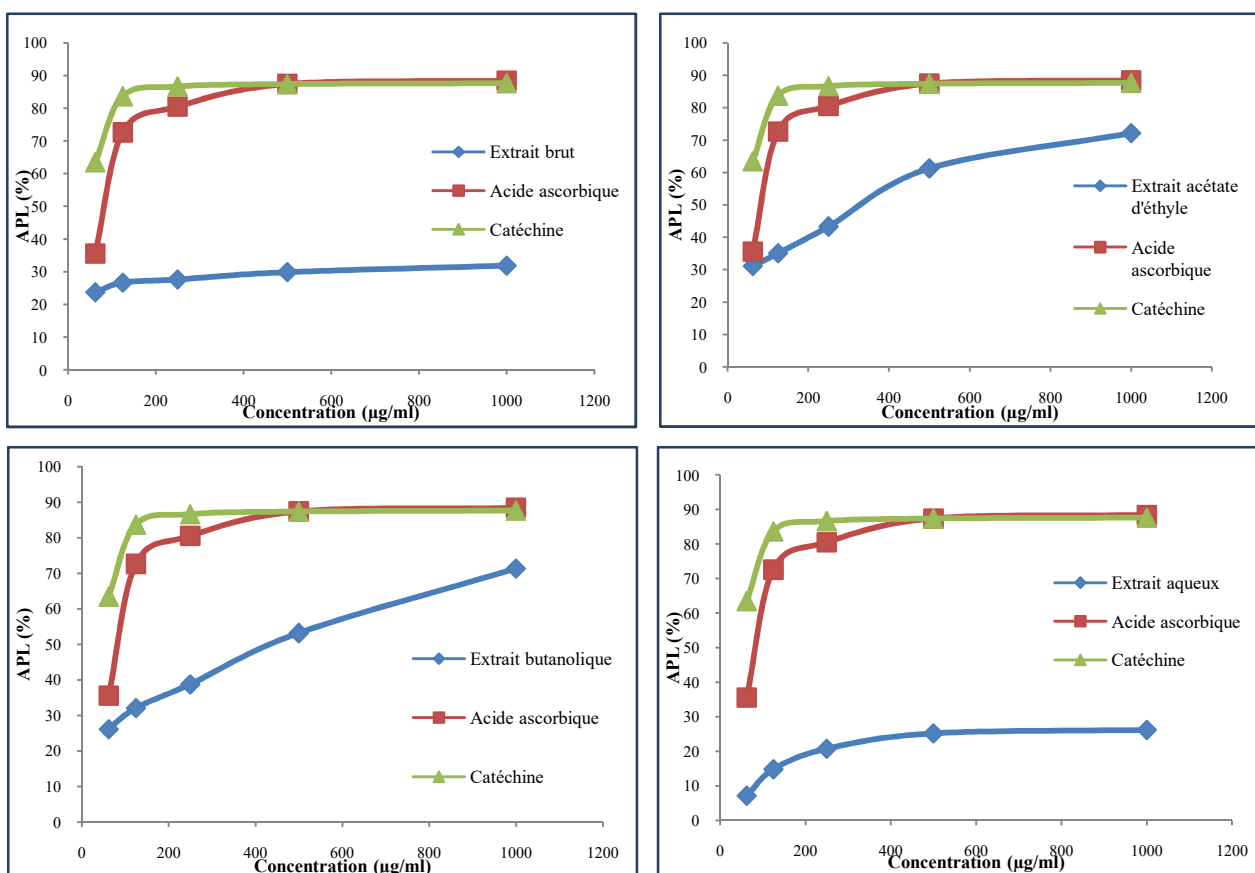


Figure 74 : Pouvoir antioxydant des flavonoïdes d'*Ajuga iva* testé par la méthode de peroxydation lipidique

Adiantum capillus veneris

En comparant la EC_{50} des différentes fractions par rapport à l'acide ascorbique et la catéchine ($EC_{50} = 208.85 \pm 1.55 \mu\text{g/ml}$, $49.25 \pm 1.02 \mu\text{g/ml}$ respectivement), nous avons remarqué une activité antioxydante très élevée de la fraction acétate d'éthyle ($EC_{50} = 3.49 \mu\text{g/ml}$) et la fraction butanolique ($EC_{50} = 30,45 \mu\text{g/mL}$) (tableau 18). Ce pouvoir antioxydant est supérieur à ceux des standards.

Conformément à la capacité antioxydante des extraits dans notre étude, le travail réalisé par Rabiei & Setorki (2019) a montré que l'extrait ethanologique d'*A.capillus-veneris* a réduit les niveaux de MDA et augmenté les niveaux d'antioxydants du sérum et du cerveau chez le rat.

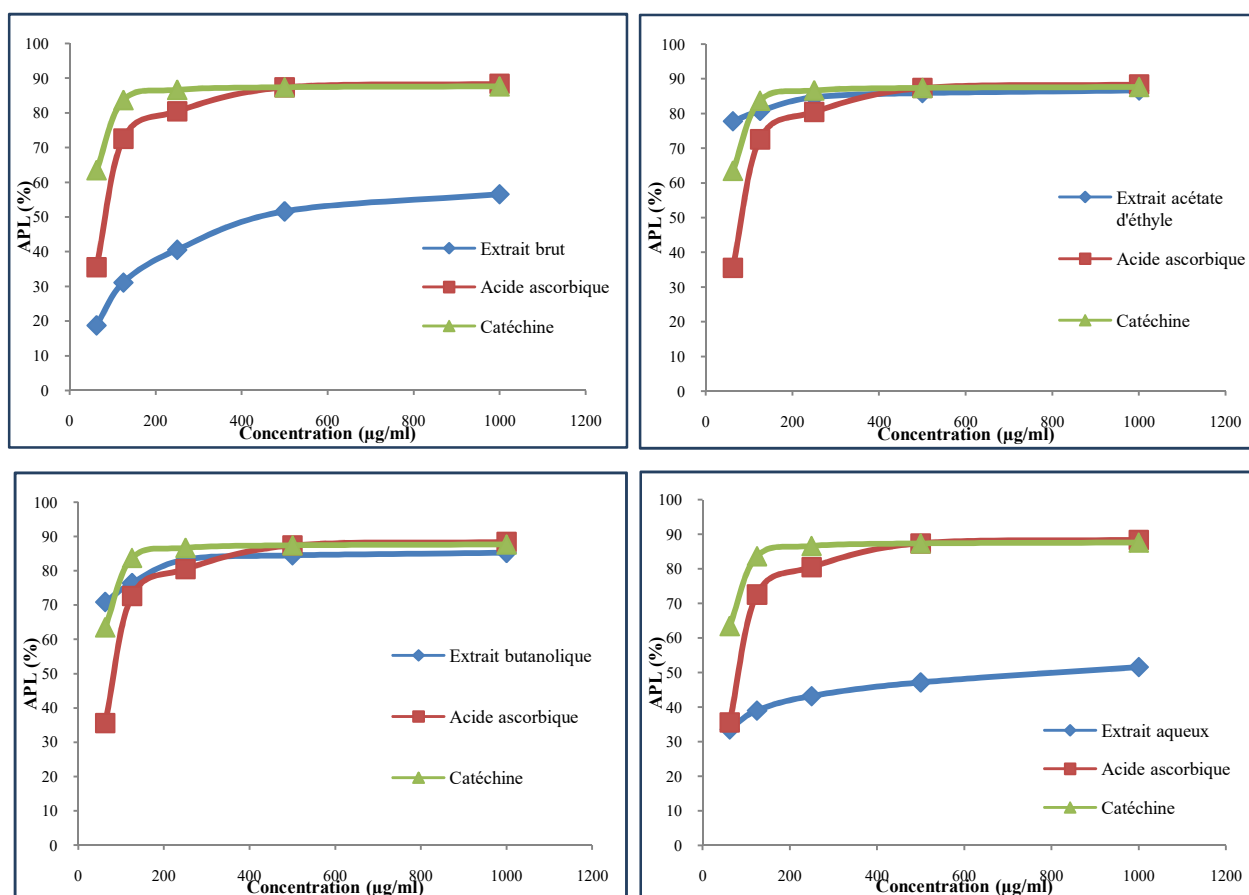


Figure 75 : Pouvoir antioxydant des flavonoïdes d'*Adiantum capillus-veneris* testé par la méthode de peroxydation lipidique

Lavandula stoechas

L'extrait acétate d'éthyle et l'extrait butanolique se sont avérés les très efficaces dans l'inhibition de la formation de MDA (IC₅₀= 4.79±0.31, 40.02 µg/ml respectivement) et possède une capacité d'antipéroxydation lipidique plus importante que celles de la catéchine et de l'acide ascorbique (tableau 18). Un faible pouvoir antioxydant est noté pour l'extrait brut et l'extrait aqueux (figure 76).

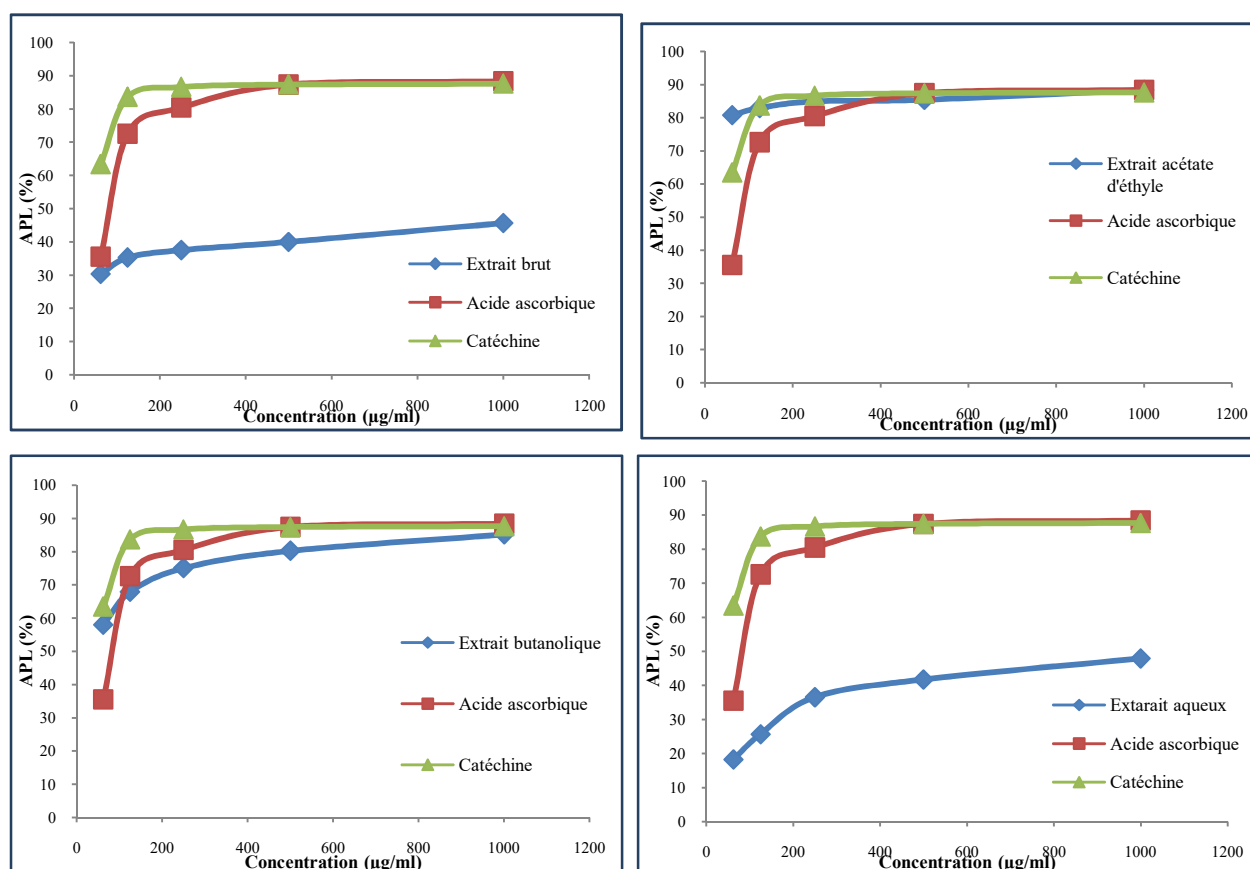


Figure 76 : Pouvoir antioxydant des flavonoïdes de *Lavandula stoechas* testé par la méthode de peroxydation lipidique

Tableau 18 : Valeurs des EC₅₀ (µg/ml) trouvés pour les différents extraits des trois plantes étudiées

	EBr	EAc	EBt	EAq
<i>Ajuga iva</i>	1569.85	419.63	507.88	2231.83
<i>Adiantum capillus-veneris</i>	457.08	3.49	30.45	765
<i>Lavandula stoechas</i>	1533.11	4.79	40,02	1200.9
Acide ascorbique	208.85			
Catéchine	49.25			

Le pourcentage d'antiperoxydation lipidique des extraits augmente avec la concentration (figure 77) et la différence est nettement significative, cela correspond à une probabilité d'erreur inférieure à 5 %. Sinon, la différence entre les espèces est très nette entre *L. stoechas* et *A. iva* et entre *A. capillus-veneris* et *A.iva*. Le Box-plot des espèces montre que *A. capillus-veneris* est la plante qui présente le pouvoir d'antiperoxydation lipidique le plus important. La boîte de moustache révèle que l'EAc enregistre l'activité antioxydante la plus puissante suivie par l'EBt et l'EBr et enfin l'EAq.

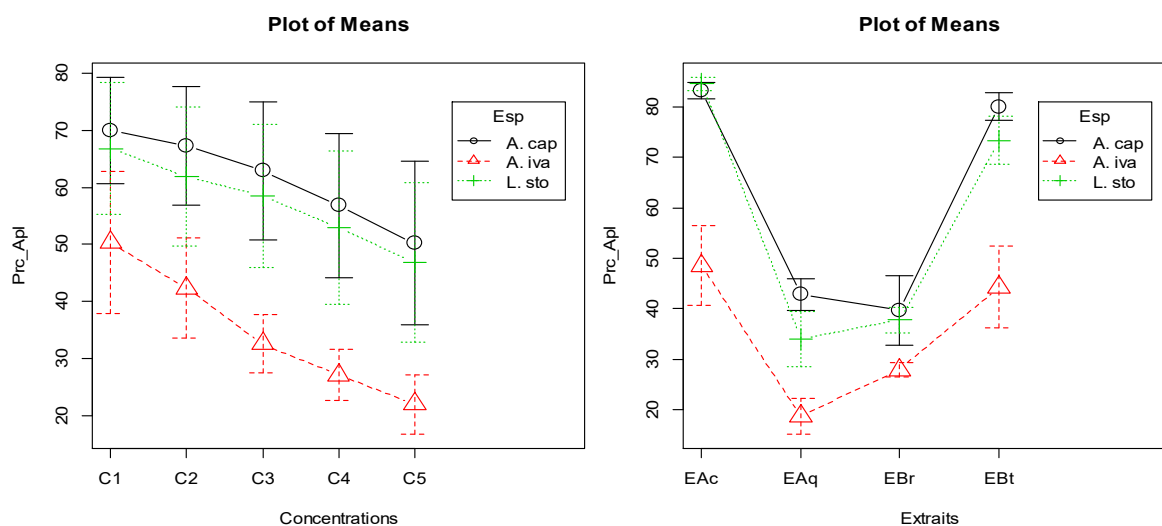


Figure 77 : Box-plot des extraits et des espèces

Les phases butanoliques et acétate d'éthyle présentent une capacité d'antipéroxydation lipidique proches de celles des standards avec un pourcentage plus que 80 % à la concentration de 1000 µg/ml. Ces phases sont effectives dans l'inhibition de la peroxydation lipidique induite par le système ascorbate Fe^{2+} dans l'homogénat des rats. La génération de malondialdéhyde (MDA) et substances relatives qui réagissent avec l'acide thiobabaturique sont inhibées par les extraits (Tatyia & Saluja, 2010). Cela indique l'activité significative de l'inhibition de la peroxydation lipidique des extraits.

Selon Ratty & Das (1988), les flavonoïdes aglycones étaient plus puissants dans leur capacité d'anti-peroxydation des lipides que les flavonoïdes glycosides. L'analyse structure-activité a démontré que la molécule de flavonoïde avec des substitutions polyhydroxylées sur les anneaux A et B, une double liaison 2,3, une substitution 3-hydroxyle libre et une fraction 4-céto, conférerait au composé un puissant effet anti-peroxydation lipidique.

4.4. Analyse de corrélation

Les composés phénoliques et les flavonoïdes représentent les principaux groupes de constituants végétaux qui agissent principalement comme de puissants antioxydants ou piègeurs de radicaux libres. Ils jouent un rôle bénéfique dans la santé humaine et permettent de remédier ou de prévenir des pathologies telles que les troubles inflammatoires, les maladies cardiovasculaires, le cancer et le diabète, qui sont dus à la perturbation de la production de radicaux libres dans les cellules (Chouhan & Singh, 2011).

Il y avait deux opinions sur la corrélation entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante. Certains rapports ont démontré une corrélation positive entre eux (Xie et al., 2017) et d'autres n'ont montré aucune corrélation (Merghem & Dahamna, 2020). Nos résultats sont en accord avec ces derniers. Il semble qu'il n'existe aucune corrélation entre le pourcentage d'inhibition mesuré par le DPPH et le contenu en phénols totaux avec un coefficient de corrélation de 0.23 et le contenu en flavonoïdes avec un coefficient de corrélation égale à 0.22. De même, une corrélation négative entre l'activité antioxydante mesurée par la capacité de chélation des ions ferreux et la teneur en polyphénols ($r = 0.22$) et en flavonoïdes ($r = 0.21$) ou entre l'activité antioxydante mesurée par la méthode de peroxydation lipidique et la concentration en phénols totaux ($r = 0.47$) et en flavonoïdes ($r = 0.37$) (tableau 21).

Ce phénomène peut être expliqué par l'activité antioxydante élevée de certaines unités phénoliques individuelles, qui peuvent agir comme des antioxydants efficaces plutôt que de contribuer à un taux élevé de composés phénoliques totaux, alors que, la teneur totale en composés phénoliques ne comprend pas tous les antioxydants, tels que l'acide ascorbique, les caroténoïdes et le tocophérol (Kaur & Kapoor, 2002).

Vinson et *al.* (2001) ont considéré que la synergie entre les antioxydants du mélange rendait l'activité antioxydante non seulement dépendante de la concentration de l'antioxydant, mais aussi de la structure et de l'interaction entre les antioxydants. C'est probablement la raison pour laquelle des échantillons ayant des concentrations similaires en composés phénoliques totaux peuvent varier remarquablement dans leur activité antioxydante.

Entre les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante, l'analyse de corrélation montre une corrélation élevée entre la méthode de piégeage des radicaux par le DPPH et la méthode de réduction du fer ($r = 0.74$), une corrélation moyenne entre la méthode de peroxydation lipidique et la méthode au DPPH ($r = 0.512$), tandis que la FRAP présentait une corrélation bonne avec le DPPH ($r = 0.631$)

Conformément à nos résultats, Mraïhi et *al.* (2013) ont trouvé des corrélations positives entre l'activité antioxydante déterminée à l'aide des tests FRAP et DPPH. Encore une fois, La corrélation entre les résultats des tests DPPH et FRAP pour les extraits de plantes concorde avec les travaux de Tai et *al.* (2011) et est en accord avec la théorie selon laquelle les deux tests partagent une base mécanistique similaire, à savoir le transfert d'électrons de l'antioxydant pour réduire un oxydant, comme proposé par Huang et *al.* (2005).

Un certain nombre d'articles ont rapporté les résultats des tests DPPH, FRAP et APL sur des extraits de plantes, en pensant vraisemblablement que l'utilisation de différents tests améliore l'estimation globale de la capacité antioxydante des extraits de plantes, et que chaque test reflète un aspect différent du comportement antioxydant d'un extrait de plante (Xu et *al.*, 2011). Cependant, les résultats de l'étude actuelle suggèrent un haut degré de redondance dans l'utilisation des trois tests pour cribler les extraits de plantes.

La corrélation modérée observée entre le test APL et les tests à DPPH et FRAP des extraits peut probablement être due à la dégradation rapide et étendue des principes

antioxydants dans un état *ex vivo*, corroborant ainsi les résultats observés dans une étude réalisée en Australie avec un groupe de volontaires humains (Recard *et al.*, 2000)

Dans ces circonstances, il faut décider quel test utiliser pour le screening de l'activité antioxydante, afin de réduire l'utilisation d'extraits de plantes potentiellement précieux. Dans le travail rapporté ici, deux problèmes ont été recensés dans l'utilisation du test FRAP : interférence causée par la couleur dans certains extraits, et le développement lent de la couleur. Le premier cas est probablement dû au pH acide dans lequel le test FRAP a été effectué, et a été beaucoup moins problématique avec le test DPPH. Le processus de développement de la couleur a été signalé dans d'autres études (Halvorsen & Blomhoff, 2011) et a été considéré comme indiquant l'implication de plusieurs antioxydants dans la réponse observée, chacun agissant dans des conditions cinétiques différentes. Bien que des problèmes similaires aient été signalés pour le test DPPH, cela n'a pas semblé un problème majeur dans les études rapportées ici ou dans des études ultérieures avec d'autres extraits de plantes (Clarke *et al.*, 2013).

Des questions doivent être soulevées concernant l'utilisation du DPPH dans le dépistage des antioxydants et la quantification de l'extinction des radicaux dans les extraits naturels. Dans notre étude et conformément à d'autres travaux (Xie & Schaich, 2014 ; Schaich *et al.*, 2015), la réaction principale est terminée en 10 secondes. Des temps de réaction longs pour permettre une "réaction complète" ne font que compter les groupes phénoliques, surestiment les polyphénols et sous-estiment les petits phénols, et ne sont pas pertinents pour les réactions radicalaires rapides (Schaich *et al.*, 2015).

Concernant le test d'anti peroxydation lipidique, Il est connu que le radical - OH qui initie la peroxydation lipidique est un radical difficile à étudier par les méthodes conventionnelles (Sangameswaran *et al.*, 2009). Un autre problème de ce test est que les ions métalliques, ajoutés peuvent influencer non seulement la peroxydation dans le milieu d'incubation, mais aussi la décomposition du peroxyde pendant le test lui-même. Le type et la concentration de l'acide ajouté avec le TBA influencent également la vitesse de décomposition du peroxyde et donc la quantité de substance réactive au TBA formée (Gutteridge & Halliwell, 1990).

Un certain nombre d'essais chimiques ont été mis au point pour mesurer la capacité de piégeage des radicaux. Ces méthodes varient en termes de mécanisme antioxydant, de type de

substrat, d'initiateur d'oxydation, d'expression des résultats et de facilité d'utilisation. Le choix d'une méthode appropriée ou d'une combinaison de méthodes est important pour une évaluation valide de l'activité antioxydante et, en fin de compte, du potentiel de l'antioxydant comme agent de conservation des aliments ou agent de promotion de la santé.

Tableau 19: Coefficients de corrélation (r) de l'activité antioxydante

	DPPH	FRAP	APL	TPC	TFC
DPPH	1				
FRAP	0,74	1			
APL	0,512	0,631	1		
TPC	0,234	0,223	0,474	1	
TFC	0,225	0,216	0,370	0,68	1

5. Résultats de l'activité antibactérienne

5.1. Test préliminaire

Si les extraits doivent être soumis aux essais biologiques, la toxicité du solvant peut également être critique car même en trace, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique. L'attention devrait également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et les corps dissous pendant que le solvant peut réagir avec certains composés pour produire des complexes ou pour causer la décomposition, la déshydratation, ou l'isomérisation de ces composés (Yrjönen, 2004).

Le test préliminaire avec le DMSO à différentes concentrations a été réalisé dans le but de choisir la concentration qui ne présente aucun effet sur la croissance normale des souches bactériennes.

Nous avons constaté que le DMSO à différentes concentrations ne présente aucun effet sur la culture des souches, ces résultats sont confirmés par plusieurs études (Akomo et *al.*, 2009 ; Kandiah et *al.*, 2010). Donc le DMSO pur a été sélectionné vue les résultats satisfaisants du test préliminaire avec ce dernier.

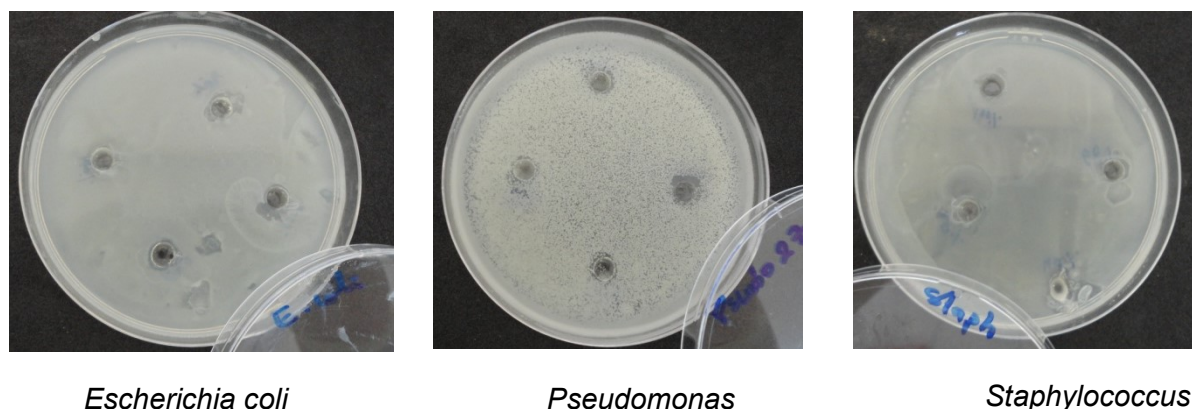
*Escherichia coli**Pseudomonas**Staphylococcus*

Figure 56 : Photos montrant l'effet de DMSO (100%, 50%, 25%, 12,5%) sur la culture de trois souches bactériennes

5.2. AntibioGramme

L'activité antibactérienne de certains antibiotiques est évaluée contre les souches bactériennes. Les résultats des tests de sensibilité ont démontré une résistance des bactéries Gram positifs à l'ampicilline et des bactéries à Gram négatifs à l'amoxicilline et l'ampicilline. Les résultats de l'expérience ont également montré une résistance remarquable de *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* en présence de tous les antibiotiques testés. Cependant, *E. coli*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *C. freundii* et *S. typhimurium* se révélaient très sensibles aux antibiotiques testés. Si l'on considère l'ensemble de ces résultats, il ressort que parmi les antibiotiques les plus actifs, on retrouve tout d'abord la spiramycine qui agit sur toutes les souches (exception faite pour *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*), puis la gentamycine, ensuite la tétracycline et l'érythromycine (tableau 22).

En parallèle *V. cholerae* était sensible seulement à la tétracycline et la gentamycine (18.5 mm, 13 mm respectivement). *L. monocytogenes* est sensible seulement à la spiramycine et la gentamycine (15 mm, 6 mm respectivement) (tableau 22).

Tableau 20 : Résultats de l'antibiogramme des souches bactériennes testées

	E (15 UI)	GM (10 UI)	TE (30 µg)	SP (100 µg)	AMX (25 µg)	AM (10 µg)
<i>A. bumanii</i>	11	18	10	19	0.00	2
<i>V. cholerae</i>	0.00	13	18.5	5,5	0.00	0.00
<i>P. mirabilis</i>	8	10	12	15	0.00	0.00
<i>K. pneumoniae</i>	0.00	0.00	0.00	2,5	0.00	0.00
<i>S. aureus</i>	10	18	12	20	0.00	3
<i>P. aeruginosa</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>E. coli</i>	10	14	10	18	4	5
<i>B. cereus</i>	0.00	6	0.00	9	0.00	0.00
<i>S. pneumoniae</i>	20	25	23	25	5	4
<i>S. typhimurium</i>	0.00	10	4,5	17	5	0.00
<i>L. monocytogenes</i>	0.00	6	0.00	15	0.00	0.00
<i>C. frendii</i>	5	11	5	18	7	5

E : Érythromycine, GM : Gentamycine, TE : Tétracycline, SP : Spiromycine, AMX : Amoxicilline, AM : Ampicilline

5.3. Activité antibactérienne des extraits flavoniques

On note ici que la méthode utilisée est celle de Vincent (Akomo et *al.*, 2009), que le disque déposé à la surface du milieu gélosé est chargé d'extrait naturel. Les zones d'inhibitions des différentes souches avec les différents extraits sont résumées dans les tableaux 21, 22, 23. Dans un deuxième temps, nous avons déterminés le pouvoir antibactérien par la méthode de microdilution pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI). Pour cela, nous avons sélectionné les extraits possédant une forte capacité antibactérienne, pour lesquelles nous avons déterminé les concentrations minimales bactéricides (CMB).

Ajuga iva

Nos résultats indiquent une activité antibactérienne puissante de l'extrait acétate d'éthyle et butanolique. Comme il est résumé dans le tableau 21, les zones d'inhibition des extraits d'*Ajuga iva*, étaient dans la fourchette de 02 ± 0.3 à 28 ± 1.8 mm. En revanche, l'activité

inhibitrice la plus élevée a été déterminée contre *S. pneumoniae* (CMI = 0.62 mg/ml, CMB = 1.25 mg/ml). D'autre part, l'activité inhibitrice la plus faible a été déterminée à l'encontre de *V. cholerae* (CMI = 10 mg/ml, CMB >10 mg/ml).

Makni et al. (2013) ont évalué l'activité antibactérienne des extraits des feuilles d'*Ajuga iva* obtenus avec différentes polarités de solvant vis-à-vis *Bacillus cereus* et *Echerichia coli*. Les résultats ont donné des diamètres d'inhibition allant de 15 à 27 mm respectivement. Ce pouvoir antibactérien est plus élevé à notre recherche (7±0.3 mm, 18±0.5 mm) Khaled-Khodja et al. (2014) ont décrit des activités modérées et beaucoup moins faibles à nos valeurs quand ils ont étudiés des extraits d'*A. iva* de Bejaia contre *E. coli* et *S. aureus* (CMI= 17.1 mg/ml, CMB > 50 mg/ml)

Les travaux de Medjeldi et al. (2018), sur *A. iva* issu de Bel-Abbas ont démontré que *L. monocytogenes* est faiblement inhibé, présentant un diamètre d'inhibition de 14 mm (625 < CMI < 1250 µg/disk).

La tolérance des souches de *Pseudomonas aeruginosa* aux extraits testés n'est pas surprenante. De fait, cette bactérie présente une résistance aux biocides qui est liée à la nature de sa membrane externe (Mann et al. 2000). Les résultats relatifs à cette résistance obtenus dans notre présent travail viennent confirmer plusieurs autres études (Mouheb et al., 2018 ; Makni et al., 2013).

D'autres bactéries pathogènes ont été testées pour évaluer qualitativement et quantitativement l'activité antibactérienne des extraits *A. iva*. L'activité antibactérienne contre *Salmonella spp*, bactérie à Gram-négatif était plus faible mais encore considérable, avec des diamètres de zone d'inhibition de 88 ± 1.23 mm (Mouheb et al., 2018).

La puissante activité antimicrobienne de l'*A. iva* a été attribuée à l'effet synergique de tous les composants chimiques présents dans les extraits. Les flavonoïdes caractérisés peuvent être à l'origine de la puissante activité antimicrobienne d'*A. iva*. Ces composés ont interféré avec la croissance microbienne à différents niveaux. Certains flavonoïdes forment des complexes avec les protéines extra et intra cellulaires. Ces complexes affectent la perméabilisation des membranes microbiennes (Xu et al., 2008) et perturbent la structure de leurs différentes couches de polysaccharides, d'acides gras et de phospholipides (Bouyahya et al., 2017).

L'apégénine et la naringénine, molécules principales dans les extraits d'*A.iva* ont un important effet antibactérien. Xie et al. (2017), ont été résumés que deux substituants hydroxyle sur C-5 et C-7 du cycle A de la de la naringénine conduisent à ses activités antibactériennes. De plus, il a été constaté que la saturation de la double liaison C2=C3 dans la naringénine augmentait l'activité antibactérienne. Récemment, une formulation liposomale d'apigénine a été examinée, et il a été observé que l'interaction des liposomes d'apigénine avec la membrane des bactéries testées a entraîné la lyse des cellules bactériennes (Banerjee et al., 2015). Das et al. (2016) ont signalé que l'apégénine réduit l'hydrophobie de la surface cellulaire et la perméabilité de la membrane.

Les activités antibactériennes prometteuses d'*A.iva* ont mis en évidence que certains composés pourraient être développés pour devenir des médicaments antimicrobiens commercialisés.

Adiantum capillus-veneris

D'après nos résultats (tableau 22), les souches bactériennes ont présenté une forte résistance à l'extrait aqueux où aucune zone d'inhibition n'a été observée. L'extrait brut a révélé des faibles zones d'inhibitions contre *E. coli*, *S. pneumoniae* et *S. aureus* (10 ± 0.9 , 9 ± 1.1 , 6 ± 1.7 respectivement). On note que nos extraits sont sans efficacité antimicrobienne vis-à-vis *P. aeruginosa* et *B. cereus*. Nos résultats ont confirmé les travaux pareils de Besharat et al., (2009), Ce groupe de recherche montre que l'extrait éthanolique des parties aériennes d'*A. capillus-veneris* n'a pas de capacités antimicrobiennes contre *Pseudomonas aeruginosa*.

Les résultats de cette étude ont révélé que l'extrait acétate d'éthyle est plus actif par rapport à l'extrait butanolique. *S. pneumonia* est la plus sensible avec une zone d'inhibition atteignant 27 ± 2.1 mm et une faible CMI et CMB (1.25 mg/ml, 2.5 mg/ml respectivement).

Nos résultats ont confirmé une inefficacité des extraits d'*A. capillus-veneris* contre *V. cholerae* et une efficacité modérée sur *S. typhimurium*. Cependant, l'étude réalisée par Medrar et al. (2014) montre que l'extrait méthanolique des feuilles d'*A. capillus-veneris* présente une zone d'inhibition maximale contre *Vibrio cholera* et *Salmonella typhi* à une concentration de 20 mg/ml.

Notre étude s'est avérée être en accord avec les résultats de Kumar & Nagarajan (2012) et Mahboubi et al. (2012) en Inde et en Iran respectivement. Ces études sur l'*Adiantum*

capillus-veneris révèlent sa puissance contre *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*.

De même, nos extraits étaient actifs contre *A. bumanii*, *P. mirabilis*, *C. frendii*, *L. monocytogenes* avec des CMI entre 2.5 et 5 mg/ml, qui sont presque toute en accord avec les études de Pradeep et *al.*, (2010) et Singh et *al.* (2008).

De nombreuses études ont montré l'efficacité *in vitro* des extraits d'*Adiantum capillus-veneris* (Besharat et *al.*, 2009 ; Mahboubi et *al.*, 2012) mais les résultats étaient différents d'une étude à une autre selon le choix des souches testés, la méthode d'extraction des flavonoides et la méthode utilisée.

L'efficacité des extraits d'*A. capillus-veneris* est probablement du à la quercétine 3-O-glucoside, le composant majeur dans les fractions. Selon la littérature, on pense que le mécanisme d'action de l'activité antibactérienne de la quercétine est dû à l'inhibition des β ketoacyl carrier protein synthases qui sont impliquées dans la synthèse des acides gras. Un autre mode d'action possible est l'éradication du biofilm (Farhadi et *al.*, 2019).

Lavandula stoechas

Les résultats de cette étude (tableau 23) ont révélé que les composés phénoliques extraits de *Lavandula stoechas* n'ont montré aucun effet inhibiteur reproductible contre *Pseudomonas aeruginosa*. De même, l'extrait aqueux est actif seulement sur *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter bumanii*, *Proteus mirabilis* et *Citrobacter frendii*. Cependant les extraits acétate d'éthyle et butanolique ont été les meilleurs composés à démontrer une activité antibactérienne performante contrairement à *Staphylococcus aureus* dont le secteur d'inhibition atteint jusqu'à 35 mm. Une activité aussi importante de la fraction acétate d'éthyle contre *Streptococcus pneumoniae* (31 mm). Toutefois, les extraits butanoliques et d'acétate d'éthyle ont prouvé un effet antibactérien contre *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhymurium* et *Vibrio cholerae* (tableau 23).

L'efficacité supérieure des extraits a été confirmée par des concentrations inhibitrices plus basses (CMI) contre la plupart des souches bactériennes sensibles. La CMI était comprise entre 0.31 et 10 mg/ml. *Staphylococcus aureus* était la plus sensible (CMI = 0.31 mg/ml), suivie par *Streptococcus pneumoniae* (CMI = 0.63 mg/mL). Les valeurs de CMB variaient de 2.5 mg/ml à 10 mg/ml. La valeur minimale de la CMB a été observée avec l'extrait d'acétate d'éthyle sur *Streptococcus pneumoniae*.

De nombreux extraits de la lavande présentent des activités antibactériennes et se sont révélées être de puissants agents thérapeutiques. Les résultats de Sales (2014) ont montré que la CMI et la CMB de l'extrait éthanolique de *Lavandula stoechas* L. sur *Staphylococcus aureus* étaient de 6.5 et 13 mg/ml respectivement. Ces concentrations sont très élevées par rapport aux résultats obtenus dans notre étude. Haghghati et al. (2006) ont évalué l'effet antibactérien des extraits de *Lavandula stoechas*, et ils ont trouvé un effet antibactérien significatif sur *Streptococcus sp*

Conformément à nos résultats, Cherrat et al. (2014) ont rapporté que les extraits marocains de *L. stoechas* présentaient une activité antibactérienne supérieure contre les bactéries Gram positives par rapport aux bactéries Gram négatives. Par exemple, ils ont démontré les activités antimicrobiennes les plus élevées contre *Staphylococcus aureus* avec des diamètres d'inhibition de 28.0 ± 0.70 mm. Ceci pourrait être attribué au fait que les organismes Gram positifs ont une couche de la membrane cellulaire et sont plus vulnérables aux antibiotiques par rapport aux espèces Gram négatives qui ont une membrane binaire et sont moins vulnérables aux effets des agents antimicrobiens (Kaur et al., 2009).

Une étude a testé l'activité antimicrobienne contre huit souches bactériennes pathogènes, notamment *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *B. subtilis* (Bouyahya et al., 2017). L'étude a indiqué que la plus forte inhibition a été obtenue contre *L. monocytogenes* et *S. aureus* avec des diamètres d'inhibition de 19 ± 0.85 mm et 21 ± 0.25 mm, respectivement, ce qui concorde avec les résultats obtenus dans notre travail puisque *Listeria monocytogenes* avait une zone d'inhibition de 15 ± 0.8 mm et une CMI de 5 mg/ml.

Les importantes propriétés antibactériennes des extraits de *Lavandula stoechas* sont corrélées aux composés présents dans ces extraits. Les travaux de McClure (1975) ont montré que les flavonoïdes ont un rôle clé et majeur dans l'autoprotection des plantes des plantes contre les maladies bactériennes, fongiques et virales. Il s'agit donc un aspect important pour comprendre la défense des plantes.

D'après Lima et al. (2019), les composés phénoliques ont un pouvoir antibactérien intéressant contre les bactéries pathogènes. Ces composés peuvent agir de plusieurs façons pour détruire les bactéries, notamment en inhibant la synthèse des acides nucléiques et la membrane plasmique, et en perturbant l'activité enzymatique ou le métabolisme énergétique des bactéries (Cushnie & Lamb 2005).

Tableau 21 : Activité antibactérienne des extraits d'*Ajuga iva*

	Diamètre de la zone d'inhibition				CMI				CMB			
	EBr	EAc	EBt	EAq	EBr	EAc	EBt	EAq	EBr	EAc	EBt	EAq
<i>A. bumannii</i>	05±0,1	15±0,9	15±0,4	02±0,3	10	5	5	ND	>10	10	10	ND
<i>V. cholerae</i>	0.00	9 ± 0.6	4 ± 0.2	0.00	ND	10	10	ND	ND	>10	>10	ND
<i>P. mirabilis</i>	5 ± 0.2	10 ± 0.9	10± 1,2	0.00	10	10	10	10	>10	>10	>10	>10
<i>K. pneumoniae</i>	8 ± 0.5	18± 1,1	15± 1,3	0.00	10	5	5	10	>10	10	10	ND
<i>S. aureus</i>	10 ± 0.7	23±01,3	24±0.1,4	0.00	10	1,25	1,25	ND	>10	2,5	2,5	ND
<i>P. aeruginosa</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>E. coli</i>	12 ± 0.8	18±0.5	0.00	0.00	5	2,5	ND	ND	10	5	ND	ND
<i>B. cereus</i>	0.00	7 ± 0.3	0.00	0.00	ND	10	ND	ND	ND	>10	ND	ND
<i>S. pneumoniae</i>	12± 0.7	28±1.8	18± 0.9	0.00	5	0,62	1,25	ND	10	1,25	2,5	ND
<i>S. typhimurium</i>	0.00	7.0± 0.1	12 ± 1.2	0.00	ND	10	5	ND	ND	>10	>10	ND
<i>L. monocytogenes</i>	0.00	16± 0,3	15±1,4	0.00	ND	2,5	2,5	ND	ND	5	10	ND
<i>C. freundii</i>	7± 0.7	15± 1,4	15± 0.9	05± 0.3	10	5	5	10	>10	10	10	>10

Tableau 22 : Activité antibactérienne des extraits d'*Adiantum capillus-veneris*

	Diamètre de la zone d'inhibition				CMI				CMB			
	EBr	EAc	EBt	EAq	EBr	EAc	EBt	EAq	EBr	EAc	EBt	EAq
<i>A. bumannii</i>	0.00	12±0.3	11±0.9	0.00	ND	5	5	ND	ND	10	10	ND
<i>V. cholerae</i>	0.00	5 ± 0.2	0.00	0.00	ND	10	ND	ND	ND	>10	ND	ND
<i>P. mirabilis</i>	0.00	13 ± 1.9	12± 1.2	0.00	ND	10	10	ND	ND	>10	>10	ND
<i>K. pneumoniae</i>	0.00	20± 1.3	17± 1.5	0.00	ND	2.5	5	ND	ND	5	10	ND
<i>S. aureus</i>	6 ± 1.7	21±1.5	21±2.4	0.00	10	2.5	2.5	ND	>10	5	5	ND
<i>P. aeruginosa</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>E. coli</i>	10 ± 0.9	14±1.3	0.00	0.00	10	5	ND	ND	>10	5	ND	ND
<i>B. cereus</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	ND	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. pneumoniae</i>	9± 1.1	27±2.1	16± 0.8	0.00	10	1.25	1.25	ND	>10	2.5	5	ND
<i>S. typhimurium</i>	0.00	0.00	10 ± 1.4	0.00	ND	ND	10	ND	ND	ND	>10	ND
<i>L. monocytogenes</i>	0.00	11± 0.9	10±1.2	0.00	ND	5	5	ND	ND	>10	>10	ND
<i>C. freundii</i>	0.00	13± 1.9	12± 0.8	0.00	ND	5	5	ND	ND	>10	>10	ND

Tableau 23 : Activité antibactérienne des extraits de *Lavandula stoechas*

	Diamètre de la zone d'inhibition				CMI				CMB			
	EBr	EAc	EBt	EAq	EBr	EAc	EBt	EAq	EBr	EAc	EBt	EAq
<i>A. bumanni</i>	09±0.2	17±0.2	17±0.4	07±0.3	10	5	5	10	>10	10	10	>10
<i>V. cholerae</i>	0.00	12 ± 0.76	6 ± 0.32	0.00	ND	5	10	ND	ND	>10	>10	ND
<i>P. mirabilis</i>	7.5 ± 0.1	15 ± 0.5	12± 0.2	6.6± 0.4	10	5	10	10	>10	10	>10	>10
<i>K. pneumoniae</i>	10 ± 0.4	20± 0.9	20± 0.4	8± 0.2	10	5	5	10	>10	10	10	>10
<i>S. aureus</i>	18 ± 0.23	35±0.46	34±0.37	0.00	2,5	1.25	1.25	ND	10	5	5	ND
<i>P. aeruginosa</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>E. coli</i>	15 ± 0.32	11±0.17	0.00	0.00	5	2.5	ND	ND	10	5	ND	ND
<i>B. cereus</i>	4± 0.2	6 ± 0.3	4± 0.1	0.00	10	10	10	ND	>10	>10	>10	ND
<i>S. pneumoniae</i>	20± 0.23	31±1.1	17± 0.48	0.00	1.25	0.31	0.63	ND	5	2.5	5	ND
<i>S. typhimurium</i>	0.00	9.0± 0.4	10 ± 1.6	0.00	ND	5	5	ND	ND	10	10	ND
<i>L. monocytogenes</i>	0.00	15± 0.8	12±0.5	0.00	ND	5	10	ND	ND	>10	>10	ND
<i>C. freundii</i>	10± 0.5	18± 1.2	17± 0.7	07± 0.6	10	5	5	10	>10	10	10	>10

*Conclusion et
perspectives*

L'exploitation du potentiel biologique des espèces végétales revêt un intérêt important, ainsi les nouvelles démarches consistent à s'intéresser à la recherche des principes actifs dans les produits naturels d'origines végétales.

Notre travail a porté sur la partie aérienne de trois plantes de différentes familles. Une identification botanique a été effectuée sur les trois espèces végétales étudiées (*Ajuga iva*, *Adiantum capillus-veneris* et *Lavandula stoechas*), suivie d'un examen phytochimique qualitatif indispensable à la détermination des différentes familles de composés existantes dans la partie aérienne des trois espèces. Ce criblage phytochimique basé sur des tests spécifiques a permis de caractériser les huiles essentielles, les alcaloïdes, les saponines, les tanins et les flavonoïdes comme métabolites secondaires et les acides gras, les sucres, les protéines comme métabolites primaires dans toutes les espèces. Ces composés en plus des sels minéraux, matière organique et matière sèche font l'objet d'une étude phytochimique quantitative qui révèle que *L. stoechas* est la plus riche en saponines, *A. iva* est la plus riche en tanins et en alcaloïdes et *A. capillus-veneris* possède la quantité la plus élevée en flavonoïdes. En effet le dosage des métabolites primaires révèle des teneurs approximatives.

La méthode d'extraction des flavonoïdes est celle de Merghem et *al.*, (1995), cette dernière, nous a permis d'obtenir quatre fractions pour l'étude : un extrait brut, une fraction à acétate d'éthyle, une fraction butanolique et une phase résiduelle aqueuse. Les trois plantes sélectionnées dans notre étude, ont présenté des rendements en extrait sec acceptables dont les extraits bruts présentent les rendements les plus élevés. Les fractions ont révélé des teneurs élevées en ce qui concerne les composés phénoliques et les flavonoïdes dans la fraction à acétate d'éthyle et butanolique, ce qui explique la fiabilité de la méthode d'extraction.

Les analyses par chromatographie sur couche mince et HPLC-DAD-ESI-MS des extraits correspondants aux trois espèces étudiées, ont montré la présence de quelques composés appartenant généralement à deux classes de composés phénoliques dont les flavonoïdes et les acides phénols. Deux composants majeurs ont été mis en évidence dans les extraits d'*Ajuga iva* : naringenine-hexoside et l'apigenine-7-O-glucoside. La quercetine 3-O-glucoside est le composant prédominant dans les extraits d'*Adiantum capillus-veneris*. Le principale composant dans les extraits de *Lavandula stoechas* est 'acide 4-hydroxybenzoic 4-Oglucoside.

Après le criblage phytochimique, l'extraction et les analyses chromatographiques, nous sommes intéressés à l'étude du pouvoir antibactérien et antioxydant des flavonoïdes.

Les résultats de l'activité antioxydante nous ont amenés à déduire que les fractions d'acétate d'éthyle et butanoliques ont l'avantage de présenter le plus d'activité par rapport aux autres fractions (extraits bruts et aqueux).

Les fractions acétate d'éthyle et butanolique de *Lavandula stoechas* ont présenté une activité antioxydante très élevée, avec des valeurs de l'IC₅₀ supérieures à celle de l'acide ascorbique et de la catéchine, tandis que les autres fractions des autres plantes ont présenté une activité antioxydante modérée, dans le cas du piégeage du radical DPPH.

Pour l'analyse FRAP, nous avons constaté une activité intéressante de l'espèce *Lavandula stoechas* pour réduire le fer, supérieure à celle de l'acide ascorbique et de la catéchine. De même, la plante *Adiantum capillus-veneris* présente un pouvoir réducteur comparable à celle des contrôles.

Nous avons également étudié le pouvoir antioxydant des extraits par la méthode de peroxydation lipidique. En effet, nous avons observé que *Lavandula stoechas* et *Adiantum capillus-veneris* ont présenté une activité très élevée et comparable à celle des contrôles.

L'effet antibactérien des extraits est mis en évidence par la méthode des disques. Le criblage préliminaire, est complété par une détermination de la CMI et de la CMB. L'extrait acétate d'éthyle de *Lavandula stoechas* s'est avéré un agent antibactérien efficace contre toutes les souches étudiées avec des CMI et CMB faibles (0,31 mg/ml, 2,5 mg/ml respectivement). En effet *Streptococcus pneumoniae* semble la plus sensible. En revanche *Pseudomonas aeruginosa* est résistante à tous les extraits.

Ces résultats sont à estimer d'un œil critique. L'activité biologique d'un extrait étant due à l'activité intrinsèque des composants actifs et de leurs quantités relatives, un résultat négatif peut être la conséquence de la présence d'une faible quantité de produits actifs dans l'extrait ou d'une grande quantité de produits non actifs. Par conséquent, les tests que nous avons réalisés pour étudier le pouvoir antioxydant et antibactérien des trois plantes sélectionnées, nous ont permis la sélection des extraits intéressants à étudier et que les autres extraits ne sont en aucun cas à exclure. De ce fait, les polyphénols de *Lavandula stoechas* et d'*Adiantum*

capilus-veneris semblent présenter un réel intérêt au niveau de leurs activités antioxydante et antibactérienne.

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche des substances de source naturelle biologiquement active. Toutefois, il serait intéressant d'approfondir la recherche par des tests *in vivo* et des analyses sur d'autres activités biologiques ce qui permettra d'élargir l'arsenal thérapeutique des médicaments à base de plantes.

*Références
bibliographiques*

Abbasi A. M., Khan M. A., Ahmad M., Zafar M., Khan H., Muhammad N., Sultana S., (2009). Medicinal plants used for the treatment of jaundice and hepatitis based on socio-economic documentation. *African Journal of Biotechnology*, 8 (8) : 1394-1398.

Adamczak A., O'zarowski M., Karpinski T.M., (2020). Antibacterial Activity of Some Flavonoids and Organic Acids Widely Distributed in Plants. *Journal of Clinical Medicine*, 9, (109), 1-17.

Adebayo A.S., Gbadamosi I. A., Adewunmi C.O., (2000). Formations of antimicrobial dried powdered herbs in soap bases. *In phyto medicines in malaria and sexually transmitted diseases ; Challenges for the new millennium.* Adewunmi, C.O., Adesina, S. K. Eds. Obafemi Awolowo University, p. 97.

Adjadj M., (2009). Propriétés antioxydantes et activité inhibitrice de la xanthine oxydase des extraits de la plante médicinale *Ajuga iva*. Mémoire de magister en toxicologie cellulaire et moléculaire, Université de Mentouri Constantine, Algérie, 86, 51-52.

Adwas A.A., Elsayed A.S.I., Azab A.E., Quwaydir F.A., (2019). Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *J. Appl. Biotechnol. Bioeng.*, 6 (1), 43-47.

Ahmed A., Nasreen J., Abdul Wadud H.I., Syeda Hajera A.B., (2012). Phytochemical and biological properties of *Adiantum capillus-veneris* Linn: An important drug of Unani system of medicine. *I.J.C.R.R.*, 4 (21), 71-75.

Ako A., Yavuz S.C., Gokhan Z., (2018). Phenolic Compounds, Antioxidant Properties and Enzyme Inhibition Ability of *Adiantum capillus veneris* L. linked to Alzheimer's Disease, Diabetes Mellitus and Skin Disorders. *Current Organic Chemistry*, 22 (17), 1697-1703.

Akomo E. F.O., Zongo C., Karou S.D., Obame L.C., Savadogo A., Attek C., Traore A.S., (2009). *In vitro* antiplasmodia and antibacterial activities of *Canthium multiflorum* schum and thonn (Rubiaceae) extracts. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12 (12): 919-923.

Al-Hallaq E.K., Litescu S.C., Kasabri V., Abdul-Razzak K.K., Abaza I.M., Afifi F.U., (2015). Hypocholesterolemic Effects of *Adiantum capillus-veneris* L. Aqueous Extract In High Cholesterol Diet-Fed Rats And HPLC-MS Determination of its Polyphenolics. *Rev. Roum. Chim.*, 60 (4), 357-365.

Alkadi H., (2020). A Review on Free Radicals and Antioxidants. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 20 (1), 16-26.

Al-Snafi A.E., (2015). The chemical constituents and pharmacological effects of *Adiantum capillus-veneris* - a review. *Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology*, 5 (2), 106-111.

AOAC, 1990. In: S. Williams (Ed.), Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist International, 15th AOAC International, Arlintong, Virginia, (USA).

Ardestani A., Yazdanparast R., (2007). Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on *in vitro* protein glycooxidation. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 2402-2411.

Arif T., Mandal T.K., Dabur R., (2011). Natural products: Anti-fungal agents derived from plants. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 11, 621-638.

Ashraf M.A., Iqbal M., Rasheed R., Hussain I., Riaz M., Arif M.S., (2018). Environmental Stress and Secondary Metabolites in Plants. *Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress*, 153–167. doi:10.1016/b978-0-12-812689-9.00008-x

Atwal R., (2003). *In vitro* antimicrobial activity Assessment of Zymox Otic Solution Against a Broad Range of Microbial Organisms. Veterinary Medicine, California.

Awolola G.V., Koorbanally N.A., Chenia H., Shode F.O., Baijnath H., (2014). Antibacterial and anti-biofilm activity of flavonoids and triterpenes isolated from the extracts of *Ficus Sansibarica warb. Subsp. Sansibarica* (Moraceae) extracts. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, 11, 124-131.

Ayaz M., Sadiq A., Junaid M., Ullah F., Ovais M., Ullah I., Ahmed J., Shahid M., (2019). Flavonoids as Prospective Neuroprotectants and Their Therapeutic Propensity in Aging Associated Neurological Disorders. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11 (155), 1-20.

Baghiani A., Boumerfeg S., Adjadj M., Ameni D., Djermouni M., Khelifitouhami F., Charef N., Khennouf S., Arrar L., (2011). Antioxidants, free radicals scavenging and xanthine oxidase inhibitory potentials of *Ajuga iva* L. extracts. *Free Radicals and Antioxidants*, 1 (4), 21-30. doi: 10.5530/ax.2011.4.5.

Banerjee K., Banerjee S., Das S., Mandal M., (2015). Probing the potential of apigenin liposomes in enhancing bacterial membrane perturbation and integrity loss. *Journal of Colloid and Interface Science*. 453, 48-59.

Batanouny K.H., Abou Tabl S., Shabana M., Soliman F., (1999). Wild medicinal plants in egypt. *Academy of Scientific Research and Technology*. International Union for Conservation (IUCN). Egypt.

Behling E.B., Sendao M.C., Francescato H.D.C., Antunes L.M.G., Bianchi M.D.L.P., (2004). Flavonoide Quercetina: Aspectos Gerais E. *Aliment Nutr. Brazilian J. Food Nutr.*, 15, 285-292.

Ben Jannet H., Al Mourabit A., Gateau-Olesker A., Marazano C., Mighri Z., (1999). Enantioselective synthesis of natural biologically active ivaide A : 1,3-di-(R)- α -hydroxyglyceride glycerol. *Tetrahedron Asymmetry*, 10 : 2381-2386.

Ben Jannet H., Harzallah-skhir F., Mighri Z., Simmonds M.S., Blaney W.M., (2000). Responses of *Spodoptera littoralis* larvae to Tunisian plant extracts and to neo-clerodane diterpenoids isolated from *Ajuga pseudoiva* leaves. *Fitoterapia*, 71, 105-112.

Besharat M., Rahimian M., Ghaemi E., Besharat S., (2009). Effect of ethanolic extract of *Adiantum capillus-veneris* in comparison with Gentamicine on 3 pathogenic bacteria *in vitro*. *Pharm. Sci.*, 15 (1), 49-52.

Biharee A., Sharma A., Kumar A., Jaitak V., (2020). Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance. *Fitoterapia*, 146, 1-22.

Blair J.M.A., Webber M.A., Baylay A.J., Ogbolu D.O., Piddock L.J.V., (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13, 42-51.

Boizot N., Charpentier J. P., (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier, INRA-Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyses Biochimiques, Le Cahier des Techniques des l'Inra, 79-82.

Bondi M. L., Al-Hillo M.R.Y., Lamara K., Ladjel S., Bruno M., Piozzi F., Simmonds M S. J., (2000). Occurrence of the antifeedant 14,15-dihydroajugapitin in the aerial parts of *Ajuga iva* from Algeria. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28 : 1023-1025.

Bors W., Heller W., Michel C., Saran M., (1990). Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. In: Packer L., Glazer A.N. (eds.), *Methods in Enzymology*, p. 343-355. Academic Press: San Diego

Boudjelal A., Siracusa L., Henchiri C., Sarri M., Abderrahim B., Baali F., Ruberto G., (2015). Antidiabetic Effects of Aqueous Infusions of *Artemisia herba-alba* and *Ajuga iva* in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Planta Medica*, 81 (09), 696-704. doi: 10.1055/s-0035-1546006.

Boudjema K., Benmansour F., Ghezali S., Ouamar L., Hali L., Fazouane F., (2020). Phytochemical Screening and Evaluation of Some Biological Activities of Plant Extracts *Adiantum capillus-veneris* L. and *Tamarix gallica* L. *African Review of Science, Technology and Development*, 5 (2), 70-85.

Bouquet A., Debray M., (1974). Plantes médicinales de Côte-d'Ivoire. Imprimerie Louis Jean, Paris (France), p. 232.

- Bouyahya A., Abrini J., Et-Touys A., Bakri Y., Dakka N., (2017).** Indigenous knowledge of the use of medicinal plants in the North-West of Morocco and their biological activities. *Euro. J. Integ. Med.*, 13, 9-25.
- Bouyahya A., Et-Touys A., Abrini J., Talbaoui A., Fellah H., Bakri Y., Dakka N., (2017).** *Lavandula stoechas* essential oil from Morocco as novel source of antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Biocatal Agric. Biotechnol.*, 12, 179-84.
- Bouyahya A., El Omarib N., Elmenyiyc N., Guaouguaoud F.E., Balahbibe A., El-Shazlyf M., Chamkhi I., (2020).** Ethnomedicinal use, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of *Ajuga iva* (L.) schreb. *Journal of Ethnopharmacology*, 112875. doi:10.1016/j.jep.2020.112875.
- Brown A.R., Ettefagh K.A., Todd D.A., Cole P.S., Egan J.M., .Foil D.H., Lacey E.P., Cech N.B., (2021).** Bacterial efflux inhibitors are widely distributed in land plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 267.
- Bruneton J., (2015).** Pharmacognosie Phytochimie - Plantes médicinales. Tec and Doc., Lavoisier, Paris (5^{ème} Éd.), p. 1504.
- Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie, Phytochimie of médicinale plantes, 3^{ème} édition. Ed. Tec et doc. Paris.
- Calderon-Montano J.M., Burgos-Moron E., Perez-Guerrero C., Lopez-Lazaro M., (2011).** A review on the dietary flavonoid Kaempferol. *Mini Rev. Med. Chem.*, 11 (47), 298-344.
- Cardoso L.M., Leite J.P.V., Peluzio M.C.G., (2011).** Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico. *Rev. Colomb. Ciencias. Químico. Farm.*, 40, 116-138.
- Catalá A., (2009).** Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxyalkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem. Phys. Lipids*, 157, 1-11.
- Ceylan Y.K., Usta A., Usta E., M., Yildiz S. (2015).** Evaluation of Antioxidant Activity, Phytochemicals and ESR Analysis of *Lavandula Stoechas*. *ACTA PHYSICA POLONICA A*, 128 (2), 483-487.
- Chabbert Y.A., (1973).** Données actuelles sur la résistance des bactéries aux antibiotiques. Extrait des actualités pharmacologiques. *Masson*, 26-60.
- Chenni A., Ait Yahia D., Boukortt F. O., Prost J., Lacaille-Dubois M A. Bouchenak M., (2007).** Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet. *J. Ethnopharmacol*, 109: 207-213.

Cherrak S.A., Mokhtari-Soulmane N., Berroukeche F., Bensenane B., Cherbonnel A., Merzouk H., Elhabiri M., (2016). *In Vitro* Antioxidant versus Metal Ion Chelating Properties of Flavonoids: A Structure-Activity Investigation. *PLOS ONE*, 11 (10), 1-21.

Cherrat L., Espina L., Bakkali M., Pagán R., Laglaoui A., (2014). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha Scheele* essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined processes. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 22, 221-9.

Chograni H., Riahi L., Messaoud C., (2021). Variability of qualitative and quantitative secondary metabolites traits among wild genetic resources of *Lavandula stoechas* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 98, 104327.

Choi O., Yahiro K., Morinaga N., Miyazaki M., Noda M., (2007). Inhibitory effects of various plant polyphenols on the toxicity of staphylococcal -toxin. *Microb. Pathog.*, 42, 215-24.

Chouhan H.S., Singh S.K., (2011). Phytochemical analysis, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Phyllanthus simplex*. *J. of Ethnopharmacology*, 137, 1337-1344.

Chouitah O., Meddah B., Aoues A., Sonnet P. (2017). Essential Oil from the Leaves of *Ajuga iva*: Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20 (3), 873-877.

Chu C. J., Kemper K. J., 2001. Lavender (*Lavandula* spp.). Longwood Herbal Task Force. P. 32.

Clarke G., Ting K.N., Wiart C., Fry J., (2013). High Correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging, Ferric Reducing Activity Potential and Total Phenolics Content Indicates Redundancy in Use of All Three Assays to Screen for Antioxidant Activity of Extracts of Plants from the Malaysian Rainforest. *Antioxidants*, 2, 1-10.

Colalto C., (2018). What phytotherapy needs: Evidence-based guidelines for better clinical practice. *Phytotherapy Research*, 32 (3), 413-425.

Cowan M.M., (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiolo. Review*, 12 (4), 564-582.

Cui Q., Du R., Liu M., Rong L. (2020). Lignans and Their Derivatives from Plants as Antivirals. *Molecules*, 25 (183), 1-17.

Cushnie T.P.T., Lamb A.J., (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 38, 99-107.

Cushnie T.T., Lamb A.J., (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26 (5), 343-356.

Degraft-Johnson J., Kolodziejczyk K., Krol M., Nowak P., Krol B., Nowak D., (2007). Ferric-reducing ability of selected plant polyphenols and their metabolites: implications for clinical studies on the antioxidant effects of fruits and vegetable consumption. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 100 (5), 345-352.

Delehanty J.B., Johnson B.J., Hickey T.E., Pons T., Ligler F.S., (2007). Binding and neutralization of lipopolysaccharides by plant proanthocyanidins. *J. Nat. Prod.*, 70, 1718-24.

Demoré B., Grare M., Duval R., (2012). Pharmacie clinique et thérapeutique 4 ème édition. Chapitre 42: Généralités sur les antibiotiques par voie systémique et principes d'utilisation.

Deng J., Yang H., Capanoglu E., Cao H., Xiao J., (2018). Technological aspects and stability of polyphenols. *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*, 295-323.

Dhanani T, Shah S., Gajbhiye N.A., Kumar S., (2017). Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, 1193-1199.

Dif M.M., Benyahia M., Toumi B.F., Rahmani M., Bouazza S., (2016). Phenolic content and antioxidant activity of three Algerian species of lavenders. *Phytothérapie*, 1-6.

Doherty V.F., Olaniran O.O., Kanife U.C., (2010). Antimicrobial Activities of *Aframomum Melegueta* (Alligator Pepper). *International Journal of Biology*, 2 (2), 126-131.

Donald R. B., Cristobal M., (2006). Antioxidant activities of flavonoids. *J. Agric.*, 52, 125-757.

Dubois M., (1956). Colorimetric Method for determination of Sugars and related Substances. *Analytical chemistry*, 28, 350-356.

Dubrovina A.S., Kiselev K.V., (2017). Regulation of stilbene biosynthesis in plants. *Planta*, 246, 597-623.

Durazzo A., Lucarini M., Camilli E., Marconi S., Gabrielli P., Lisciani S., Gambelli L., Aguzzi A., Novellino E., Santini A., Turrini A., Marletta L., (2018). Dietary Lignans: Definition, Description and Research Trends in Databases Development. *Molecules*, 23 (3251), 2-14.

Ekalu A., Habila J.D., (2020). Flavonoids: isolation, characterization, and health benefits. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 9 (45), 1-14.

El Guiche R., Tahrouch S., Amri O., El Mehrach K., Hatimie A., (2015). Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Contents of 30 Medicinal and Aromatic Plants Located in the South of Morocco. *International Journal of New Technology and Research*, 1 (3), 7-11.

El Hilaly J., Lyoussi B., (2002). Hypoglycaemic effect of the liophilised aqueous extract of *Ajuga iva* in normal and streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 80: 109-113.

El-Hilaly J., Amarouch M.Y., Morel N., Lyoussi B., Quetin-Leclercq J., (2021). *Ajuga iva* water extract antihypertensive effect on stroke-prone spontaneously hypertensive rats, vasorelaxant effects *in vivo* and *in vitro* activity of fractions. *Journal of Ethnopharmacology*, 270, 113791. doi: 10.1016/j.jep.2021.113791.

El-Hilaly J., Lyoussi B., Wibo M., Morel N., (2004). Vasorelaxant effect of the aqueous extract of *Ajuga iva* in rat aorta. *J. Ethnopharmacol.*, 93, 69-74.

El-Hilaly J., Tahraoui A., Israili Z.H., Lyoussi B., (2006). Hypocholesterolemic effects of acute and sub-chronic administration of an aqueous extract of *Ajuga iva* L. whole plant in normal and diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.*, 105 : 441-448.

Ez zoubi Y., Bousta D., El Mansouri L., Boukhira S., Siham L., Achour S., Farah A., (2016). Phytochemical screening, anti-inflammatory activity and acute toxicity of hydro-ethanolic, flavonoid, Tannin and Mucilage Extracts of *Lavandula stoechas* L. from Morocco. *Int. J. Pharmacognosy Phytochem. Res.*, 8 (1), 31-7.

Ez zoubi Y., Fadil M., Bousta D., El Ouali Lalami A., Lachkar M., Farah A., (2021). Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Moroccan *Lavandula stoechas* L.: Optimization Using Response Surface Methodology. *Journal of Chemistry*, Article ID 8830902, 11 pages.

Farhadi F., Khameneh B., Iranshahi M., Iranshahy M., (2019). Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. *Phytotherapy Research*, 33, 13-40.

Fettach S., Mrabti H.N., Sayah K., Bouyahya A., Salhi N., Cherrah Y., El Abbes F.M., (2019). Phenolic content, acute toxicity of *Ajuga iva* extracts and assessment of their antioxidant and carbohydrate digestive enzyme inhibitory effects. *South African Journal of Botany*, 125, 381-385.

Fouché J.G., Marquet A., Hambuckers A. (2000). Les plantes médicinales de la plante au médicament; Observatoire du Monde des Plantes; Sart-Tilman, B77. B-4000 Liège.

Găman M.A., Epîngeac M.E., Diaconu C.C., Găman A.M., (2020). Evaluation of oxidative stress levels in obesity and diabetes by the free oxygen radical test and free oxygen

radical defense assays and correlations with anthropometric and laboratory parameters. *World J. Diabetes*, 11 (5), 193-201.

Ghedira K., Chemli R., Richard B., Zeches M., Le Men-Olivier L., (1991). Contribution to the study of the traditional Tunisian pharmacopeia: study of aerial parts of *Ajuga iva* (L.) Schreb. *Plant Med. Phytother.*, 25, 100-111.

Gilani A.H., Aziz N., Khan M.A., Shaheen F., Jabeen Q., Siddiqui B.S., Herzig J.W., (2000). Ethnopharmacological evaluation of the anticonvulsant, sedative and antispasmodic activities of *Lavandula stoechas* L. *J. Ethnopharmacol.*, 71, 161-7.

Goren A. C., Topçu G., Bilsela G., Bilsela M., Aydogmus Z., Pezzuto J. M., (2002). The chemical constituents and biological activity of essential oil of *Lavandula stoechas*. *Z. Naturforsch*, 57 : 797-800.

Górniak I., Bartoszewski R., Króliczewski J., (2019). Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochem. Rev.*, 18, 241-272.

Gürler S.B., Kiraz Y., Baran Y., (2020). Flavonoids in cancer therapy: current and future trends. In: Ozturk M., Egamberdieva D., Pešić M. (eds.), *Biodiversity and Biomedicine: Our Future*, p. 403-422. Elsevier Science.

Gutteridge J.M.C., Halliwell B., (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*, 15 (4), 129-135.

Haghighati F., Jafari S., Momen Beitollahi J., (2006). Comparison of antimicrobial effects of ten Herbal extracts with chlorhexidine on three different oral pathogens; an *in vitro* study. *Hakim Research Journal*, 3 (6), 71-76.

Halimi A. K., (2004). Les plantes médicinales en Algérie. 1ère édition. *BERTI Editions*, Alger. p: 156-157.

Halliwell B., (1999). Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.*, 16, 33-50.

Halvorsen B.L., Blomhoff R., (2011). Validation of a quantitative assay for the total content of lipophilic and hydrophilic antioxidants in foods. *Food Chem.*, 127, 761-768.

Hamilton K.E., Rekman J.F., Gunnink L.K., Busscher B.M., Scott J.L., Tidball A.M., Stehouwer N.R., Johncheck G.N., Looyenga B.D., Louters L.L., (2018). Quercetin inhibits glucose transport by binding to an exofacial site on GLUT1. *Biochimie*, 151, 107-114.

Hamza N., Berke B., Umar A., Cheze C., Gin H., Moore N., (2019). A review of Algerian medicinal plants used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 238 (28), 1-113.

Hano C., Tungmunnithum D., (2020). Plant Polyphenols, More Than Just Simple Natural Antioxidants: Oxidative Stress, Aging and Age Related Diseases. *Medicines*, 7 (26): 2-10.

Harisaranraj R., Suresh K., Saravanababu S., (2009). Evaluation of the Chemical Composition of *Rauwolfia serpentina* and *Ephedra vulgaris*. *Advances in Biological Research*, 3 (6): 174-178.

Harrison P.F., Lederberg J., (1998). Antimicrobial Resistance: Issues and Options. National Academy of Science Press. United State of America, p. 128.

Hawrył A., Hawrył M., Waksmundzka-Hajnos M. (2019). Liquid chromatography fingerprint analysis and antioxidant activity of selected lavender species with chemometric calculations. *PLoS ONE*, 14 (7), 1-14.

He M., Wu T., Pan S., Xu X., (2014). Antimicrobial mechanism of flavonoids against *Escherichia coli* ATCC 25922 by model membrane study. *Applied Surface Science*, 305, 515-521.

Heftmann E., (2004). Chromatography. 6th edition, Elsever, 6 (88), 9-38.

Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., (2002). Flavonoid antioxidants : chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.

Herrera E., Jiménez R., Aruoma O.I., Hercberg S., Sánchez-García I., Fraga C., (2009). Aspects of antioxidant foods and supplements in health and disease. *Nutrition Reviews*, 67 (1), 140-144.

HMSO, (1999). Report on Microbial Antibiotic Resistance in Relation to Food Safety by the Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food. The Stationery Office, London

Hostettmann K., Marston A., Hostettmann M., (1998). Preparative chromatography techniques, application natural product isolation. Second edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, p. 41-50.

Huang D., Ou B., Prior R.L., (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 1841-1856.

Hubert J., (2006). Thèse : Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja : étude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine. Toulouse, N° d'ordre, 2435.

Israili, Z.H., Lyoussi B. (2009). Ethnopharmacology of the plants of genus *Ajuga*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22 (4), 425-462.

- Jack I.R., Okorosaye-Orubite K., (2008).** Phytochemical analysis and antimicrobial activity of the extract of leaves of fleabane (*Conyza sumatrensis*). *J. Appl. Sci. Environ. Manage.*, 12 (4), 63-65.
- Jadid N., Hidayati D, Hartanti S.R., Arraniry B.A., Rachman R.Y., Wikanta W., (2017).** Antioxidant Activities of Different Solvent Extracts of *Piper retrofractum* Vahl. using DPPH Assay. *AIP Conference Proceedings*, 1854, 020019.
- Jain P.K., Joshi H., (2012).** Coumarin: Chemical and Pharmacological Profile. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2 (6), 236-240.
- Jamshidi-Kia F., Wibowo J.P., Elachouri M., Masumi R., Salehifard-Jouneghani A., Abolhassanzadeh Z., Lorigooini Z., (2020).** Battle between plants as antioxidants with free radicals in human body. *J. Herbmed. Pharmacol.*, 9 (3), 191-199.
- Joffin J.N., Leyral G., (2001).** Microbiologie technique. 1 Dictionnaire des techniques. Collection biological technique. 3^{ème} édition.
- Kandiah U., Kulanthaivelu P., Jeyaratnam P.J., Emmanuel C. J., (2010).** Antibacterial activity and qualitative phytochemical analysis of medicinal plant extracts obtained by sequential extraction method. *International journal of integrative biology*, 10 (2) : 76-81.
- Karumi Y., Onyeyili P.A., Ogugbuaja V.O., (2004).** Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam Apples) Leaf extract. *J. Med. Sci.*, 4 (3), 179-182.
- Kashkooe A., Sardari F.A., Mehrabadi M.M., Zarshenas M.M., (2021).** A Review of Pharmacological Properties and Toxicological Effects of *Adiantum capillus-veneris* L. *Curr. Drug Discov. Technol.*, 18 (2), 186-193.
- Kasprzak M.M., Erxlebenc A., Ochocki J., (2013).** Properties and applications of flavonoid metal complexes. *The Royal Society of Chemistry*, 1-24.
- Kaur C., Kapoor H.C., (2002).** Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Inter. J. Food Sci.Tech.*, 37, 153-161.
- Kaur G.J., Arora D.S., (2009).** Antibacterial and phytochemical screening of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgure* and *Trachysprmmum ammi*. *BMC complement. Altern. Med.*, 9 (30), 1-10. doi : 10.1186/1472-6882-9-30.
- Kaurinovic B., Vastag D., (2019).** Flavonoids and Phenolic Acids as Potential Natural Antioxidants. *Antioxidants*, 1-20.
- Kejík Z., Kapláneek R., Masařík M., Babula P., Matkowski A., Filipenský P., Veselá K., Gburek J., Sýkora D., Martásek P., Jakubek M., (2021).** Iron Complexes of Flavonoids: Antioxidant Capacity and Beyond. *Int. J. Mol. Sci.*, 22 (2), 622-646.

Khaled-Khodjaa N., Boulekbache-Makhlouf L., Madani K. (2014). Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Industrial Crops and Products*, 61, 41-48.

Khattelia A., Benabderrahima M.A., Trikia T., Guasmi F. (2020). Aroma volatiles, phenolic profile and hypoglycaemic activity of *Ajuga iva* L. *Food Bioscience*, 36, 100578.

Kjeldahl J. (1983). The Kjeldahl determine of nitrogen: retrospect and prospect. *Trends in analytical Chemistry*, 13(4), 138.

Koffi N.G., Beugré K., Guédé N. Z., Dossahoua T., Laurent A.A., (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences et Nature*, 6 (1), 1-5.

Kokate C.K., Purohit A.P., Gokhale S.B., (2008). Pharmacognosy. Forty second edition, p. 16-17.

Kouamé J., Gnoula C., Palé E., Bassolé H., Guissou I.P., Simporé J., Nikiéma J.B., (2009). Etude des propriétés cytotoxiques et anti-radicalaires d'extraits de feuilles et de galles de *Guiera senegalensis* J. F. Gmel (Combretaceae). *Science et technique*, 32 (2), 9-23.

Krimat S., Dob T., Lamari L., Boumeridja S., Chelghoum C.H., Metidji H., (2014). Antioxidant and antimicrobial activities of selected medicinal plants from Algeria. *J. Coast. Life Med.*, 2 (6), 478-483.

Krimat S., Dob T., Toumi M., Kesouri A., Noasri A., (2015). Assessment of phytochemicals, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of *Salvia chudaei* Batt. et Trab. endemic medicinal plant from Algeria. *J. Mater. Environ. Sci.*, 6, 70-8.

Kumar S., Nagarajan S.N., (2012). Screening of preliminary phytochemical constituents and antimicrobial activity of *Adiantum capillus-veneris*. *J. Res. Antimicrob.*, 1, 56-61.

Ladjimi M.H., Lahbib K., Ben Barka Z., Ben Miled H., Ben Rhouma K., Sakly M., Tebourbi O., (2020). Phytochemical Screening and *in vitro* Antioxidant Evaluation of *Ajuga iva*. *J. Pharm. Pharmacol. Res.*, 4 (4), 164-175.

Langemeier J.M., Rogers D.E., (1995). Rapid Method for Sugar Analysis of Doughs and Baked Products. *American Association of Cereal Chemists, Cereal Chem.*, 72 (4), 349-351.

Lbekwe H.A., Orok E.E., (2010). Proximate Composition of *Aframomum melegueta* Seeds, *Garcinia kola* Seeds and Growth Performance of Broiler Chicks Treated with Powders from These Seeds. *International Journal of Poultry Science*, 9 (12), 1152-1155.

- Lima M.C., Paiva de Sousa C., Fernandez-Prada C., Harel J., Dubreuil J.D., (2019).** A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. *Microb. Pathog.*, 130, 259-270.
- Lino A., Deogracious O., (2006).** The *in vitro* antibacterial activity of *Annona senegalensis*, *Sacuridecae longipendiculata* and *Steganotaema araliacea*, Uganda medicinal plants. *Journal of African Health Science*, 6 (1), 31-35.
- Mahboubi A., Kamalinejad M., Shalviri M., Karbasi Z., Jafariazar Z., Asgharian R., (2012).** Evaluation of antibacterial activity of three Iranian medicinal plants. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 6, 2048-2052.
- Makni M., Haddar A., Kriaa W., Zeghal N., (2013).** Antioxidant, free radical scavenging and antimicrobial activities of *Ajuga iva* leaf extracts. *International Journal of Food Properties*, 16, 756-765
- Manga M.M., Ibrahim M., Hassan U.M., Joseph R.H., Muhammad A.S., Danimo, M.A., Ganiyu O., Versporten A., Oduyebo O.O., (2021).** Empirical antibiotherapy as a potential driver of antibiotic resistance: observations from a point prevalence survey of antibiotic consumption and resistance in Gombe, Nigeria. *Afr. J. Clin. Exper. Microbiol.*, 22 (2), 273-278.
- Mann C.M., Cox S.D. Markham J.L., (2000).** The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Lett. Appl. Microbiol.*, 30, 294-297.
- Matos M.J., Santana L., Uriarte E., Abreu O.A., Molina E., Yordi E.G., (2015).** Coumarins: An Important Class of Phytochemicals. In: Rao V., Rao L., (eds.), *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health*, p. 113-140. IntechOpen.
- Mbaveng A.T., Ngameni B., Kuete V., Simo I.K., Ambassa P., Roy R., Bezabih M., Etoa F.X., Ngadjui B.T., Abegaz B.M., Meyer J.J.M., Lall N., Beng V.P., (2008).** Antimicrobial activity of the crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia barteri* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 116 (3), 483-489.
- McClure J.W., (1975).** Physiology and functions of favonoids. In: Harborne JB, Mabry TJ, Mabry H (eds) *The favonoids*. Springer, Boston, p. 970-1055.
- Medjeldi S., Bouslama L., Benabdallah A., Essid R., Haou S., Elkahoui S., (2018).** Biological activities, and phytocompounds of northwest Algeria *Ajuga iva* (L) extracts: Partial identification of the antibacterial fraction. *Microbial. Pathogenesis*, 121, 173-178.

- Medrar M.M., Ahmad B., Rashid E., Hashim S., (2014).** *In vitro* antibacterial activity of methanol and water extracts of *Adiantum capillus-veneris* and *Tagetes patula* against multidrug resistant bacterial strains. *Pak. J. Bot.*, 46 (1), 363-68. doi
- Meenakshi S., Neha S., Khare P.B., Rawat A. K. S., (2007).** Antimicrobial activity of some important *Adiantum* species used traditionally in indigenous systems of medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 115 (2) : 327-329.
- Menaceur F., Hazzit M., (2014).** Comparative Study of Chemical Composition And Antioxidant Activity Of Ethanolic Extracts From Algerian *Lavandula Stoechas* L. And *Rosmarinus Tournefortii* De Noé. *International Journal of Agricultural Science and Research*, 4 (6), 139-146.
- Merghem M., Dahamna S., (2020).** *In Vitro* Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Ruta Montana* L. Extracts. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 10 (2), 69-75.
- Merghem R., Jay M., Viricel M.R., Bayet C., Voirin B., (1995).** Five 8-C-benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiata). *Phytochemistry*, 38, 637-640.
- Miliauskas G., Venskutonis P.R., Van Beek T.A., (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food chemistry*, 85, 231-237.
- Mohammed F.S., Sevindik M., Bal C., Akgül H., Selamoğlu Z., (2019).** Biological Activities Of *Adiantum Capillus-Veneris* Collected From Duhok Province (Iraq). *Communications Faculty of Sciences University of Ankara Series C: Biology*, 28 (2), 128-142.
- Mohammedi Z., (2006).** Thèse de magister : Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen.
- Mohd A.S., Mohd K., Juber A., Siddiqui B., Usama A., Farogh A., Mohd M.K., Mohammad A., Asad A., (2016).** Review article: *Lavandula stoechas* (Ustukhuddus): A miracle plant. *J. Innov. Pharm. Biol. Sci.*, 3(1), 96-102.
- Monserrat-Martinez A., Gambin Y., Sierecki E., (2019).** Thinking Outside the Bug: Molecular Targets and Strategies to Overcome Antibiotic Resistance. *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 1-23.
- Moroh J.L.A., (2013).** Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de *Morinda morindoides*. Sciences agricoles. Université de Bretagne occidentale-Brest, Français, p. 204.
- Mouheb S., Khali M., Rouibi A., Saidi F., (2018).** Antimicrobial and analgesic activity of aqueous extract of Algerian *Ajuga iva* (L.) Schreb (Lamiaceae). *Revue Agrobiol.*, 8 (1), 863-870.

- Movahhedin N., Zengin G., Bahadori B.M, Sarikurkcü C., Bahadori S., Dinparast L. (2016).** *Ajuga chamaecistus* subsp. *scoparia* (Boiss.): A new source of phytochemicals for antidiabetic, skin-care, and neuroprotective uses. *Industrial Crops and Products*, 90 (30), 89-96.
- Mraïhi F., Journi M., Chérif J.K., Sokmen M., Sokmen A., Trabelsi-Ayadi M., (2013).** Phenolic Contents and Antioxidant Potential of Crataegus Fruits Grown in Tunisia as Determined by DPPH, FRAP, and Carotene/Linoleic Acid Assay. *Journal of Chemistry*, article ID 378264, 6 pages.
- Nacoulma O., (1996).** Thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles : Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles au Burkina Faso: cas du Plateau central. Université de Ouagadougou (Burkina-Faso), p. 605.
- Naoki S., Masaki F., (1983).** Isolation and Identification of Diacylglycerol-O-4'-(N,N,N-trimethyl)-homoserine from the Fern *Adiantum capillus-veneris* L. *Science direct*, 24 (6) : 1113-1120.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), (2002).** Methods for dilution, antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 5th Edt., USA.
- Nogowski L., Mackowiak P., Kandulska K., Szkudelski T., Nowak K.W., (1998).** Genistein-induced changes in lipid metabolism of ovariectomized rats. *Ann. Nutr. Metab.*, 42, 360-366.
- Nogowski L., Mackowiak P., Kandulska K., Szkudelski T., Nowak K.W., (1998).** Genistein-induced changes in lipid metabolism of ovariectomized rats. *Ann. Nutr. Metab.*, 42, 360-366.
- Norme Algérienne (NA 652) (1992).** Aliments des animaux – Détermination de la teneur en azote en vue du calcul de la teneur en protéines brutes. Première édition, p. 01-04.
- Okigbo R.N., Anuagasi C.L., Amadi J.E., Ukpabi U.J., (2009).** Potential inhibitory effects of some African tuberous plant extracts on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *International Journal of integrative biology*, 06 (02), 91-98.
- Okwu D.E., (2005).** Phytochemicals, vitamins and mineral contents of two Nigerian medicinal plants. *Int. J. Mol. Adv. Sci.*, 1(4), 375-381.
- Omosa L.K., Midiwo J.O., Mbaveng A.T., Tankeo S.B., Seukep J.A., Voukeng I.K., Dzotam J.K., Isemeki J., Derese S., Omolle R.A., Efferth T., Kuete V., (2016).** Antibacterial activities and structure– activity relationships of a panel of 48 compounds from Kenyan plants against multidrug resistant phenotypes. *Springer Plus*, 5 (1), 1-15.

Opie L.H., Lecour S., (2007). The red wine hypothesis: From concepts to protective signaling molecules. *Eur. Heart J.*, 28, 1683-1693.

Ouedraogo Y., Nacoulma O., Guissou I. P., Guede F., (2001). Evaluation *in Vivo* et *in Vitro* de la toxicité des extraits aqueux d'écorces de tige et de racines de *Mitragyna inermis* (Rubiaceae). *Pharm. Méd. Trad. Alr.*, 1, 13-29.

Oyaizu M., (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.

Özyürek M., Bektaşoğlu B., Güçlü K., Apak R., (2009). Measurement of xanthine oxidase inhibition activity of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method. *Analytica Chimica Acta*, 636, 42-50.

Palozza P., (1998). Pro-oxidant actions of Carotenoids in Biologic Systems. *Nutr. Revolution*, 56, 257-256.

Pan C., Chen Y.G., Jiang J.H., Zhang Y., (2011). Phytochemical constituents and pharmacological activities of plants from the genus *Adiantum*. *Pharmaceutical Research*, 10 (5) : 143-151.

Panche A.N., Diwan A.D., Chandra S.R., (2015). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5 (47), 1-15.

Pascual-Villalobos M. J., Robledo A., (1999). Anti-insect activity of plant extracts from the wild flora in southeastern. *Spain Biochemical Systematics and Ecology*, 27 : 1-10.

Poojary M. M., Vishnumurthy K. A., Adhikari A.V., (2015). Extraction, characterization and biological studies of phytochemicals from *Mammea suriga*. *J. Pharm. Anal.*, 5 (3), 182-189.

Poprac P., Jomova K., Simunkova M., Kollar V., Rhodes C.J., Valko M., (2017). Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38 (7), 592-607.

Potchoo Y., Richard D., Sakiè E., Guissou T.P., Kini F., Yaro B., (2008). Comparative phytochemical content of leaves extracts of two *Annona senegalensis* Pers : The one from Togo and the other originates from Burkina Faso. *Journal of Biological Sciences*, 47, 1-7.

Pradeep P., Leena P., Bohra A., (2010). *In vitro* antibacterial activity of fronds (leaves) of some important pteridophytes. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 2 (2), 19-22

Protrade H., (1994). The distillation of Essential Oils. Manufacturing and Plant Construction Handbook.

Raahman N., (2008). Phytochemical techniques. India, p. 19-24.

Rabiei Z., Setorki M., (2019). Effect of ethanol *Adiantum capillus-veneris* extract in experimental models of anxiety and depression. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55, 1-9

Radojević I., Stanković O., Topuzović M., Čomić L. and Ostojić A., 2012. Great Horestail (*Equisetum telmateia Ehrh.*): Active Substances Content and Biological Effects. *Experimental and Clinical Sciences International Journal*, 11, 59-67.

Rafińska K., Pomastowski P., Rudnicka J., Krakowska A., Maruška A., Narkute M., Buszewski B., (2019). Effect of solvent and extraction technique on composition and biological activity of *Lepidium sativum* extracts. *Food Chemistry*, 289, 16-25.

Rahman T., Hosen I., Islam T.M., Shekhar H.U., (2012). Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3, 997-1019.

Raju A., Degani M.S., Khambete M.P., Ray M.K., Rajan M.G., (2015). Antifolate activity of plant polyphenols against *Mycobacterium tuberculosis*. *Phytother. Res.*, 29, 1646-1651.

Raymond C.J., Cox M., (2010). Phytochemical Screening of the CHCl₃ and CH₃CH₂OH extract of stems, twigs, roots and barks of *Conocarpus erectus*. *International journal of academic research*, 2 (5), 36-45.

Recard I.R., Dreosti I.E., McInerney J.K., (2000). Changes in plasma antioxidant status following consumption of diets high or low in fruits and vegetables or following dietary supplementation with an antioxidant mixture. *Br. J. Nutr.*, 85, 459.

Reyes-Jurado F., Franco-Vega A., Ramírez-Corona N., Palou E., López-Malo A. (2015). Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling. *Food Engineering Reviews* 7, 275–297.

Rios J.L., Recio M.C., Villar A., (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity : A review of literature. *J. Ethnopharmacol.*, 23, 127-149.

Roger P., (2007). Expérimentation en biologie et physiologie végétale. Edition QUAE, p. 30-40.

Roy S.C., Sajeeb B.K., Abdul Muhit M., Bachar S.C., (2019). Evaluation of Antioxidant and Cytotoxic Activities of Aerial Parts of *Adiantum capillus-veneris* L. Growing in Bangladesh. *Dhaka Univ. J. Pharm. Sci.*, 18(2), 217-222.

Ruest L., Mongrain M., (1999). Protocole de laboratoire, Travaux pratiques de chimie organique et inorganique, protocole de laboratoire, faculté des sciences, université de Sherbrooke.

Salem N., Dhifi W., Graya A., Mnafeg F., Gharbi S., Khammassi S., Marzouk B., Limam F., Chekir Ben Chaouacha R., (2016). Antioxydant activity of *Silybum marianum* and *Ajuga iva* natural dyes. *International Journal of Control, Energy and Electrical Engineering*, 3 (2), 6-12.

Sales A.J., (2014). Evaluation of antibacterial activity of ethanol extract of *Lavandula stoechas* L. plant on antibiotic-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Current Research in Science*, 2 (6), 641-645.

Sandhar H.K., Kumar B., Prasher S., Tiwari P., Salhan M., Sharma P., (2011). A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Int Pharm Sci.*, 1, 25-41.

Sangameswaran B., Balakrishnan B.R., Deshraj C., Jayakar B., (2009). *In Vitro* Antioxidant Activity of Roots of *Thespesia lampas* Dalz And Gibs. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 22 (4), 368-372.

Santos L.E., Beatriz H.L.N., Sales M., Aurea P.F., Sirlei D.T., (2017). Flavonoids: Classification, Biosynthesis and Chemical Ecology. In : Justino G. C. (eds), *Flavonoids from Biosynthesis to human health*, p. 3-13. IntechOpen, Croatia.

Sanver D., Murray B.S., Sadeghpour A., Rappolt M., Nelson A.L., (2016). Experimental modeling of flavonoid-biomembrane interactions. *Langmuir*, 32, 13234-13243.

Sazada S., Arti V., Ayaz A.R., Faraha J., Mukesh K.M., (2009). Preliminary phytochemicals analysis of some important medicinal and aromatic plants. *Advances in Biological Research*, 3 (5-6), 188-195.

Schaich K.M., Tian X., Xie J., (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, 14, 111-125.

Sebai H., Selmi S., Rtibi K., Gharbi N., Sakly M., (2014). Protective effect of *Lavandula stoechas* and *Rosmarinus officinalis* essential oils against reproductive damage and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *J. Med. Food*, 18 (2), 241-9.

Selmi S., Jallouli M., Gharbi N., Marzouki L., (2015). Hepatoprotective and renoprotective effects of lavender (*Lavandula stoechas* L.) essential oils against malathion-induced oxidative stress in young male mice. *J. Med. Food*, 18 (10), 1103-11.

Senhaji S., Lamchouri F., Bouabid K., Assem N., El Haouari M., Bargach K., Toufik H., (2020). Phenolic Contents and Antioxidant Properties of Aqueous and Organic Extracts of a Moroccan *Ajuga iva* Subsp. *Pseudoiva*. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 1-19.

- Serpa R., Franca E.J.G., Furlaneto-Maia L., Andrade C.G.T.J., Diniz A., Furlaneto M.C., (2012).** *In vitro* antifungal activity of the flavonoid baicalein against *Candida* species. *J. Med. Microbiol.*, 61, 1704-1708.
- Shikha S., (2015).** A review on pharmacological uses of essential oil. *Int. J. Curr. Pharm. Rev. Res.*, 6 (1), 71-9.
- Shimada K., Fujikawa K., Yahara K., Nakamura T., (1992).** Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agr. Food Chem.*, 40, 945-948.
- Sidi Boulenouar K., Ziane A., (2003).** Etude phytochimique des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* L. de la région de Tlemcen. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'études supérieures en biologie. Option biochimie. Faculté des sciences. Université Abou Bakr Belkaid, Tlemcen.
- Silva L.N., Zimmer K.R., Macedo A.J., Trentin D.S., (2016).** Plant natural products targeting bacterial virulence factors. *Chem. Rev.*, 116 (16), 9162-9236.
- Singh A., Kukreti R., Saso L., Kukreti S., (2019).** Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, 24, 1-20.
- Singh C., Chauhan N., Upadhyay S.K., Singh R., (2020).** Phytochemistry and Ethnopharmacological Study of *Adiantum capillus-veneris* L. (Maidenhair Fern). *Plant Archives*, 20 (2), 3391-3398.
- Singh M., Singh N., Khare P.B., Rawat A.K.S., (2008).** Antimicrobial activity of some important *Adiantum* species used traditionally in indigenous systems of medicine. *J. Ethnopharmacol.*, 115, 327-329.
- Singh R., Singh S., Kumar S., Arora S., (2007).** Free radical scavenging activity of acetone extract/fractions of *Acacia auriculiformis*. *Food chemistry*, 103, 1403-1410.
- Sirohi B., Sagar R., Kori M.L., (2019).** Comparative antioxidant activity of hydroalcoholic extract of roots of *Dactylorhiza hatagirea* and aerial part of *Lavandula stoechas*. *Journal of Advances Scientific Research*, 10 (4), 311-316.
- Soares D.J., Moura N.L.G., Damaceno M.N., Souza P.A., Braga R.C., Brasil I.M., (2015).** Atividade anti-inflamatória de produtos de origem vegetal. *Saude Rev.*, 15, 33-45.
- Song Y.H., Cai H., Gu N., Qian C.F., Cao S.P., Zhao Z.M., (2011).** Icariin attenuates cardiac remodeling through down-regulating myocardial apoptosis and matrix metalloproteinase activity in rats with congestive heart failure. *J. Pharm. Pharmacol.*, 63, 541-549.

- Stocker P., Yousfi M., Djerridane O., Perrier J., Amziani R., El Boustani S., Moulin A., (2004).** Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie*, 86, 919-925.
- Sultan S., (2014).** Reviewing the protective role of antioxidants in oxidative stress caused by free radicals. *Asian Pacific Journal of Health Sciences*, 1 (4), 401-406.
- Surai P.F., Kochish I.I., Fisinin V.I., Kidd M.T., (2019).** Antioxidant Defence Systems and Oxidative Stress in Poultry Biology: An Update. *Antioxidants*, 8 (235), 2-36.
- Tai Z.; Cai L.; Dai L.; Dong L., Wang M., Yang Y., Cao Q., Ding Z., (2011).** Antioxidant activity and chemical constituents of edible flower of *Sophora viciifolia*. *Food Chem.*, 126, 1648-1654.
- Taleb-Senouci D., Ghomari H., Krouf D., Bouderbala S., Prost J., Lacaille-Dubois M.A., Bouchenak M., (2009).** Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, 16, 623-631.
- Taleb-Senouci D., Lacaille-Dubois M.A., Bouchenak M., (2012).** *Ajuga iva* extract improves reverse cholesterol transport in streptozotocin-induced diabetic rat. *J. Pharm. Pharmacol.*, 64, 1188-1194.
- Tapas A., Sakarkar D., Kakde R., (2008).** Flavonoids as nutraceuticals: A review. *Trop. J. Pharm. Res.*, 7, 1089-1099.
- Tatiya A.U., Saluja A.K., (2010).** Evaluation of phytochemical standards and *in vitro* antioxidant activity of tannins rich fraction of stem bark of *Bridelia retusa*. *International Journal of PharmTech Research*, 2 (1), 649-655.
- Troszynsta A., Ciska E., (2002).** Phenolic compounds of seeds coats of white and coloured varieties of Pea (*Pisum sativum* L.) and their total antioxidant activity. *Czech. J. Food Sci.*, 20, 15-22.
- Tsai H. Y., Ho C.T., Chen Y.Q., (2016).** Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3'-hydroxypterostilbene. *Journal of Food and Drug Analysis*, 1-13.
- Tsuda T., Horoo F., Osawa T., (2002).** Cyanidin 3-O-B-D-glucoside suppresses nitric oxide production during a Zymosan treatment in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 48, 305-310.
- Ulanowska K., Tkaczyk A., Konopa G., Wegrzyn G., (2006).** Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbiol.* 184, 271-278.

- Upton T. M., Grayer R. J., Greenham J. R., Williams C. A., Chen F. H., (2000).** Leaf flavonoids as systematic and characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28 : 991-1007.
- Van Acker S.A.B.E., Bast A., Van Der Vijgh W.J.F., (1998).** The Relationship between the Phenolic Composition and the Antioxidant Activity of Fruits and Vegetables. In: Rice-Evans C.A., Packer L. (eds.), *Flavonoids in Health and Disease*, p. 143. Marcel Dekker: New York.
- Venkata S.S.N., Kantamreddi Y., Nagendra L., Satyanarayana K., (2010).** Preliminary phytochemical analysis of some important indian plant species. *International Journal of Pharma and Bio Science*, 1 (4), 351-352.
- Vinson J.A., Su X.H., Zubik L., Bose P., (2001).** Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5315-5321.
- Wang W., Yue R., Jin Z., He L., Shen R., Du D., Tang Y. (2020).** Efficiency comparison of apigenin-7-O-glucoside and trolox in antioxidative stress and anti-inflammatory properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 72 (11), 1645–1656.
- Weirong C., Xiaohong G., Jian T., (2010).** Extraction, purification, and characterisation of the flavonoids from *Opuntia milpa alta* skin. *Czech J. Food Sci.*, 28 (2), 108-116.
- Wu L.Y., Juan C.C., Ho L.T., Hsu Y.P., Hwang L.S., (2004).** Effect of green tea supplementation on insulin sensitivity in sprague-dawley rats. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 643-648.
- Wu L.Y., Juan C.C., Ho L.T., Hsu Y.P., Hwang L.S., (2004).** Effect of green tea supplementation on insulin sensitivity in sprague-dawley rats. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 643-648.
- Xie J., Schaich K.M. (2014).** Re-evaluation of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Free Radical (DPPH) Assay for Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (19), 4251-4260.
- Xie X., Zheng Y., Liu X., Cheng C., Zhang X., Xia T., Yu S., Wang M., (2017).** Antioxidant Activity of Chinese Shanxi Aged Vinegar and Its Correlation with Polyphenols and Flavonoids During the Brewing Process. *Journal of Food Science*, 82 (10), 2479-2486.
- Xu D., Hu M.J., Wang Y.Q., Cui, Y.L., (2019).** Antioxidant Activities of Quercetin and its Complexes for Medicinal Application. *Molecules*, 24, 11-23.
- Xu H.-X., Chen J.-W., (2011).** Commercial quality, major bioactive compound content and antioxidant capacity of 12 cultivars of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruits. *J. Sci. Food Agric.*, 91, 1057-1063.

Xu J., Zhou F., Ji B.-P., Pei R.-S., Xu N., (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 47, 174-179.

Yadav A., Kumari R., Yadav A., Mishra J.P., Srivatva S., Prabha S., (2016). Antioxidants and its functions in human body - A Review. *Res. Environ. Life Sci.*, 9 (11), 1328-1331.

Yazdani M., Jookar K.F. (2021). Bioactivity of Methanolic Leaves and Stem Extracts of *Adiantum capillus-veneris* L. From Southeast of Marivan. *Plant Productions*, 43 (4), 487-496

Yoshiaki S., Yoshio I., (1999). Contribution of fern gametophytes to the growth of produced saporophytes on the basis of carbon gain. *Ecological Research*, 14 (1) : 59-69.

Yu X.D., Zheng R.B., Xie J.H., Su J.Y., Huang X.Q., Wang Y.H., Zheng Y.F., Mo Z.Z., Wu X.L., Wu D.W., (2015). Biological evaluation and molecular docking of baicalin and scutellarin as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *J. Ethnopharmacol.*, 162, 69-78.

Yuan Q., Wang J., Ruan J., (2012). Screening for Bioactive Compounds from *Adiantum capillus-veneris* L. *J. Chem. Soc. Pak.*, 34 (1), 207-216.

Zeb A., Ullah F., (2017). Reversed Phase HPLC-DAD Profiling of Carotenoids, Chlorophylls and Phenolic Compounds in *Adiantum capillus-veneris* Leaves. *Frontiers in Chemistry*, 5.

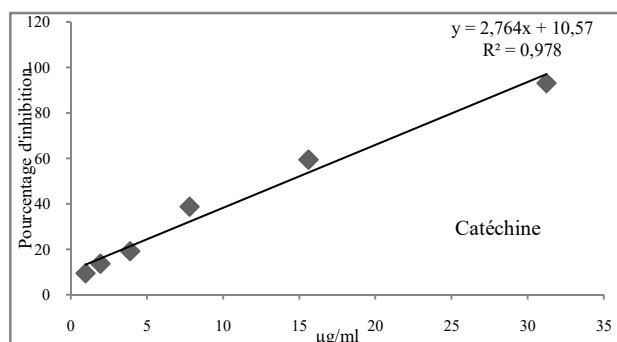
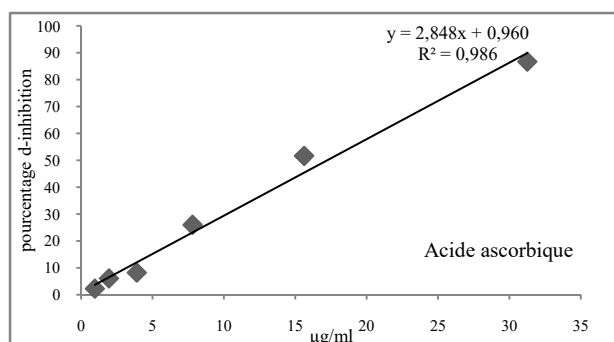
Zedan, Z., Amany, S., Ahmed, Y., Yaser, G., Phytochemical and biological studies of *Adiantum capillus-veneris* L. 2011. *Pharmaceutical Research*, 19 (02) : 65-74.

Zhao G., Gao H., Qiu J., Lu W., Wei X., (2010). The molecular mechanism of protective effects of grape seed proanthocyanidin extract on reperfusion arrhythmias in rats in vivo. *Biol. Pharm. Bull.*, 33, 759-767.

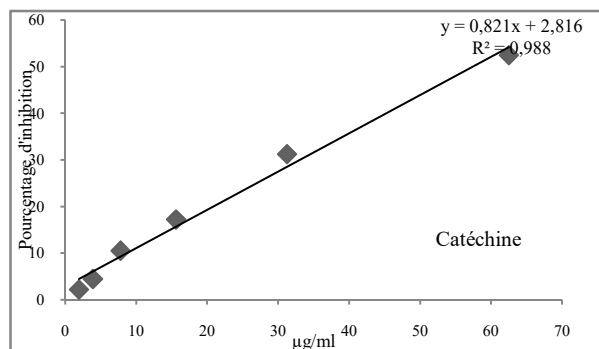
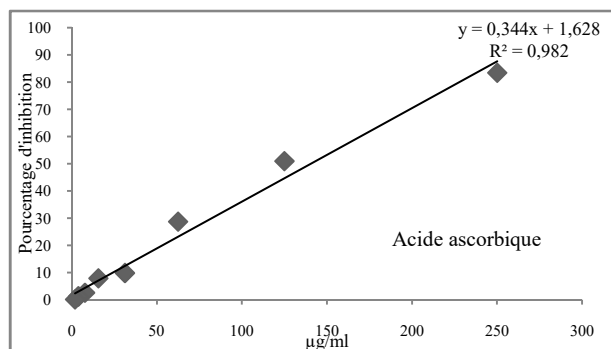
Zuzarte M., Goncalves M.J., Cavaleiro C., Cruz M.T., Benzarti A., Marongiu B., Maxia A., Piras A., Salgueiro L., (2013). Antifungal and anti-inflammatory potential of *Lavandula stoechas* and *Thymus herba-barona* essential oils. *Ind. Crop Prod.*, 44, 97-103.

Régressions linéaires : Activité antioxydante

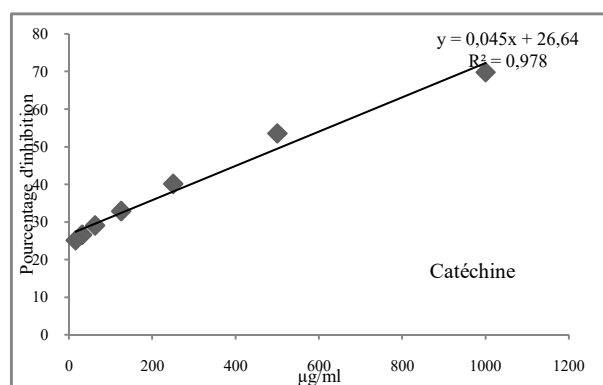
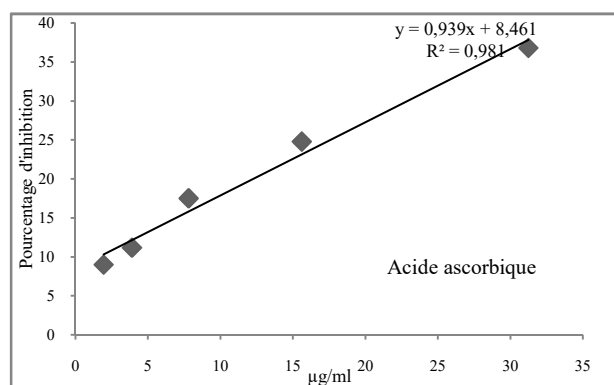
Annexe I



Inhibition du radical DPPH des standards



Réduction ferrique des standards



Antiperoxydation lipidique des standards

Composition des milieux de cultures
Annexe II

<p>Mueller Hinton(Bio Mérieux) Extrait de viande.....3g Hydrolysate acide de caseine.....17.5g Amidon.....1.5g Agar.....16g Eau distillée.....1000ml pH 7.3 Autoclaver 15mn à 121°C</p>	<p>Gélose Hektoen Protéose peptone12g Extrait de levure.....3g Chlorure de sodium.....5g Thiosulfate de sodium.....5g Sel biliaires.....9g Citrate de fer ammoniacal.....1.5g Salicine.....2g Lactose.....12g Saccharose.....12g Fuschine acide.....0.1g Bleu de bromothymol.....65mg Gélose.....13g Eau distillée.....1000ml pH 7.6</p>
<p>Bouillon nutritif Extrait de viande.....5g Peptone.....10g Chlorure de sodium.....5g Eau distillée1000ml pH 7.2</p>	<p>Chapman (milieu de Chapman gélatine) Extrait de levure.....2.5g Peptone de caséine.....10g Gélatine.....30g Lactose.....2g Mannitol.....10g Chlorure de sodium.....75g Phosphate dipotassique.....5g Gélose.....12g Eau distillée.....1000ml pH= 7</p>
<p>Gélose TCBS Peptone..... 10 g Extrait de levure.....5 g Bile de bœuf..... 8,0 g Saccharose..... 20 g Bleu de bromothymol.....40 mg Bleu de thymol.....40 mg Citrate de sodium.....10 g Thiosulfate de sodium.....10 g Citrate ferrique.....1 g NaCl.....10 g Agar.....14 g Eau distillée.....1000 ml pH = 8,6</p>	<p>Gélose de Mossel Tryptone.....10 g Extrait de viande.....1 g D-mannitol.....10 g Chlorure de sodium.....10 g Rouge de phénol.....25 mg Agar.....13,5 g Eau distillée.....1000 ml pH=7,2</p>
<p>Gélose au cétrimide Peptone de gelatine..... 16 g Peptone de caséine10 g Cétrimide..... 0,2 g Acide nalidixique 15 mg Sulfate de potassium..... 10 g Chlorure de magnesium..... 1,4 g Agar..... 10 g Eau distillée..... 1000ml pH = 7,1</p>	<p>Gélose Oxford Peptones 23 g Amidon1 g Chlorure de sodium.....5 g Esculine.....1 g Citrate ferrique ammoniacal..... 0,5 g Chlorure de lithium.....15 g Colistine sulfate..... 20 mg Céfotétan2 mg Fosfomycine.....10 mg Acriflavine5 mg Agar13 g pH=7</p>

Composition des milieux de cultures
Annexe II

Cycloheximide.....400mg

1. Analyse statistique des résultats phytochimiques

- **Métabolites primaires**

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité
Espèces	86.43	2	43.21	0.5943	0.5703
Métabolites primaires	19787.2	5	3957.44	54.42	6.27E-07
Erreur	727.20	10	72.72		
Total	20600.9	17			

- **Métabolites secondaires**

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité
Espèces	390.067	2	195.034	0.8811	0.451
Métabolites secondaires	9229.18	4	2307.29	10.42	0.002926
Erreur	1770.84	8	221.354		
Total	11390.1	14			

2. Analyse statistique des résultats des dosages des polyphénols et des flavonoïdes

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité
Composants	45330.1	7	6475.73	28.73	2.89E-07***
Espèces	8048.21	2	4024.1	17.85	0.0001407***
Erreur	3155.81	14	225.415		
Total	56534.1	23			

3. Analyse statistique des résultats des résultats de l'activité antioxydante

- **Inhibition des radicaux DPPH**

Résultats Anova à un facteur

Source des variations	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Valeur de F	Probabilité
Espèces	2	9338	4669	4.761	0.0103*
Residus	117	114744	981		
Codes significatifs	0 '***' 0.001 '***' 0.01 '*' 0.05 '!' 0.1 '' 1				

Hypothèses linéaire entre 3 espèces

Source des variations	Estimateur	Erreur standard	Valeur de F	Probabilité
<i>A. iva</i> - <i>A. cap</i>	-11.065	7.003	-1.580	0.25827
<i>L. sto</i> - <i>A. cap</i>	10.541	7.003	1.505	0.29215
<i>L. sto</i> - <i>A. iva</i>	21.606	7.003	3.085	0.00707**
Codes significatifs	0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '! 0.1 ' ' 1			

- **Pouvoir réducteur**

Résultats Anova à un facteur

Source des variations	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Valeur de F	Probabilité
Espèces	2	6.93	3.467	7.439	0.00119**
Residus	69	32.16	0.466		
Codes significatifs	0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '! 0.1 ' ' 1				

Hypothèses linéaire entre 3 espèces

Source des variations	Estimateur	Erreur standard	Valeur de F	Probabilité
<i>A. iva</i> - <i>A. cap</i>	-0.64768	0.19708	-3.286	0.00446**
<i>L. sto</i> - <i>A. cap</i>	0.02079	0.19708	0.105	0.99388
<i>L. sto</i> - <i>A. iva</i>	0.66848	0.19708	3.392	0.00325**
Codes significatifs	0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '! 0.1 ' ' 1			

- **Antiperoxydation lipidique**

Résultats Anova à un facteur

Source des variations	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Valeur de F	Probabilité
Espèces	2	8176	4088	8.95	0.000417***
Residus	57	26036	457		
Codes significatifs	0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '! 0.1 ' ' 1				

Hypothèses linéaire entre 3 espèces

Source des variations	Estimateur	Erreur standard	Valeur de F	Probabilité
<i>A. iva</i> - <i>A. cap</i>	-26.5395	6.759	-3.927	0.00068***
<i>L. sto</i> - <i>A. cap</i>	-4.053	6.759	-0.600	0.82085
<i>L. sto</i> - <i>A. iva</i>	22.487	6.759	3.327	0.00431**
Codes significatifs	0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1			

*Publications
internationales*

CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *Adiantum capillus-veneris* L. EXTRACT FROM ALGERIA

Fadhela Boukada^{1*}, Sara Sitayeb¹, Hafida Khadem²,
Boumediene Meddah¹, Fatima Zohra Soltani¹

¹University Mustapha Stambouli, Faculty of Science of Nature and Life,
Laboratory of Bioconversion, Engineering Microbiology and Health Safety,
BP. 763, Sidi Said, 29000 Mascara, Algeria

²University Ibn Khaldoun, Faculty of Science of Nature and Life, 14000 Tiaret, Algeria

*Corresponding author; E-mail: fadelaboukada6@gmail.com

(Received February 16, 2022; Accepted April 09, 2022)

ABSTRACT. The present study evaluates the antioxidant and antibacterial activities as well as the chemical composition of the aerial part of *Adiantum capillus-veneris* L., which are endemic to the flora of Algeria. The total phenolic amount of the hydromethanolic extract, as measured by the Folin-Ciocalteu reagent procedure, was found to be about 23.44 ± 0.14 mg GAE/g DW, while the flavonoid content value was 4.66 ± 0.01 mg CE/g DW, as measured by aluminum chloride colorimetric method. The antioxidant power of the extract was analyzed using the DPPH method. DPPH radicals were scavenged with an IC₅₀ value of 65.85 μ g/mL. The antibacterial activity of hydromethanolic extract against five bacterial strains of *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pneumoniae* and *Bacillus cereus* (ATCC 10876) were carried out using the disc diffusion test and the microdilution method. *Streptococcus pneumoniae* is the most sensitive bacterium with inhibition zone of 9.0 ± 1.1 cm and MIC=10 mg/mL. Based on HPLC analysis, we find that quercetin 3-O-glucoside was the most abundant compound in the plant extract. This study demonstrates that *Adiantum capillus-veneris* could be a potential natural source of antibacterial and antioxidant compounds.

Keywords: antibacterial activity, antioxidant activity, flavonoids, polyphenols, HPLC.

INTRODUCTION

Reactive oxygen species, including singlet oxygen, superoxide ion and hydrogen peroxide, are extremely reactive toxic molecules that are produced by cells during their metabolism. They are responsible for serious oxidative damage to proteins, lipids, enzymes and DNA due to covalent bonding and lipid peroxidation, with consequent tissue damage (BENABDERRAHIM *et al.*, 2019). Natural antioxidants have been of great interest owing to their ability to scavenge free radicals. Free radicals have been associated with the development of a series of diseases, including cancer, neurodegeneration, and inflammation (BABA and MALIK, 2015). The antioxidants in plants, including phenolics and flavonoids may offer a protective

effect against a wide range of diseases (GULCIN, 2012). Due to the growing need for natural antioxidants, especially in dietary preservation, plants with such potential properties should be studied more intensively.

The selection of active compounds in medicinal plants is now of great interest as these plants may serve as promising sources of new prototype antibiotics and have enormous therapeutic potential against many infectious diseases. Unlike synthetic drugs, the antibacterial activities of phytochemicals have fewer side effects (TORRES *et al.*, 2007). The development of an antibacterial agent from plants seems interesting, as it will allow the development of a phytomedicine to fight microbes. At present, many clinically active antibiotics are becoming less effective due to the development of resistance, causing serious clinical problems in the treatment of infectious diseases. Therefore, biomolecules from plant sources represent one of the alternatives in the fight against antibiotic resistance (BASTOS *et al.*, 2009).

Adiantum capillus-veneris L. (Maidenhair fern) is a tufted fern belonging to the family Pteridaceae. This species is widespread in regions with warm or tropical temperatures and high humidity (KASHKOOE *et al.*, 2021). Maidenhair fern is a hardy plant, up to 35 cm high, with an aromatic scent and a creeping rhizome. The medicinal parts are the fronds, rhizomes and roots. The plant is largely found in various regions such as southern Europe, the Atlantic coast of Ireland and northern Africa (DEHDARI *et al.*, 2018).

The aims of this study were to: (i) determine the total phenol and flavonoid contents, (ii) assess the total antioxidant and antibacterial capacity; (iii) identify and quantify the predominant phenolic compounds present in the extract by HPLC-DAD-MS analysis of *Adiantum capillus-veneris* from Algeria.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and preparation of extract

The plant was collected from Mascara, Algeria. It was cleaned and air-dried at 45°C to a constant weight and crushed to a powder. According to the conventional maceration process, which is carried out at room temperature, 100 g of plant powder was extracted by 1L of methanol/water mixture, with a ratio (85:15). The mixture was stirred overnight at 4°C and left to stand for a few hours. The floating fraction was then filtered to obtain filtrate 1, which is stored at 4°C. The extraction was repeated once, and the precipitate was made up to 1 liter with 50% methanol to give filtrate 2 which was added to filtrate 1. Thereafter, the hydromethanolic extract was condensed until dryness and stored at 4°C in dark, sealed tubes for analysis (MERGHEM *et al.*, 1995). Solutions were prepared by dilution with DMSO (dimethyl sulfoxide) for the antibacterial activity and methanol for the antioxidant potential.

Total phenolic content

Polyphenols were quantitated by spectrophotometric analysis, according to the protocol assumed by MILIAUSKAS *et al.* (2004). We proceed by mixing 1 mL of extract, 5 mL of Folin Ciocalteu (2 M) diluted 10 times and 4 mL of sodium carbonate (Na₂CO₃) at a concentration of 75 g/L. We measure the absorbance at 765 nm, after 1 hour of incubation at room temperature. The calibration curve is established with gallic acid, applying the same assay steps. All the measurements are repeated 3 times.

Total flavonoid content

The determination of flavonoids was performed using the colorimetric method described by ARDESTANI and YAZDANPARAST (2007). 500 μL of the studied extract was mixed with 2 mL of distilled water, then 150 μL of a 15% sodium nitrite solution (NaNO_2) was added. After 6 minutes, 150 μL of 10% aluminium chloride ($\text{AlCl}_3(\text{H}_2\text{O})_6$) was added to the mixture. Then 2 mL of 4% sodium hydroxide (NaOH) was introduced into the tube and the final volume was immediately made up to 5 mL. Against the blank (containing all solutions except the extract), the reading is taken by a spectrophotometer after 15 minutes at 510 nm. Simultaneously, catechin was used as a positive control, and the calibration curve was performed under the same experimental conditions.

HPLC analysis

A Shimadzu-Prominence-I-HPLC system with LC-2030 pump and photodiode array (PDA: LC-2030 / LC-2040) equipped with a surveyor UV-VIS diode array detection (DAD) and LCQ advantage max ion trap mass spectrometer equipped with an electrospray ionization (ESI) system (from Thermo fisher scientific, Waltham, MA, USA) was used for the intended HPLC analysis. The HPLC column (Supelco, 150 mm x 4.6 mm, particle size 5 μm) and the gradient were implemented for the flavonoids separation. Eluent A was aqueous acetic acid (1%, v/v) and pure methanol acetic acid was a B eluent. The separation was an isocratic stage of 2% B for 2 minutes accompanied by a linearity gradient of 2% to 20% B for 10 minutes and then 100% B for 65 min, and 100% B for 68 minutes, with a flow rate of 0.8 mL/min.

The absorption spectra were measured in the 190 to 400 nm range. The effluent chromatographic stream was directed into the mass spectrometer (MS) interface, electrospray ionization (ESI). Mass spectrometry data were acquired in the negative ionization mode at 280 nm scanning from 100 to 800 m/z under the parameters as follows: other mass spectrometer conditions were as follows: drying gas (N_2) flow: 1.5 L/min; source temperature: 350°C; temperature: 300°C, MS fragmentation energy: 1.4 V; nebulizing gas pressure: 30 psi. The phytochemical identification in the extracts was highlighted by the retention times and spectra (UV, MS) compared with literature data.

Antioxidant activity evaluation using DPPH assay

To analyze the solutions for their antiradical properties, they were firstly dissolved in methanol at different concentrations. 50 μL of these solutions are mixed with 1950 μL of a methanolic solution of DPPH (6.10^{-5} M). This mixture is stirred for 30 seconds, then incubated for 30 minutes at room temperature in the dark. The absorbance of the reaction mixture is then measured at 517 nm against a pure methanol blank (SHIMADA *et al.*, 1992). Ascorbic acid and catechin were used for comparison. The percentage of DPPH radical inhibition was calculated by the following equation:

$$I_{\text{DPPH}} \% = (A_0 - A_1 / A_0) \times 100$$

where A_0 is the absorbance of the control at 30 min, and A_1 is the absorbance of the sample at 30 min. The results were estimated in terms of IC_{50} (the concentration of extract which inhibits 50 % of free radicals present in the reaction medium) and it was calculated from the linear regression graph.

Antibacterial activity

Bacterial strains

The different bacterial strains used in this study, from Gram-positive or Gram-negative group, are *Escherichia coli* (ATCC25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC25853), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Streptococcus pneumoniae* (clinical isolated) and *Bacillus cereus* (ATCC10876). The microorganisms were supplied from the Laboratory of Bioconversion, Engineering Microbiology and Health Safety (University of Mascara, Algeria).

Disc diffusion method

The antibacterial potency was achieved by the disc diffusion method. First, the tested extract was dissolved in DMSO and filtered through a 0.45 μm sterile filter membrane. Then, 100 μL of bacterial inoculums containing 10^8 CFU/mL were spread on plates containing Mueller Hinton agar, and discs (6 mm diameter) soaked with 10 μL of extract solution (10 mg/disc) were positioned on the media surface. Two control discs were used which contained DMSO and gentamicin (10 μg /disc) as negative and positive controls, respectively. The plates were incubated for 24 h at 37°C, and experiments were done in triplicate. The diameters of the inhibition zones were measured (RIOS *et al.*, 1988).

Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC)

This test is performed using sterile 96-well microplates according to the protocol described by AKOMO *et al.* (2009). A series of twofold dilutions from 200 mg/ml to 0.39 mg/ml was prepared. 100 μL of each extract dilution was incubated with 100 μL of strain suspensions containing 10^6 CFU. The first well was used as a negative control; it was inoculated with broth only. However, the final well was used as a positive control and was inoculated with strain suspensions. The microplate was then incubated at 37°C for 24 hours. The MIC was taken as the lowest concentration for which there was no turbidity.

RESULTS AND DISCUSSION

Total polyphenol and flavonoid contents

The phenolic content is expressed as milligram equivalents of gallic acid per gram of dry extract (mgGAE/g DW). The polyphenol's result level, as presented in Tab. 1, showed that the hydromethanolic extract exhibited moderate phenolic content (23.44 ± 0.14 mg GAE/g DW). YAZDANI and KASHI (2021) reported that the total phenolic content of the methanolic extract of *A. capillus-veneris* L. was 83.62 ± 1.87 mg GAE/g DW which is much higher in comparison to our results.

The flavonoid content is expressed as milligrams of catechin equivalent per gram of dry extract (mg EC/g E). The experimental results showed that the total flavonoid content of hydromethanolic extract was (4.66 ± 0.01 mg EC/g DW).

The polyphenolic content is qualitatively and quantitatively variable from one plant to another, which can be attributed to the specificity of the chemical method of quantification of phenolic compounds, but also the nature of the standard used (EZZOUBI *et al.*, 2016). Indeed, some chemical substances used as standards tend to overestimate the concentration of the examined compounds. This is notably the case for quebracho tannins (SCHOFIELD *et al.*, 2001).

Table 1. The total phenolic and flavonoids contents and antioxidant activity of hydromethanolic extract of *Adiantum capillus-veneris*.

Phenols (mg GAE/g DW)	Flavonoids (mg CE/g DW)	IC ₅₀ DPPH (µg/mL)	IC ₅₀ DPPH (µg/mL) (Catechin)	IC ₅₀ DPPH (µg/mL) (Ascorbic acid)
23.44 ± 0,14	4.66 ± 0.01	65.85 ± 3.25	14.26 ± 1.45	17.21 ± 2.01

HPLC analysis

The chemical analysis by high-performance liquid chromatography (Fig. 1, Tab. 2), revealed the presence of gentisic acid, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid derivative, ferulic acid, kaempferol, quercetin, 3-*p*-coumaroylquinic acid, apigenin-7-*O*-glucoside, 3,5-Di-*O*-caffeoylquinic acid, isorhamnetin-3-*O*-di-glucoside, quercetin 3-*O*-glucoside, epicatechin 7-*O*-rutinoside, kaempferol 3-*O*-glucoside, ferulic acid derivatives and hydroxycinnamic derivative. Quercetin 3-*O*-glucoside (949.5 µg/g) was the major identified compound followed by 3,5-Di-*O*-caffeoylquinic acid (769.0 µg/g), hydroxycinnamic derivative (404.3 µg/g) and kaempferol 3-*O*-glucoside (359.6 µg/g).

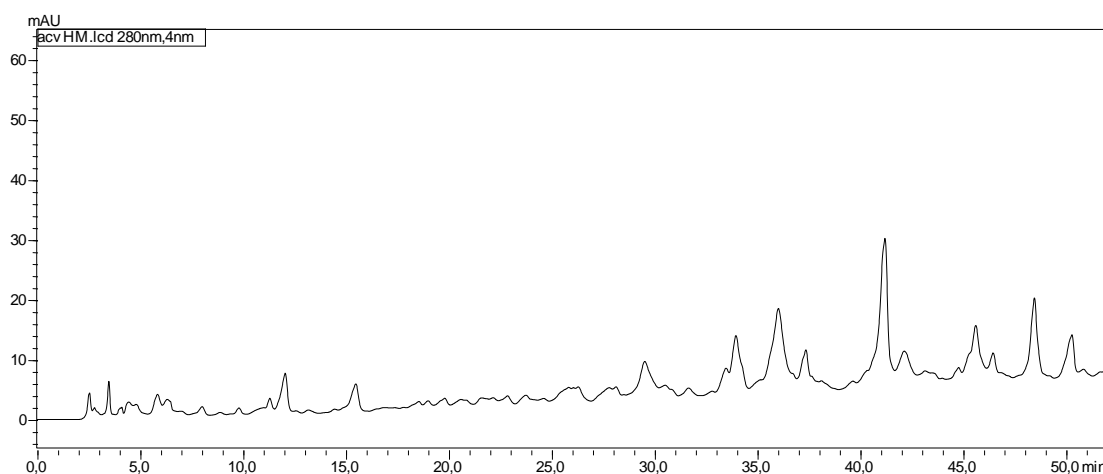


Figure 1. Representative high performance liquid chromatography profile of *Adiantum capillus-veneris* hydromethanolic extract.

YUAN *et al.* (2012) reported that the leaves of *Adiantum capillus-veneris* contain kaempferol-3-glucosides in high amounts. Similarly, ZEB and ULLAH (2017) identified kaempferol-3-sophorotrioside with the highest concentration (58.7 mg/g). In the study of AL-HALLAQ *et al.* (2015), the main polyphenolic compounds in the aqueous extract prepared by refluxing the dried coarsely powdered plant material for 15 min, were found to be ellagic acid (5.48 mg/g) and quercetin-3-*O*-glucoside (3.96 mg/g). These data are not consistent with our findings, where ellagic acid was not identified in the methanolic extract.

Extraction is an essential step in the isolation and identification of phenolic compounds. The extraction of phenolic compounds is influenced by several factors, such as the chemical nature of the phenolic compound, the extraction method, the particle size of the sample, the extraction solvent, pH and temperature, etc. (IGNAT *et al.*, 2011; HASBAY *et al.*, 2018). The choice of solvent is also vital for optimal extraction. Indeed, BAJKACZ *et al.* (2018) observed how the polyphenol content varied according to the solvents and extraction times used. As reported by LÓPEZ-FERNÁNDEZ *et al.* (2020), the most common extraction

solvents for the extraction of polyphenols are methanol, acidified methanol or combinations of methanol and water.

Furthermore, the chemical composition of plant extracts is influenced by the cultivation method, the phenological stage, the nature of the soil, the climate at the time of sampling (temperature and rainfall), as well as the constitution of the sample (stem-leaf-flower ratio) (LEE *et al.*, 2003; MILIAUSKAS *et al.*, 2004; EBRAHIMI *et al.*, 2008).

These results provide a better understanding of the composition of bioactive compounds, which may be responsible for the antioxidant and antibacterial properties of the aerial part of *A. capillus-veneris*. Indeed, quercetin and its glycosides, the majority compound, are considered a valuable functional food ingredient, and with a wide range of therapeutic applications such as anticancer, antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory uses.

Table 2. HPLC-DAD-MS identification of phenolic compounds in *Adiantum capillus-veneris* hydromethanolic extract.

Rt	Extract (µg/g)	λ max	MH-	Compounds
3.52	72.8	272	153	gentisic acid
6.43	60.9	262	353	chlorogenic acid
9.92	19.9	307	163	<i>p</i> -coumaric acid
11.07	51.8	267	489	caffeic acid derivatives
12.14	183.8	332, 283	193	ferulic acid
15.49	149.7	356, 255	284	kaempferol
25.73	108.1	271 332	301	quercetin
29.54	325.8	306, 313	337	3- <i>p</i> -coumaroylquinic acid
33.97	353.4	255 353	431	apigenin-7-O-glucoside
36.03	769.0	204 345	515	3,5-Di-O-caffeoylquinic acid
37.37	257.3	231 277	639	isorhamnetin-3-O-di-glucoside
41.21	949.5	255 353	463	quercetin 3-O-glucoside
42.15	255.5	265, 348	597	epicatechin 7-O-rutinoside
45.62	359.6	271 285	447	kaempferol 3-O-glucoside
46.46	110.1	288 414	389	ferulic acid derivatives
48.47	404.3	291 309	349	hydroxycinnamic derivative
50.30	219.6	276 435	389	ferulic acid derivatives

Antioxidant activity

The extracts showed a high DPPH radical neutralization effect, which is demonstrated by the graphical plot which traces an exponential curve with the presence of a stationary phase, which defines the almost complete reduction of DPPH to its non-radical form. The percentage of inhibition exceeds 90% at a concentration of 1000 µg/mL (Fig. 2). The minimum concentration that inhibits 50% of the DPPH radical was 65.85 ± 3.25 µg/mL. This value remains lower than those of the reference antioxidants, catechin (14.26 ± 1.45 µg/mL) and ascorbic acid (17.21 ± 2.01 µg/mL) (Tab.1).

Several studies have been conducted on the antioxidant activity of the aerial part of *Adiantum capillus veneris*. BOUDJEMA *et al.* (2020) reported that the methanolic extract of the aerial part of *Adiantum capillus veneris* harvested from Boumerdes (Algeria) has a lower antioxidant effect corresponding to an IC₅₀ value of 280 µg/mL, which is even four times higher than the value obtained in our study.

The scavenger effect of the extract on free radicals is depending on the existence of free OH groups, in particular 3-OH, with a 3',4'-rthodihydroxy configuration (HEIM *et al.*, 2002).

In our current work, the largest amount of phenolic compound was quercetin 3-O-glucoside. It is determined by multiple studies that quercetin act as a potent main antioxidant as its capacity to directly reduce, scavenging and bleaching free radicals (OZGEN *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2019). Therefore, the existence of quercetin in the hydromethanol extract might play a significant role in increasing its primary antioxidant activity.

3,5-Di-O-caffeoylquinic acid was the second most abundant compound of the plant sample. Owing to an ortho-dihydroxy phenyl ring, caffeoylquinic acid derivatives are known as both efficient free radical scavengers and metal ion chelators (HUNG *et al.*, 2006).

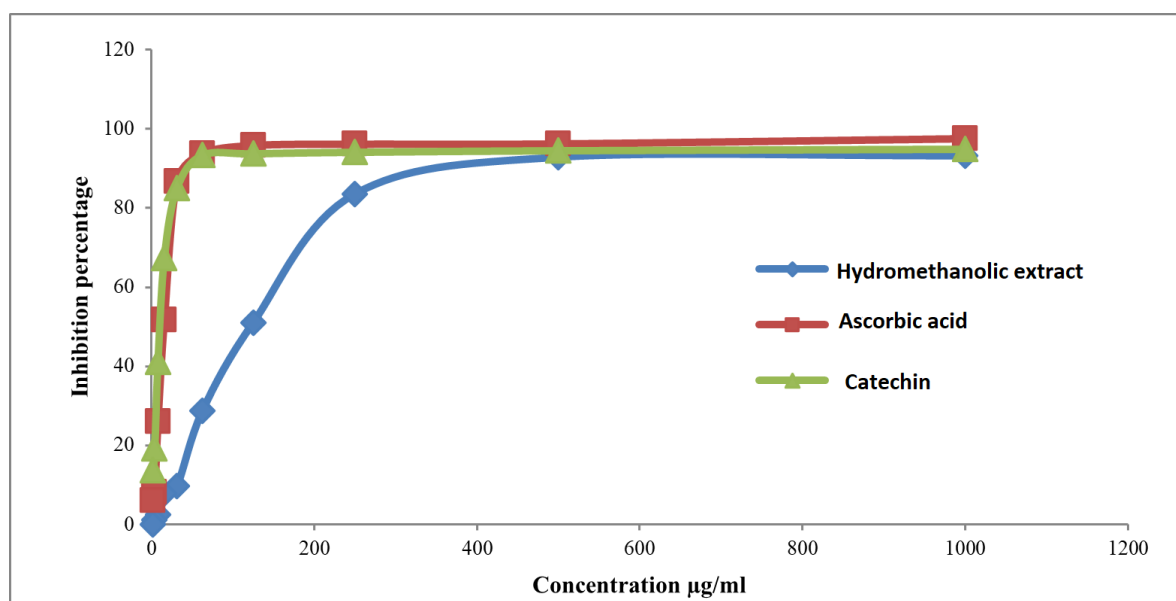


Figure 2. Antioxidant power tested by the DPPH radical scavenging method of hydromethanolic extract from *Adiantum capillus-veneris*.

Antibacterial activity

According to the results presented in Table 3, the hydromethanolic extract revealed zones of inhibition against *E. coli*, *S. pneumoniae* and *S. aureus* (10.0 ± 0.9 , 9.0 ± 1.1 , 6.0 ± 1.7 respectively). It is obvious from the result presented here that *A. capillus-veneris* extracts have no antimicrobial efficacy against *P. aeruginosa* and *B. cereus*. The minimum inhibitory concentration was 10 mg/mL^{-1} . Our results confirmed the results of BESHARAT *et al.* (2009), who showed that the ethanolic extract of the aerial parts of *A. capillus-veneris* does not have antimicrobial capabilities against *P. aeruginosa*.

According to LIMA *et al.* (2019) phenolic compounds have interesting antibacterial power against pathogenic bacteria. These compounds can act in several ways to destroy bacteria, including inhibiting the nucleic acid synthesis and the plasma membrane and disrupting enzymatic activity or energy metabolism of bacteria (CUSHNIE and LAMB, 2005).

Two flavonoids (quercetin 3-O-glucoside and kaempferol 3-O-glucoside) and two phenolic acids (3,5-Di-O-caffeoylquinic acid and hydroxycinnamic derivative) were the most abundant compounds of the plant sample (Tab. 2).

The antibacterial activities of phenolic acids have been demonstrated in various studies on different pathogens (LOW and DONACHIE, 1997; STOJKOVIĆ *et al.*, 2013). It was found that phenolic acids had antimicrobial activity against *P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. aureus*. Phenolic acids have been shown to have potent antibacterial and antibiofilm properties against

emerging nosocomial pathogens (KARUNANIDHI *et al.*, 2013). LI *et al.* (2014) have investigated the influence of subinhibitory concentrations of phenolic acids on factors associated with the virulence of enterotoxigenic *S. aureus*. At subinhibitory concentrations (1.25 mg/mL), phenolic acids significantly inhibited hemolysis and coagulase titer. Reduced fibrinogen binding and decreased production of enterotoxins were observed at concentrations ranging from 1/16 MIC to 1/2MIC (LI *et al.*, 2014).

Flavonols, such as quercetin and its derivatives and kaempferol and its derivatives, are among the most important class of flavonoids that show potent antibacterial activities. Quercetin and its derivatives showed significant antibacterial activity against some strains of bacteria, including *S. aureus*, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), and *Staphylococcus epidermidis* (GEOGHEGAN *et al.*, 2010). In another study, among the nine flavonoids (from the leaves of *Scutellaria oblonga* Benth), quercetin-3Oglucoside could successfully kill *S. aureus* and a reduction in biofilms (90-95%) was observed (RAJENDRAN *et al.*, 2016).

Table 3. Antibacterial activity of the hydromethanolic extract of *Adiantum capillus-veneris*.

	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. pneumoniae</i>
Inhibition zone diameter (mm)	6.0 ± 1.7	0.00	10.0 ± 0.9	0.00	9.0 ± 1,1
MIC (mg/mL)	10	ND	10	ND	10

CONCLUSION

This research provides data on the chemical and biological characterization of *Adiantum capillus-veneris*. In the hydromethanolic extract, nine phenolic acids and five flavonoids were detected by HPLC-MS. The antioxidant activity, estimated using the DPPH assay, revealed that the *A. capillus-veneris* extract had high antioxidant potential, in agreement with the total polyphenolic content. The *A. capillus-veneris* extract showed moderate antimicrobial activity against the tested bacterial strains. These results reinforce the importance of this species and widen new research perspectives as well as the design of new plant-based drugs sourced from indigenous plant material.

References:

- [1] AKOMO, E.F.O., ZONGO, C., KAROU, S.D., OBAME, L.C., SAVADOGO, A., ATTEK, C., TRAORE, A.S. (2009): *In vitro* antiplasmodial and antibacterial activities of *Canthium multiflorum* Schum and Thonn (Rubiaceae) extracts. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **12** (12): 919–923. doi: 10.3923/pjbs.2009.919.923.
- [2] AL-HALLAQ, E.K., LITESCU, S.C., KASABRI, V., ABDUL-RAZZAK, K.K., ABAZA, I.M., AFIFI, F.U. (2015): Hypocholesterolemic effects of *Adiantum capillus-veneris* L. aqueous extract in high cholesterol diet-fed rats and HPLC-MS determination of its polyphenolics. *Revue Roumaine de Chimie* **60** (4): 357–365.
- [3] ARDESTANI, A., YAZDANPARAST, R., (2007): Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on *in vitro* protein glycoxidation. *Food and Chemical Toxicology* **45** (12): 2402–2411. doi: 10.1016/j.fct.2007.06.020

- [4] BABA S.A., MALIK S.A. (2015): Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *Journal of Taibah University for Science* **9** (4): 449–454. doi: 10.1016/j.jtusci.2014.11.001
- [5] BAJKACZ, S., BARANOWSKA, I., BUSZEWSKI, B., KOWALSKI, B., LIGOR, M. (2018): Determination of flavonoids and phenolic acids in plant materials using SLE-SPE-UHPLC-MS/MS method. *Food Analytical Methods* **11**: 3563–3575. doi: 10.1007/s12161-018-1332-9
- [6] BASTOS, A.M., LIMA, F.M., CONSERVA, L.M., ANDRADE, V.S., ROCHA, E.M., LEMOS, R.P. (2009): Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae) extracts and their main constituents. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **8**, 16. doi: 10.1186/1476-0711-8-16
- [7] BENABDERRAHIM, M.A., YAHIA, Y., BETTAIEB, I., ELFALLEH, W., NAGAZ, K. (2019): Antioxidant activity and phenolic profile of a collection of medicinal plants from Tunisian arid and Saharan regions. *Industrial Crops and Products* **138**: 111427. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.05.076.
- [8] BESHARAT, M., RAHIMIAN, M., GHAEMI, E., BESHARAT, S. (2009): Effect of ethanolic extract of *Adiantum capillus-veneris* in comparison with gentamicine on 3 pathogenic bacteria *in vitro*. *Pharmaceutical Sciences* **15** (1): 49–52.
- [9] BOUDJEMA, K., BENMANSOUR, F., GHEZALI, S., OUAMAR, L., HALI, L., FAZOUANE, F. (2020): Phytochemical screening and evaluation of some biological activities of plant extracts *Adiantum capillus-veneris* L. and *Tamarix gallica* L. *African Review of Science, Technology and Development* **5** (2): 70–85.
- [10] CUSHNIE, T.T., LAMB, A.J., (2005): Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* **26** (5): 343–356. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002
- [11] DEHDARI, S., HAJIMEHDIPOOR, H. (2018): Medicinal Properties of *Adiantum capillus-veneris* Linn. in Traditional Medicine and Modern Phytotherapy: A review article. *Iranian Journal of Public Health* **47** (2): 188–197.
- [12] EBRAHIMI, N.S., HADIAN, J., MIRJALILI, M.H., SONBOLI, A., YOUSEFZADI, M. (2008): Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food chemistry* **110** (4): 927–931. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.02.083
- [13] EZZOUBI, Y., BOUSTA, D., EL MANSOURI, L., BOUKHIRA, S., SIHAM, L., ACHOUR, S., FARAH, A. (2016): Phytochemical screening, anti-inflammatory activity and acute toxicity of hydro-ethanolic, flavonoid, Tannin and Mucilage Extracts of *Lavandula stoechas* L. from Morocco. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* **8** (1): 31–7.
- [14] GEOGHEGAN, F., WONG, R., RABIE, A. (2010): Inhibitory effect of quercetin on periodontal pathogens *in vitro*. *Phytotherapy Research* **24** (6): 817–820.
- [15] GULCIN, I. (2012): Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology* **86**: 345–391.

- [16] HASBAY, I., GALANAKIS, C.M. (2018): Recovery technologies and encapsulation techniques. In: Galanakis, C.M. (eds) *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands: 233–264.
- [17] HEIM, K.E., TAGLIAFERRO, A.R., BOBILYA, D.J. (2002): Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* **13**: 572–584. doi: 10.1016/s0955-2863(02)00208-5
- [18] HUNG, T.M., NA, M.K., THUONG, P.T., SU, N.D., SOK, D.E., SONG, K.S., SEONG, Y.H., BAE, K.H. (2006): Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall. *Journal of Ethnopharmacology* **108** (2): 188–192. doi: 10.1016/j.jep.2006.04.029.
- [19] IGNAT, I., VOLF, I., POPA, V.I. (2011): A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* **126** (4): 1821–1835. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.12.026
- [20] KARUNANIDHI, A., THOMAS, R., VAN BELKUM, A., NEELA, V. (2013): *In vitro* antibacterial and antibiofilm activities of chlorogenic acid against clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* including the trimethoprim/sulfamethoxazole resistant strain. *BioMed Research International*: 7 pages, Article ID 392058. doi: 10.1155/2013/392058.
- [21] KASHKOE, A., SARDARI, F. A., MEHRABADI, M.M., ZARSHENAS, M.M.A. (2021): Review of pharmacological properties and toxicological effects of *Adiantum capillus-veneris* L. *Current Drug Discovery Technologies* **18** (2): 186–193. doi: 10.2174/1570163817666200316111445
- [22] LEE, K.W., KIM, Y.J., LEE, H.J., LEE, C.Y. (2003): Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food chemistry* **51**: 7292–7295. doi: 10.1021/jf0344385
- [23] LI, G., QIAO, M., GUO, Y., WANG, X., XU, Y., XIA, X. (2014): Effect of subinhibitory concentrations of chlorogenic acid on reducing the virulence factor production by *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathogens and Disease* **11** (9): 677–683. doi: 10.1089/fpd.2013.1731
- [24] LIMA, M.C., PAIVA DE SOUSA, C., FERNANDEZ-PRADA, C., HAREL, J., DUBREUIL, J.D. (2019): A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis* **130**: 259–270. doi: 10.1016/j.micpath.2019.03.025
- [25] LÓPEZ-FERNÁNDEZ, O., DOMÍNGUEZ, R., PATEIRO, M., MUNEKATA, P.E.S., ROCCHETTI, G., LORENZO, G.M. (2020): Determination of polyphenols using liquid Chromatography tandem mass spectrometry technique (LC–MS/MS): A review. *Antioxidants* **9** (6): 479. doi: 10.3390/antiox9060479
- [26] LOW, J. C., DONACHIE, W. (1997): A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *The Veterinary Journal* **153** (1): 9–29. doi: 10.1016/s1090-0233(97)80005-6
- [27] MERGHEM, R., JAY, M., VIRICEL, M.R., BAYET, C., VOIRIN, B., (1995): Five 8-C-benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiataea). *Phytochemistry* **38** (3): 637–640. doi: 10.1016/0031-9422(94)00578-H

- [28] MILIAUSKAS, G., VENSKUTONIS, P.R., VAN BEEK, T.A. (2004): Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food chemistry* **85** (2): 231–237. doi: 10.1016/j.foodchem.2003.05.007
- [29] OZGEN, S., KILINC, O.K., SELAMOGLU, Z. (2016): Antioxidant activity of quercetin: a mechanistic review. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology* **4** (12): 1134–1138. doi: 10.24925/turjaf.v4i12.1134-1138.1069
- [30] RAJENDRAN, N., SUBRAMANIAM, S., CHRISTENA, L. R., MUTHURAMAN, M. S., SUBRAMANIAN, N. S., PEMIAH, B., SIVASUBRAMANIAN, A. (2016): Antimicrobial flavonoids isolated from Indian medicinal plant *Scutellaria oblonga* inhibit biofilms formed by common food pathogens. *Natural Product Research* **30** (17): 2002–2006. doi: 10.1080/14786419.2015.1104673
- [31] RIOS, J.L., RECIO, M.C., VILLAR, A., (1988): Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of literature. *Journal of Ethnopharmacology* **23** (2–3): 127–149. doi: 10.1016/0378-8741(88)90001-3
- [32] SCHOFIELD, P., MBUGUA, D.M., PELL, A.N. (2001): Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology* **91** (1–2): 21–40. doi: 10.1016/s0377-8401(01)00228-0
- [32] SHIMADA, K., FUJIKAWA, K., YAHARA, K., Nakamura, T. (1992): Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40** (6): 945–948. doi: 10.1021/jf00018a005
- [33] STOJKOVIĆ, D.S., ŽIVKOVIĆ, J. SOKOVIĆ, M., GLAMOČLIJA, J., FERREIRA, I.C.F.R., JANKOVIĆ, T., MAKSIMOVIĆ, Z. (2013): Antibacterial activity of *Veronica montana* L. extract and of protocatechuic acid incorporated in a food system. *Food and Chemical Toxicology* **55**: 209–213. doi: 10.1016/j.fct.2013.01.005
- [35] TORRES, J.A., VILLEGAS, M.V., QUINN, J.P. (2007): Current concepts in antibiotic-resistant Gram-negative bacteria. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* **5** (5): 833–43. doi: 10.1586/14787210.5.5.833
- [34] XU, D., HU, M-J., WANG, Y-Q., CUI, Y-L. (2019): Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. *Molecules* **24**: 1123. doi: 10.3390/molecules24061123.
- [35] YAZDANI, M., KASHI, F.K. (2021): Bioactivity of methanolic leaves and stem extracts of *Adiantum capillus-veneris* L. from southeast of Marivan. *Journal of Plant Productions* **43** (4): 487–496. doi: 10.22055/PPD.2020.29309.1757
- [36] YUAN, Q., WANG, J., RUAN, J. (2012): Screening for bioactive compounds from *Adiantum capillus-veneris* L. *Journal of the Chemical Society of Pakistan* **34** (1): 207–216.
- [37] ZEB, A., ULLAH, F. (2017): Reversed phase HPLC-DAD profiling of carotenoids, chlorophylls and phenolic compounds in *Adiantum capillus-veneris* Leaves. *Frontiers in Chemistry* **5**. doi: 10.3389/fchem.2017.00029.

FLAVONOIDS FROM AERIAL PART OF ALGERIAN *AJUGA IVA* (L.) SCHREB.: THE HPLC-UV ANALYSIS AND ANTIOXIDANT CAPACITY

Fadhela Boukada*, Boumediene Meddah

University of Mascara, Faculty of Science of Nature and Life
BP. 763 (UN 2901), Sidi Said, Mascara, Algeria

*Corresponding author; E-mail: fadelaboukada6@gmail.com

(Received January 9, 2021; Accepted May 5, 2021)

ABSTRACT. The study deals with the evaluation of the antioxidant capacity of extracts from the aerial part of Algerian *Ajuga iva*. Extraction of flavonoids was carried out by 85% of methanol, then the crude extract was successively separated with ethyl acetate, butanol, and water. The *in vitro* antioxidant activity was assessed by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, reducing power, and thiobarbituric acid reacting substances assays. Extracts are subject to HPLC-UV analysis. The average total phenol contents of extracts vary between 3.87 ± 0.17 and 149.74 ± 3.94 (gallic acid equivalent per gram of dry extract). Furthermore, tested extracts exhibited a broad range of flavonoid contents varying from 1.54 ± 0.09 to 41.18 ± 1.03 (catechin equivalent per gram of dry extract). Butanol and ethyl acetate fractions displayed the highest antioxidant activity. A good correlation between the phenolic and flavonoid contents and the antioxidant activity was observed. Rutin, caffeic acid, quercetin, *p*-coumaric acid, luteolin, and cinnamic acid were present in the extracts. The plant could be a potential source of antioxidant agents.

Keywords: Antioxidant effect, flavonoids, polyphenols, HPLC.

INTRODUCTION

The history of medicinal plants is associated with the evolution of civilizations. In all regions of the world, the history of peoples shows that these plants have always occupied an important place in medicine since antiquity. It was only in the 20th century that scientists became interested in this subject (JANSSEN *et al.*, 1976).

The activities of these curative plants are evaluated by their chemical components. Plants synthesize secondary metabolites, which are molecules that are indirectly essential to the functioning of plants, as opposed to primary metabolites that are vital for vegetal life (FAVIER, 2003). Flavonoids are secondary metabolites and an unusually large group of naturally occurring phenolic compounds ubiquitously distributed in plants. The past two decades has witnessed a renewed interest in the study of flavonoids and of their biological interactions. Flavonoids are known for their pharmacological, biochemical properties, and antioxidant activities (CROZIER *et al.*, 2006).

Several studies have shown that flavonoids have great potential as antioxidants agents. In addition, a lot of research is currently being done on natural antioxidants that act as free radical scavengers. The excessive production of these radicals can be harmful to the body, they damage many cellular components as diverse as proteins, lipids, or DNA, causing oxidative stress (VAN ACKER *et al.*, 1998).

A wide range of analytical techniques is used for the characterization of flavonoids extracted from medicinal plants, including high performance liquid chromatography (HPLC), either single or coupled with mass spectrometry. In recent years, HPLC has been the analytical method that has dominated the determination of flavonoids (ROBBINS, 2003).

Thanks to geographical location Algeria is home to rich and diverse vegetation. The genus *Ajuga* that belongs to the family Lamiaceae comprises at least 301 species (ZAFAR and BADIÀA, 2009). Flavonoids and tannins are found in large quantities in *Ajuga iva*. It also contains anthocyanins, phenolic acids, and other substances, in particular ajugarin (EL HILALY *et al.*, 2004). *Ajuga iva* is an aromatic plant that grows from spring to late summer, in deep soils at 2700 m altitude. It is widespread in the Mediterranean region: southern Europe and northern Africa, especially in Algeria, Morocco, Tunisia, and Egypt (BATANOUNY *et al.*, 1999). This small, bitter-tasting perennial, 5-10 cm long, with creeping, hairy green stems, has oblong to linear, pubescent leaves, 14 to 35 mm long. The flowers are purple, pink, or yellow, 20 mm long (HALIMI, 2004). This plant species has already been the subject of several studies, which show a broad spectrum of biological effects of extracts and essential oils including hypoglycemic (CHABANE *et al.*, 2013), anti-inflammatory (BOUDERBALA *et al.*, 2008), antimicrobial (ZERROUG *et al.*, 2011), and antioxidant (TALEB-SENOUCI *et al.*, 2009).

The aim of this work is to study the phenolic content of aqueous methanolic extracts and their solvent fractions of *A. iva* collected from Algeria. As well as the antioxidant potential was evaluated by employing DPPH radical-scavenging, reducing power, and lipid peroxidation assays to establish a possible correlation between polyphenol and flavonoid contents and antioxidant activity.

MATERIAL AND METHODS

Plant material, extraction, and separation

The plant was collected from Mascara, Algeria and was botanically identified by Dr. Righi Kada in the agricultural science department at the University of Mascara Mustapha Stambouli. The plant material was dried at room temperature and ground into powder using a shredder. The plant powder (100 g) was extracted by the classical method of maceration at room temperature with 85% of methanol according to the protocol described by MERGHEM *et al.* (1995) to obtain the crude extract. The hydromethanolic extract was evaporated and then dissolved in distilled water. The solution was successively partitioned with ethyl acetate, butanol, and water.

Total phenolic content

The total phenolic content was determined following the protocol applied by MILIAUSKAS *et al.* (2004). In a test tube, 1 mL of known concentration extract was mixed with 5 mL of Folin-ciocalteu reagent (2M) diluted 10 times and 4 mL of a 75 g/L sodium carbonate solution (Na₂CO₃). The absorbance was measured at 765 nm after incubation for 1 hour at room temperature. The calibration curve is made by gallic acid. The amount of phenolic content was calculated as gallic acid equivalent per gram of dry extract (mg GAE/g DE).

Total flavonoid content

The total flavonoid content was determined according to the method adopted by ARDESTANI and YAZDANPARAST (2007). Each extract solution (500 μL) was mixed with 2 mL of distilled water and 150 μL of NaNO_2 solution (15 %). After 6 min, 150 μL of AlCl_3 solution (10%) was added, the mixture is left for 6 min. After that, 2 mL of NaOH solution (4%) was added. Immediately, the mixture was completed with distilled water until the volume reached 5 mL. After 15 min of incubation, the absorbance was measured at 510 nm against a blank containing all the solutions except extract. The calibration curve is made by catechin. Results were expressed as catechin equivalent per gram of dry extract (mgCE/g DE).

Antioxidant activity

The antioxidant activity of the samples was investigated using three methods: DPPH radical assay, reducing power assay, and thiobarbituric acid reacting substances assay.

DPPH radical assay

A volume of 50 μL of various concentrations of the extracts in methanol was added to 1950 μL of a methanol solution DPPH (6.10^{-5} M), this mixture is strongly stirred for 30 seconds. Then, incubated for 30 min at room temperature in the dark. Absorbance was measured at 517 nm using methanol as blank (SHIMADA *et al.*, 1992). Ascorbic acid and catechin were used as a positive control. The percentage inhibition (*PI*) of free radical formation was calculated according to the following formula:

$$PI = (1 - A_1/A_0) \times 100 \quad (1)$$

where A_1 is the absorbance of the extract and A_0 is the absorbance of the control. The results were estimated in terms of IC_{50} (the concentration of extract which inhibits 50 % of free radicals present in the reaction medium). And it was calculated from the graph plotted of linear regression.

Ferric reducing antioxidant power assay

The reducing power of samples was determined as per the reported method of OYAZU (1996). A quantity of 1 mL of each extract was mixed with 2.5 mL of sodium phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 2.5 mL of potassium ferricyanide (1%). After incubation for 20 min at 50°C , 2.5 mL of trichloroacetic (10%) was added. After that, the mixture was centrifuged at 3000 rpm for 10 mn. In a test tube, 2.5 mL of the upper layer fraction was mixed with 2.5 mL of distilled water and 0.5 mL of ferric chloride (0.1%). The absorbance was measured at 700 nm and compared with standards. Increased absorbance of the reaction mixture indicated stronger reducing power. EC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) value is the effective concentration giving an absorbance of 0,5 for reducing power and it was obtained from linear regression analysis.

Thiobarbituric acid reacting substances assay (TBAR)

The anti-lipid peroxidation ability was assessed following the method described by TRIPATHI and SINGH (2001). In a test tube, 0.5 mL of rat liver homogenate (KCl 0.15 M) at a rate of 10%, 1 mL of potassium chloride (0.15 M), and 0.5 mL of extract solution were mixed. Then, 100 μL of ferric chloride (1 mM) was added to initiate the lipid peroxidation. After incubation for 30 min at 37°C , the reaction was stopped by adding 2 mL of ice-cold hydrogen chloride (0.25 N) containing trichloroacetic acid (15%) and thiobarbituric acid

(0.38%), and 0.2 mL of butylated hydroxyl toluene (0.05%). The reaction mixtures were heated at 80°C for 60 min, cooled, and centrifuged at 6900 rpm for 15 min. The absorbance of the upper layer fraction was measured at 532 nm against a blank (contained all reagents without liver homogenate and drug). Synthetic antioxidants (ascorbic acid and catechin) were used as a positive control. The percentage of anti-lipid peroxidation (% ALP) was determined by following formula:

$$\%ALP = (A_{FeCl_3} - A_{extract}) \times 100 / A_{FeCl_3} - A_{normal} \quad (2)$$

A_{FeCl_3} : absorbance that indicates the level of lipid peroxidation (the reaction medium contained all the reagents without FeCl₃ and without extract).

$A_{extract}$: absorbance that indicates the level of anti-lipid peroxidation (the reaction medium contained all the reagents).

A_{normal} : absorbance of the reaction medium which contained all reagents except extract and FeCl₃.

IC₅₀ is the value that corresponds to 50% of anti-lipid peroxidation, and it was obtained from linear regression analysis.

HPLC analysis

HPLC analysis of standards and extracts was performed using a Shimadzu Prominence-I HPLC apparatus equipped with LC-2030 pump and a photodiode array detector (PDA: LC-2030/2040). Flavonoids were separated on a C-18 reverse phase HPLC column (Supelco, 150 mm x 4.6 mm, particle size 5 µm) at 25°C. Eluent A was the acetic acid aqueous solution (1%) and eluent B was a methanol acetic acid solution. Separation was performed in an isocratic step at 2% of B for 2 min followed by a linear gradient from 2% to 20% of B in 10 min, then to 100% of B in 65 min and 100% of B in 68 min with a flow rate at 0.8 mL/min. Flavonoids were identified by comparing their retention times and corresponding UV-Vis absorption spectra with standards.

Correlation analysis

Results were expressed as Mean±standard deviation (SD) of five separate experiments using Excel. Correlation coefficients between the total phenolic and flavonoid contents were determined from linear regression analysis using Excel.

RESULTS AND DISCUSSION

Total phenol and flavonoid content

The results of the levels of phenolic and flavonoid contents, as presented in Table 1, showed that the highest values of polyphenol were recorded in the ethyl acetate (149.74 ± 3.94 mg GAE/g DE) and butanolic fractions (50.09 ± 1.27 mg GAE/g DE), while the aqueous fraction showed the lowest values (3.87 ± 0.17 mg GAE/g DE). This order of fractions was confirmed by the results of ADJADJ (2009) who found that the ethyl acetate fraction is the richest in polyphenols and the aqueous fraction is the poorest. The contents obtained in our study are not in agreement with previous reports that proved that methanol and water are the most effective solvents for the extraction of polyphenols (MAKNI *et al.*, 2013).

Flavonoids content of the investigated extracts varied from 1.54 ± 0.09 to 41.18 ± 1.03 mg CE/g DE (Table 1). The highest total flavonoid contents were found in the butanolic extract followed by the ethyl acetate fraction. Moreover, the lowest flavonoid contents were

registered in the aqueous extract. These results indicate that flavonoids were better soluble in butanol and ethyl acetate. Our results are consistent with those conducted by ANOKWURU *et al.* (2011) where ethyl acetate was found to be the best solvent for the extraction of flavonoids. The variation of the phenolic and flavonoid contents might be due to the variation in procedure extraction, geographical conditions (EBRAHIMI *et al.*, 2008).

Table 1. The total phenolic and flavonoid contents of extracts.

Medicinal plant		Total phenolics	Flavonoids
<i>Ajuga iva</i>	Extract/Fractions	(mg GAE/g DE)	(mg CE/g DE)
	Crude	10.75 ± 0.13	5.43 ± 0.45
	Ethyl acetate	149.74 ± 3.94	34.61 ± 3.01
	Butanolic	50.09 ± 1.27	41.18 ± 1.03
	Aqueous	3.87 ± 0.17	1.54 ± 0.09

Each value represents the mean ± SD (n=5)

Antioxidant activity

DPPH radical scavenging

In this study, the DPPH method was chosen to evaluate the antioxidant activity of the extracts, because it is one of the fastest, simplest, and most effective methods due to the great stability of the DPPH radical (BOZIN *et al.*, 2008).

As demonstrated in Table 2, all the extracts proved to have high antioxidant activities (between 39.53 µg/mL and 512.25 µg/mL). The ranking of IC₅₀ values is: ethyl acetate extract > butanolic extract > crude extract > aqueous extract. Our results confirmed previous studies showing an important antioxidant activity of *Ajuga iva* extracts in other regions of its area (BAGHIANI *et al.*, 2011). The essential oils extracted from Tunisian *A. iva* exhibited a potent DPPH radical scavenging effect (AYARI *et al.*, 2013).

The mechanism of the reaction between antioxidant and DPPH radical depends on the structural conformation of the antioxidant (KOURI *et al.*, 2007). According to the literature, polyphenols and flavonoids are very effective as agents reducing oxidative stress (Molyneux, 2004). From our results, it is clear that all the extracts can donate an electron to DPPH radical, so the DPPH radical scavenging effect could depend on the number of hydroxyl substituents (CAO *et al.*, 1997).

Ferric reducing antioxidant power assay

In this assay, the presence of reducing agents causes the reduction of the Fe⁺³ ferrocyanide complex to the Fe⁺² form. Indeed, the formation of Fe⁺² can be monitored spectrophotometrically by measuring the absorbance of the blue color of the ferrous complex at 700 nm (KARAZOGLER *et al.*, 2008). An increase in absorbance at this wavelength means stronger reducing power of the extracts (OZTURK *et al.*, 2007).

Table 2 shows the reductive capability of extracts compared to ascorbic acid and catechin as standards. The ethyl acetate extract showed stronger reducing power (EC₅₀ = 780.16 ± 1.56 µg/mL) than other extracts. However, the reduction power of ascorbic acid (EC₅₀ = 49.09 ± 0.23 µg/mL) and catechin (EC₅₀ = 46.82 ± 1.01 µg/mL) was more pronounced than that of different extracts of *Ajuga iva*. This activity confirms the results of the DPPH radical-scavenging activity. BAGHIANI *et al.* (2011) found that extracts of *Ajuga iva* give a reduction power better than standards.

A study conducted on the ability of iron reduction by phenols indicated that the catechol nucleus is the only structure that is positively associated with reducing power. According to this study, this structure increases the reducing power of a compound to 36% compared to another which does not contain one. They suggested that this activity was due to the participation of the groups –OH linked to the catechol nucleus (DEGRAFT-JOHNSON *et al.*, 2007).

Table 2. Antioxidant activities for extracts and standards

Medicinal plant	Extract / Fractions	IC ₅₀ /DPPH (µg/mL)	EC ₅₀ /Reducing power (µg/mL)	IC ₅₀ /ALP (µg/mL)
<i>Ajuga iva</i>	Crude	55.04 ± 2.23	2352 ± 1.43	1569.85 ± 2.38
	Ethyl acetate	39.53 ± 1.39	780.16 ± 1.56	419.63 ± 1.71
	Butanolic	44.17 ± 0.43	1173.52 ± 2.89	507.88 ± 0.47
	Aqueous	512.25 ± 1.56	4531.83 ± 1.09	2231.83 ± 2.53
Standards	Ascorbic acid	17.21 ± 0.67	49.09 ± 0.23	208.85 ± 1.55
	Catechin	14.26 ± 0.49	46.82 ± 1.01	49.25 ± 1.02

Thiobarbituric acid reacting substances assay

In this assay, malondialdehyde (MDA) is one of the final products of fatty acid peroxidation. MDA was measured spectrophotometrically at 532 nm by a thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) method (FARAHMAND *et al.*, 2013).

The butanolic and ethyl acetate phases exhibit a good lipid anti-peroxidation capacity. The strongest activity was exhibited by the ethyl acetate fraction (IC₅₀ = 419.63 ± 1.71 µg/mL) and the weakest anti-lipid peroxidation activity was exhibited by the crude and aqueous extract (1569.85 ± 2.38 µg/mL, 2231.83 ± 2.53 µg/mL respectively). Values obtained in our study are lower than the data reported by TALEB-SENOUCI *et al.* (2009), when studied the Tunisian *Ajuga iva* aqueous extract.

According to RATTY and DAS (1988), the flavonoid aglycones were more potent in their anti-lipid peroxidation ability than their corresponding glycosides. The structure-activity analysis demonstrated that the flavonoid molecule with polyhydroxylated substitutions on ring A and B, A 2,3-double bond, a free 3-hydroxyl substitution, and a 4-keto moiety, would confer upon the compound potent anti-lipid peroxidation effect.

Correlation analysis

Several researchers have studied the correlation between polyphenol content and antioxidant properties. Some of them found a correlation between the phenolic content and the antioxidant activity, while others did not find a relationship.

There is a good correlation between the total phenol and flavonoid contents and the DPPH assay (R² = 0.68, R² = 0.87, respectively). VELIOGLU *et al.* (1998) had also reported good correlations for fruits and vegetables grain products between the total phenolic amount and the antioxidant capacity. On the other hand, our results are not in agreement with the data reported by WOJDYLO *et al.* (2007).

Regarding ferric reducing antioxidant power assay, there is good correlation between this method and the total phenols and flavonoids contents (R² = 0.80 and R² = 0.85 respectively). This finding agrees with the study of WONG *et al.* (2006), which reported a good relationship between total phenolic content and antioxidant activity when studied the antioxidant activities of aqueous extracts of some medicinal plants using ferric reducing power assay.

Correlation analysis reveals an excellent correlation between the total polyphenols and the anti-lipid peroxidation capacity of extracts with $R^2 = 0.99$ and a moderate correlation between this assay and the levels of flavonoids with $R^2 = 0.53$. The same results were found by VAMANU and NITA (2013) when studying the correlation of inhibition of lipid peroxidation with phenolic and flavonoids contents of extracts from wild edible *Boletus edulis*.

Since the chemical composition of extracts and structures of active compounds identified in extract are important factors governing the efficacy of natural antioxidants, the antioxidant ability of an extract could not be explained based on their phenolic and flavonoid contents (HEINONEN *et al.*, 1998). For instance, it has been demonstrated that phenol compounds with para-dihydroxylation or a hydroxyl and a methoxy group are more effective than simple phenolics (SHAHIDI and WANASUNDARA, 1992).

HPLC analysis

As depicted in Figure 1 and Table 3, the HPLC chromatogram of butanolic extract of *Ajuga iva* showed the presence of caffeic acid, luteolin, and quercetin whereas the aqueous extract contained rutin, *p*-coumaric acid and quercetin. On the other side, ethyl acetate extract revealed the presence of caffeic acid, rutin, *p*-coumaric acid, luteolin, and quercetin, however, gallic acid, cinnamic acid and caffeic acid were found in the hydromethanolic extract.

Many reports have been published on the chemical composition of *Ajuga iva*, mentioning the evidence of numerous bioactive compounds, among them terpenoid, sterols, essential oils, and flavonoids (EL HILALY *et al.*, 2004; ISRAILI and LYOUSSI, 2009). However, there are few references in the literature on the phenolic profile of this species. BOUDJLEL *et al.* (2015) showed that two flavonoids appeared to predominate, apigenin, and naringenin, in the aqueous infusion of *Ajuga iva*. However, KHATTELIA *et al.* (2020) reported the presence of caffeic acid, *p*-coumaric acid, rutin, and luteolin in the extract of the aerial part of *Ajuga iva*. These results are in accordance with our findings.

Table 3. Retention time (Rt), UV-Vis wavelengths of maximum absorption (λ_{max}), and concentration of phenol compounds.

Rt	Compound	λ_{max} (nm)	Concentration ($\mu\text{g/g}$)			
			Crude	Ethyl acetate	Butanolic	Aqueous
15.30	Gallic acid	272	148 221	nd	nd	nd
25.21	Cinnamic acid	277	389 955	nd	nd	nd
27.22	Caffeic acid	219 239 323	420 098	133 9041	855 52	nd
30.08	Rutin	259 355	nd	126 1426	nd	237 027
39.70	<i>p</i> -coumaric acid	224 309	nd	6.284	180 2917	252 826
41.52	Luteolin	260 348	nd	8,637	224 440 6	nd
49.01	Quercetin	256 372	nd	8.118	154 055	937 28

nd – not detected

Several studies have been demonstrating the role of flavonoids and phenolics as antioxidant agents. SALUCCI *et al.* (2002) reported that gallic acid possesses a very high antioxidant capacity. In this order, YANG *et al.* (2008) reported that rutin exhibited strong DPPH radical scavenging activity and had effective inhibition of lipid peroxidation. On the other hand, luteolin exhibits a potent quenching effect on Fenton-induced 8-OHdG formation (CAI *et al.*, 1997). According to the study of CHANG *et al.* (2017), caffeic acid and *p*-coumaric acid inhibited LDL oxidation and quenched radicals. Quercetin has a great antioxidant activity as shown by ZHANG *et al.* (2011).

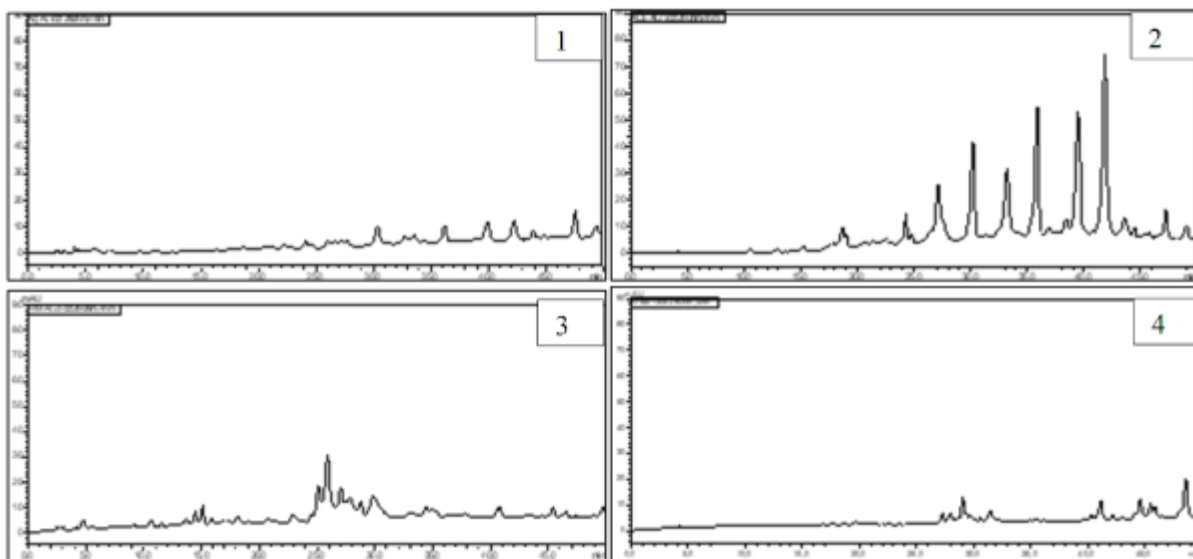


Figure 1. Representative high performance liquid chromatography profile of *Ajuga iva* extracts: Aqueous (1), Ethyl acetate (2), Hydromethanolic (3), Butanolic (4).

CONCLUSIONS

This study confirmed that *Ajuga iva* is a rich source of polyphenols and flavonoids and possesses antioxidant capacity mainly its ethyl acetate and butanol extracts. The antioxidant power of *Ajuga iva* extracts can be associated with their free radical scavenging properties. These data confirm their use in traditional medicine and encourage their application as alternative antioxidants. In addition, there is a need to isolate the compounds responsible for the activity, which may allow the development of a modern drug from this plant.

References:

- [1] ADJADJ, M. (2009): Propriétés antioxydantes et activité inhibitrice de la xanthine oxydase des extraits de la plante medicinale *Ajuga iva*. *Mémoire de magister en toxicologie cellulaire et moléculaire, Université de Mentouri Constantine, Algérie*. 86: pp. 51-52.
- [2] ANOKWURU, C.P., ANYASOR, G.N., AJIBAYE, O., FAKOYA, O., OKEBUGWU, P. (2011): Effect of extraction solvents on phenolic, flavonoid and antioxidant activities of three Nigerian medicinal plants. *Nature and Science* **9** (7): 53-61.
- [3] ARDESTANI, A., YAZDANPARAST, R. (2007): Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on *in vitro* protein glycoxidation. *Food and Chemical Toxicology* **45**: 2402-2411. doi: 10.1016/j.fct.2007.06.020
- [4] AYARI, B., RIAH, L., ZIADI, S., CHOGRANI, H., MLIKI, A. (2013): Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian *Ajuga iva* L. essential oils. *Revue f. S. B. XI*: 203-210.
- [5] BAGHIANI, A., BOUMERFEG, S., ADJADJ, M., AMENI, D., DJERMOUNI, M., KHELIFI-TOUHAMI, F., CHAREF, N., KHENNOUF, S., ARRAR, L. (2011): Antioxidants, free radicals

- scavenging and xanthine oxidase inhibitory potentials of *Ajuga iva* L. extracts. *Free Radicals and Antioxidants* **1** (4): 21-30. doi: 10.5530/ax.2011.4.5.
- [6] BATANOUNY K.H., ABOU TABL S., SHABANA M. AND SOLIMAN F. (1999): Wild medicinal plants in Egypt. *Academy of Scientific Research and Technology. International Union for Conservation (IUCN). Egypt*. ISBN: 977-5089-24-7
- [7] BOUDERBALA, S., LAMRI-SENHADJI, M., PROST, J., LACAILLE-DUBOIS, M.A., BOUCHENAK, M. (2008): Changes in antioxidant defense status in hypercholesterolemic rats treated with *Ajuga iva*. *Phytomedicine* **15**: 453-461.
doi: 10.1016/j.phymed.2007.10.001
- [8] BOUDJLEL, A., SIRACUSA, L., HENCHIRI, C., SARRI, M., ABDERRAHIM, B., BAALI, F., RUBERTO, G. (2015): Antidiabetic Effects of Aqueous Infusions of *Artemisia herba-alba* and *Ajuga iva* in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Planta Medica* **81** (9): 696-704.
doi: 10.1055/s-0035-1546006
- [9] BOZIN, B., MIMICA-DUKIC, N., SAMAJILIK, I., JOVIN, E. (2007): Antimicrobial and antioxidant properties of Rosmary and sage essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 7878-7885. doi: 10.1021/jf0715323
- [10] CAI, Q., RAHN, R.O., ZHANG, R. (1997): Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. *Cancer Letters* **119** (1): 99-107.
- [11] CAO, G., SOFIC, E., PRIOR, R.L. (1997): Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine* **22**: 749-760.
- [12] CHABANE, D., SAIDI, F., ROUBI, A., AZINE, K. (2013): Activité hypoglycémique de l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* L. schreber chez les rats diabétiques induite par l'alloxane. *Afrique Science* **9** (1): 120-127.
- [13] CHANG, M.Y., LIU, C.M., SHIEH, D.E., CHEN, C.Y. (2017): Evaluation and analysis of phytochemical antioxidant capacity. *Biomedical Research* **28** (14): 6431-6434.
- [14] CROZIER, A., CLIFFORD, M.N., ASHIHARA, H. (2006): Plant Secondary Metabolites Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. *Blackwell Publishing Ltd* pp 372.
doi: 10.1002/9780470988558
- [15] DEGRAFT-JOHNSON, J., KOŁODZIEJCZYK, K., KROL, M., NOWAK, P., KROL, B., NOWAK, D. (2007): Ferric-reducing ability of selected plant polyphenols and their metabolites: implications for clinical studies on the antioxidant effects of fruits and vegetable consumption. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **100** (5): 345-352.
- [16] EBRAHIMI, N.S., HADIAN, J., MIRJALILI, M.H., SONBOLI, A., YOUSEFZADI, M. (2008): Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food Chemistry* **110**: 927-931.
doi: 10.1016/j.foodchem.2008.02.083.
- [17] EL HILALY, J., LYOUSSI, B., WIBO, M., MOREL, N. (2004): Vasorelaxant effect of the aqueous extract of *Ajuga iva* in rat aorta. *Journal of Ethnopharmacology* **93**: 69-74. doi: 10.1016/j.jep.2004.03.020.
- [18] FARAHMAND, S.K., SAMINI, F., SAMINI, M., SAMARGHANDIAN, S. (2013): Safranal ameliorates antioxidant enzymes and suppresses lipid peroxidation and nitric oxide

- formation in aged male rat liver. *Biogerontology* **14**: 63-71. doi: 10.1007/s10522-012-9409-0.
- [19] FAVIER, A. (2003): Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*: 108-115.
- [20] HALIMI A.K. (2004): Les plantes médicinales en Algérie. 1ère Ed. *BERTI, Alger* pp: 156-157.
- [21] HEINONEN, M., LEHTONEN, P.J., HOPLA, A. (1998): Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 25-31.
- [22] ISRAILI, Z.H., LYOUSSI, B. (2009): ethnopharmacology of the plants of genus *Ajuga*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* **22** (4): 425-462.
- [23] JANSSEN, A.M., SCHEFFER, J.J.C., SVENDSEN, A.B. (1976): Antimicrobial activity of essential oils: A 1976-1986 Literature Review. Aspects of the test methods. *Planta medica* **53**: 395-398. doi: 10.1055/s-2006-962755.
- [24] KARAZOGLER, A.A., ERDAG, B., EMEK, Y.G., UYGUM, D.A. (2008): Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Food Chemistry* **111**: 400-407. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.03.089
- [25] KHATTELIA, A., BENABDERRAHIMA, M.A., TRIKIA, T., GUASMI, F. (2020): Aroma volatiles, phenolic profile and hypoglycaemic activity of *Ajuga iva* L. *Food Bioscience* **36**: 100578. doi: 10.1016/j.fbio.2020.100578
- [26] KOURI, G., TSIMOGIANNIS, D., BARDOUKI, H., OREOPOULOU, V. (2007): Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **8**: 155-162. doi: 10.1016/j.ifset.2006.09.003
- [27] MAKNI, M., HADDAR, A., KRIAA, W., ZEGHAL, N. (2013): Antioxidant, free radical scavenging and antimicrobial activities of *Ajuga iva* leaf extracts. *International Journal of Food Properties* **16**: 756-765. doi: 10.1080/10942912.2011.561465
- [28] MERGHEM, R., JAY, M., VIRICEL, M.R., BAYET, C., VOIRIN, B. (1995): Five 8-benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiatae). *Phytochemistry* **38**: 637-640. doi:10.1016/0031-9422(94)00578-H
- [29] MILIAUSKAS, G., VENSKUTONIS, P.R., VAN BEEK, T.A. (2004): Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food Chemistry* **85**: 231-237. doi: 10.1016/j.foodchem.2003.05.007
- [30] MOLYNEUX, P. (2004): The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* **26**: 211-219.
- [31] OYAIZU, M. (1996): Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition* **44**: 307-315. doi: 10.5264/eiyogakuzashi.44.307
- [32] OZTURK, M., AYDOGMUS-OZTURK, F., DURU, M.E., TOPÇU, G. (2007): Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): an edible medicinal plant. *Food Chemistry* **103**: 623-630. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.09.005

- [33] RATTY, A.K., DAS, N.P. (1988): Effect of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: Structure-activity relationship. *Biochemical medicine and Metabolic Biology* **39**: 69-79.
- [34] ROBBINS, R. (2003): Phenolic acids in foods: An overview of analytic methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 2866-2887. doi: 10.1021/jf026182t
- [35] SALUCCI, M., STIVALA, L.A., VANNINI, V. (2002). Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells. *British Journal of Cancer* **86**: 1645-1651. doi: 10.1038/sj.bjc.6600295
- [36] SHAHIDI, F.P.K.J, WANASUNDARA, P.D. (1992): Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **32** (1): 67-103. doi: 10.1080/10408399209527581
- [37] SHIMADA, K., FUJIKAWA, K., YAHARA, K., NAKAMURA, T. (1992). Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**: 945-948. doi: 10.1021/jf00018a005
- [38] TALEB-SENOUCI, D. GHOMARI, H., KROUF, D., BOUDERBALA, S., PROST, J., LACAILLE-DUBOIS, M.A., BOUCHENAK, M. (2009). Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine* **16**: 623-631. doi:10.1016/j.phymed.2008.12.004
- [39] TRIPATHI, Y.B., SINGH, A.V. (2001). Effect of *Semecarpus anacardium* nuts on lipid peroxidation. *Indian Journal of Experimental Biology* **39**: 798-801.
- [40] VAMANU, E., NITA, S. (2013): Antioxidant capacity and the correlation major phenolic compounds, anthocyan, and tocopherol content in various extracts from the wild edible *Boletus edulis* mushroom. *BioMed Research International* ID: 313905. doi: 10.1155/2013/313905
- [41] VAN ACKER, S.A.B.E., VAN BALEN, G.P., VAN DEN BERG, D.J., BAST, A., VAN DER VIJGH, W.J.F. (1998): Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochemical Pharmacology* **56**: 935-943. doi: 10.1016/S0006-2952(98)00102-6
- [42] VELIOGLU, Y.S., MAZZA, G., GAO, L., OOMAH, B.D. (1998): Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 4113-4117. doi: 10.1021/jf9801973
- [43] WOJDYLO, A., OSZMIANSKI, J., CZEMERY, R. (2007): Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* **105**: 940-949. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.04.038
- [44] WONG, S.P., LEONG, L.P., WILLIAM KOH, J.H. (2006): Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry* **99** (4): 775-783. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.07.058
- [45] YANG, J., GUO, J., YUAN, J. (2008). *In vitro* antioxidant properties of rutin. *Food science and technology* **41** (6): 1060-1066. doi: 10.1016/j.lwt.2007.06.010
- [46] ZAFAR, H.I., BADIÀA, L. (2009): Ethnopharmacology of the plants of the genus *Ajuga*. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences* **22** (4): 425-462.
- [47] ZERROUG, M.M., ZOUAGHI, M., BOUMERFEG, S., BAGHIANI, A., NICKLIN, J., ARRAR, L. 2011. Antibacterial activity of extracts of *Ajuga iva* and *Teucrium polium*. *Advances in Environmental Biology*. 5 (2), 491-495.

- [48] ZHANG, M., SWARTS, S.G., YIN, L., LIU, C., TIA, Y., CAO, Y., SWARTS, M., YANG, S., ZHANG, S.B., ZHANG, K., JU, S., OLEK, D.J., SCHWARTZ, L., KENG, P.C., HOWEMLL, R., ZHANG, L., OKUNIEFF, P. (2011): Antioxidant properties of quercetin. *Advances in Experimental. Medicine and Biology* **701**: 283-289. doi: 10.1007/978-1-4419-7756-4_38