



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

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimy-Bordj Bou
Arréridj

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences
de la Terre et de l'Univers

Département des Sciences Biologiques

Laboratoire de caractérisation et valorisation des ressources naturelles



THÈSE

Présentée par

BAKHOUCHE Imene

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT

Filière : Sciences biologiques

Option : Biochimie

Thème :

**Étude phytochimique et évaluation des propriétés biologiques d'une
plante spontanée Algérienne : *Limonium delicatulum***

Soutenue le : 11/12/2021

Devant le jury composé de :

Prénom et nom	Grade	Institution	
Pr. Sabah BOUMERFEG	PR.	Univ. Bordj Bou Arréridj	Présidente
Dr. Tahar BOUBELLOUTA	MCA	Univ. Bordj Bou Arréridj	Encadrant
Dr. Toufik ALIAT	MCA	Univ. Bordj Bou Arréridj	Co-Encadrant
Pr. Azzeddine BATTACHE	PR.	Univ. Abderrahmane Mira Béjaia	Examineur
Pr. Noureddine ROUAG	PR.	Univ. Sétif 1	Examineur
Dr. Noureddine TOUATI	MCA	Univ. Bordj Bou Arréridj	Examineur
Dr. Yuva BELLIK	MCA	Univ. Bordj Bou Arréridj	Invité

Année universitaire : 2020/2021

Remerciements

Avant tout, je remercie Dieu le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience pour réaliser ce travail.

*Je tiens à exprimer mes profonds remerciements à **M^r.BOUBELLOUTA Tahar**, mon directeur de thèse pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il m'a accordé m'ont permis d'achever ce document.*

*Je remercie **M^r.ALIAT Toufik** mon co-directeur de thèse pour son aide et ses conseils pertinents qui m'ont permis de mener à terme ce travail.*

*Je tiens à exprimer également ma profonde reconnaissance à **M^r.BELLIK Yuva** pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'il avait consentis durant la réalisation de ce travail.*

*J'exprime mes vifs remerciements à **M^{me}.BOUMARFEG Sabah**, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury de cette thèse.*

*Je remercie les membres de jury : **M^r.BATTACHE Azeddine**, **M^r.ROUAG Noureddine** et **M^r.TOUATI Noureddine** d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.*

*Je remercie énormément **M^r.BENSOUICI Chawki**, chef du laboratoire de biochimie au sein du centre de recherche en biotechnologie, CRBt, pour son accueil, sa bienveillance et son encouragement. Dans le même contexte, je remercie **M^{elle}.Gali Lynda**, qui m'a supporté et m'a apporté un grand aide.*

Mes remerciements vont également aux ceux qui m'ont aidé et soutenu, de près ou de loin, lors de la réalisation de cette thèse.

Enfin je ne saurais oublier mes parents et mon mari, qui m'ont soutenu et fait confiance tout au long de mes études.

Résumé

Limonium delicatulum est une halophyte poussant dans des conditions extrêmes et constituait donc une source possible de composés bioactifs. Dans la présente étude un criblage phytochimique des extraits macérés a été effectué, les polyphénols totaux, les flavonoïdes et les tanins condensés ont été quantifiés. Le DPPH, l'ABTS, le radical de galvinoxyle (GOR), le CUPRAC, le pouvoir réducteur, l'O-phénanthroline, les nanoparticules d'argent et le test de blanchiment de β -carotène ont été utilisés pour évaluer la capacité antioxydante. L'effet inhibiteur sur l'activité de la tyrosinase et la dénaturation de la BSA ont également été étudiés. Le criblage phytochimique a révélé la présence de nombreuses classes de métabolites secondaires à savoir les tanins, les triterpènes, les saponins, et les flavonoïdes. Les résultats ont montré que le solvant d'extraction, ainsi que l'organe végétal, influençaient considérablement le contenu des composés phénoliques. L'extrait méthanolique des racines contenait la teneur phénolique la plus élevée avec une valeur de $772,52 \pm 5,12 \mu\text{g EAG} / \text{mg}$ consistant principalement en tanins condensés ($678,87 \pm 0,11 \mu\text{g EC} / \text{mg d'extrait}$), tandis que l'extrait des feuilles méthanoliques enregistrait la teneur la plus élevée en flavonoïdes ($212,77 \pm 1,19 \mu\text{g QE} / \text{mg d'extrait}$). Les extraits méthanoliques à haute teneur phénolique ont exercé la plus forte activité antioxydante par rapport aux extraits aqueux. De plus, l'extrait méthanolique des racines présentait une capacité élevée d'inhibition de la tyrosinase avec une IC_{50} de $9,87 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}$, par rapport à celle de l'extrait méthanolique des feuilles et de l'acide kojique ($24,77 \pm 0,5$ et $25,23 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$, respectivement). Les extraits étudiés ont également inhibé la dénaturation de la BSA de manière dose-dépendante. Les extraits méthanoliques présentaient des pourcentages d'inhibition plus élevés que les extraits aqueux et similaires à ceux obtenus avec le diclofénac sodique. En général, les extraits méthanoliques des feuilles et des racines de *L.delicatulum* se sont révélés actifs contre les souches testées. Tandis que les extraits aqueux n'avaient aucune activité antimicrobienne. Une forte toxicité a été exercée par les extraits méthanoliques contre les larves d'*Artemia* avec une LC_{50} de $49,75 \mu\text{g/ml}$ pour les racines et $63,45 \mu\text{g/ml}$ pour les feuilles. Par contre, les extraits aqueux ont eu un effet léger ($\text{LC}_{50} > 500 \mu\text{g/ml}$).

Mots clés : *Limonium delicatulum*, screening phytochimique, polyphénols, activité antioxydante, activité anti-tyrosinase, effet anti-inflammatoire, activité anti-bactérienne, cytotoxicité.

Abstract

Limonium delicatulum is a halophyte growing in extreme conditions so it is a possible source of bioactive compounds. In the present study, phytochemical screening was performed; total phenolic, flavonoids, and condensed tannins were quantified. The antioxidant capacity was investigated using assays of DPPH, ABTS, Galvinoxyl radical (GOR), CUPRAC, reducing power, O-phenanthroline, silver nano-particle, and b-carotene bleaching. The inhibitory effect on tyrosinase activity and BSA denaturation were also carried out. The phytochemical screening revealed the presence of various classes of secondary metabolites such as saponins, triterpenoids, tannins, and flavonoids. The results showed that extraction solvent, as well as plant organ; significantly influenced the phenolic compounds contents. Methanolic roots extract contain the highest levels of phenolic compounds with a value of 772.52 ± 5.12 mg GAE/mg consisting mainly of condensed tannins (678.87 ± 0.11 mg EC/mg of extract), while methanolic leaves extract recorded the highest content of flavonoids (212.77 ± 1.19 mg QE/mg extract). Methanolic extracts with high phenolic contents exerted the strongest antioxidant activity compared to that of the aqueous extracts. Moreover, methanolic roots extract exhibited a high tyrosinase inhibition capacity with an IC_{50} of 9.87 ± 0.15 mg/ml compared to that of methanolic leaves extract and kojic acid (24.77 ± 0.5 and 25.23 ± 0.21 mg/ml, respectively). In addition, the studied extracts inhibited the BSA denaturation in dose-dependent manner. Methanol extracts presented a high inhibition rate compared with aqueous extracts and similar to that obtained by diclofenac sodium. In general, methanolic leaves and roots extracts of *delicatulum L.* are active against the tested strains, while no anti-bacterial activity was shown for the aqueous extracts. The methanolic extracts exhibited a high toxicity against *Artemia* larvae with an LC_{50} of $49.75 \mu\text{g} / \text{ml}$ for roots and $63.45 \mu\text{g} / \text{ml}$ for leaves, whereas the aqueous extracts exerted a slight effect ($LC_{50} > 500 \mu\text{g} / \text{ml}$).

keywords: *Limonium delicatulum*, phytochemicals screening, polyphenols, antioxidant activity, anti-tyrosinase activity, anti-inflammatory effect, anti-bacterial activity, brin shrimp cytotoxicity.

الملخص

نبات الرأس الاحمر (*Limonium delicatulum*) نبات محب للملوحة ويقاوم الظروف القاسية لها، وقد يشكل بذلك مصدر للمواد الحيوية الفاعلة. في هذه الدراسة الفيتوكيميائية تم تقدير متعدد الفينول الكلي، الفلافونويد، والتانينات الكثيفة كما تمت دراسة الاختبارات المضادة للأكسدة التالية: ABTS، DPPH، الجذر جلفنوكسيل (GOR)، CUPRAC، والقدرة الارجاعية لايوكسي بنتا ترو يلين، نانو جزئيات الفضة واختبار β -كاروتين. أيضا تم دراسة التأثير المثبط على نشاط التروزيناز وتخريب بنية BSA. المسح الفيتوكيميائي اظهر وجود العديد من نواتج الاستقلاب الثانوي من بينها التانينات، رباعي التريان، الصابونين والفلافونويدات. لقد بينت النتائج أن نوعية مذيب الاستخلاص وكذلك العضو النباتي المستهدف يؤثران بشدة على محتوى المركبات الفينولية، حيث سجل المستخلص الميثانولي للجذور أكبر كمية من المواد الفينولية ($772,52 \pm 5,12$ مكغ مكافئ حمض الغاليك / ملغ مستخلص) بالمقابل سجل المستخلص الميثانولي للأوراق أعلى كمية من التانينات والتي قدرت ب($678 \pm 0,11$ مكغ مكافئ كرسيتين/ ملغ مستخلص). بالإضافة الى ذلك مارست المستخلصات الميثانولية ذات المحتوى الفينولي الكبير أعلى نشاط مضاد للأكسدة مقارنة بالمستخلصات المائية. ومن النتائج يبدو ان المستخلصات الميثانولية للجذور لها القدرة على تثبيط التروزيناز بقيمة IC_{50} : $9,87 \pm 0,15$ مكغ/مل مقارنة بالمستخلصات الميثانولية للأوراق و حمض الكوجيك ($24,77 \pm 0,5$ و $25,23 \pm 0,21$ مكغ/مل على التوالي). مع العلم ان المستخلصات المدروسة اظهرت فاعلية كبيرة في تخريب بنية BSA بشكل مفهوم الجرعة المستقلة. لقد أبدت المستخلصات الميثانولية نسبة تثبيط عالية مقارنة بالمستخلصات المائية ومماثلة للتي تم الحصول عليها باستخدام ديكلوفيناك الصوديوم. على العموم، فإن المستخلصات الميثانولية للأوراق والجذور للنبات المدروس اظهرت نشاط واضح جدا على السلالات البكتيرية المدروسة بينما لم يظهر اي نشاط مضاد للبكتيريا بالنسبة للمستخلصات المائية. لقد أظهرت المستخلصات الميثانولية تأثيرا عاليا على بركات الأرتيميا مع (LC_{50} : 49.75 مكغ/ مل) بالنسبة للجذور و (LC_{50} : 63.45 مكغ/ مل) بالنسبة للأوراق، في حين كان للمستخلصات المائية تأثيرا طفيفا (LC_{50} < 500 مكغ/مل).

الكلمات المفتاحية: نبات الرأس الاحمر *Limonium delicatulum*، المسح الفيتوكيميائي، متعدد الفينول، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للتروزيناز، النشاط المضاد للالتهاب، النشاط المضاد للبكتيريا، السمية الخلوية.

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	

Introduction générale	1
------------------------------------	---

Chapitre 1 :Revue bibliographique

1. Présentation de la plante étudiée : *Limonium delicatulum*

1.1.Appartenance botanique.....	3
1.2. Description botanique	3
1.3. Habitat et Distribution.....	3
1.4. Classification systématique	4
1.5. Composition chimique.....	4
1.6. Effets thérapeutiques et utilisations traditionnelles de quelques espèces de <i>Limonium</i>	6

2. Stress Oxydant et Radicaux libres

2.1. Généralités.....	8
2.2. Oxydants.....	8
2.2.1. Espèces réactives d'oxygène (ERO)	8
2.2.2. Espèces réactives d'azote (ERN)	8
2.2.3. Principales sources des ERO	9
2.2.3.1. Sources exogènes	9
2.2.3.2. Sources endogènes	9
2.2.4. Dommages macromoléculaires occasionnés par les ERO.....	10
2.2.5. Implications pathologiques du stress oxydant	10
2.3. Anti oxydants	10

3. Polyphénols

3.1.Généralités.....	12
3.2. Biosynthèse des polyphénols	12
3.3. Classification.....	13
3.3.1. Acides phénoliques	13
3.3.1.1. Acides benzoïques	13
3.3.1.2. Acides cinnamiques	14
3.3.2. Flavonoïdes	14
3.3.3. Tanins	16
3.3.3.1. Tanins hydrolysables	17
3.3.3.2. Tanins condensés	17
3.3.4. Lignines	17
3.3.5. Stilbènes.....	17
3.3.6. Coumarines	18
3.4. Activités biologiques et effet pharmacologique des polyphénols	18

4. Tyrosinase

4.1. Généralités sur la tyrosinase.....	20
4.2. Rôles physiologiques et effets indésirables de la tyrosinase.....	20
4.3. Inhibiteurs de la tyrosinase.....	21

5. Inflammation

5.1. Généralités.....	24
5.2. Médiateurs d'inflammation.....	24
5.3. Anti-inflammatoires.....	25
5.3.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).....	25
5.3.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS).....	26
5.3.3. Anti-inflammatoires naturels.....	27
5.4. Pathologies inflammatoires.....	27

6. Activité antibactérienne

6.1. Généralités.....	29
6.2. Résistance microbienne.....	31
6.2.1. Définitions.....	31
6.2.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	32
6.2.2.1. Modification des cibles des antibiotiques.....	32
6.2.2.2. Inhibition d'antibiotiques.....	32
6.2.2.3. Réduction de la concentration intracellulaire de l'antibiotique.....	33
6.3. Agents antimicrobiens dérivant des plantes.....	33

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1. Matériel végétale.....	36
2. Préparation des extraits.....	36
3. Rendement d'extraction.....	36
4. Screnning phytochimique.....	36
4.1. Test des tanins.....	36
4.2. Test des triterpénoïdes.....	36
4.3. Test des saponines.....	37
4.5. Test des coumarines.....	37
4.6. Test des quinones.....	37
4.7. Test des stéroïdes.....	37
4.8. Test des flavonoïdes.....	37
4.9. Test des anthraquinones.....	37
5. Analyse colorimétrique des composés phénoliques.....	37
5.1. Dosage des polyphénols totaux.....	37
5.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	38
5.3. Dosage des tanins condensés.....	38
6. Evaluation de l'activité antioxydante.....	38
6.1. Activité anti-radicalaire du radical DPPH.....	38
6.2. Activité anti-radicalaire de l'ABTS ^{•+}	39
6.3. Activité anti-radicalaire du radical Galvinoxyl (GOR).....	40

6.4. Test de Phénanthroline	40
6.5. Test de la réduction des nanoparticules d'argent (Ag+).......	41
6.6. Pouvoir réducteur	41
6.7. Capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)	41
6.8. Test de blanchiment du β -carotène.....	42
7. Activité inhibitrice de la tyrosinase	42
8. Activité anti-inflammatoire	43
8.1. Inhibition de la dénaturation de BSA	43
9. Activité antibactérienne	43
9.1. Souches bactériennes et préparation de la suspension bactérienne.....	43
9.2. Test de sensibilité sur milieu gélosé.....	43
9.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	43
10. Evaluation de la cytotoxicité sur les larves d'Artémia salina (BrineShrimp test)	44
10.1. Ecllosion des œufs d'Artémie	44
10.2. Test de cytoxicité	44
11. Analyse statistique	45

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

1. Tests phytochimiques	46
2. Rendement d'extraction, teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes, et tanins.....	51
3. Activité antioxydantes	49
3.1. Activité anti-radicalaire du DPPH	49
3.2. Activité anti-radicalaire de l'ABTS ⁺	51
3.3. Activité anti-radicalaire du radical Galvinoxyl (GOR).....	52
3.4. Test de Phénanthroline	54
3.5. Test de la réduction des nanoparticules d'argent (Ag+).......	55
3.6. Pouvoir réducteur	56
3.7. Capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)	57
3.8. Inhibition de l'oxydation du β -carotène	58
4. Corrélation entre les teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante.....	61
5. Activité antityrosinase	62
6. Activité anti-inflammatoire	63
6.1. Inhibition de la dénaturation de BSA	63
7. Activité antibactérienne	65
7.1. Zones d'inhibition	65
7.2. Concentrations minimales inhibitrices (CMI)	68
8. Etude de la toxicité.....	70

Conclusion générale et perspectives

73

Références bibliographiques

75

Article scientifique

Liste des abréviations

ABTS: Azinobisethylbenzthiazolinesulphonic acid
ADN : Acide desoxyribonucleique
Ag+: Ions d'Argent
AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AIS : anti-inflammatoires stéroïdiens
Al(NO₃)₃: Nitrate d'Aluminium
AP-1 : protéine activatrice-1
ARNm :Acide Ribonucléique messenger
ARNr : Acide Ribonucléique Ribosomique
BChE : Butyryl-cholinesterase
BHA : Butylhydroxyanisol
BHT : Hydroxytoluène butylé.
BSA: Bovine Serum Albumin
CAT : Catalase
CMI: Concentration Minimale Inhibitrice
COX : Cyclo Oxygénase
CUPRAC: Cupric Reducing Antioxidant Activity
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DPPH: DPPH: Diphenylpicrylhydrazyl
EAA: Equivalent Acide Ascorbique
EAG: Equivalent Acide Gallique
EAK :Equivalent Acide Kojique
Eaq : Extrait aqueux.
ECAT : Equivalent Catéchine
EME :Extrait méthanolique
EQ: Equivalent Quercetin
ER : Equivalent de Rutine
ERN : Espèces réactives d'azote
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
ET : Equivalent de Trolox
GC : Glucocorticoïdes
GOR : Le radical Galvinoxyl
GPx : Glutathione peroxydase
GRE : Glucocorticoid Response Elemen
HPLC : Chromatographie en phase gazeuse à haute performance.
HSV-1 : Herpès simplexe type-1
IC₅₀ : Concentration inhibitrice de 50%
IFN-γ : interféron gamma
IL : Interleukine
IMID: Immune Mediated Inflammatory Diseases
L.delicatulum: Limonium delicatulum
LC₅₀ : Concentration létale de 50%
L-DOPA : L-dihydroxyphénylalanine
M :Molaire
MDR: Multidrug Resistant
MHB: Muller Hinton Broth
MTT : DIMéthylthiazolyl diphényltétrazolium bromide
ND : Non déterminé
NF-κB : Facteur nucléaire Kappa B
nm:nanomètre
ONOO : Peroxynitrite

PAF: Platelet activating factor
PBP: Penicillin-Binding Proteins
PBP2a : Penicillinbinding protein 2a
PDR: Pandrug Resistant
PG : Prostaglandines
PLA2 : Phospholipase A2
PPO : Polyphénol Oxydase
SNP : nanoparticules d'argent
SOD : Superoxyde dismutase
TCA : Acide trichloroacétique
TNF: Facteur necrose tumorale
UFC : Unité Formant Colonie
UV:Ultra-violet
XDR: Extreme Drug Resistance

Liste des figures

Figure 1: Photographies de <i>Limonium delicatulum</i> : Parties aériennes (1), Feuilles (2), et fleurs (3). ...3	
Figure 2: Structure chimique des principaux composés phénoliques identifiés dans <i>Limonium delicatulum</i>5	
Figure 3 : Squelette chimique de base des flavonoïdes15	
Figure 4 : Structure chimique de Resvératrol18	
Figure 5 : Structure chimique des coumarines18	
Figure 6 Modèle du site actif de la tyrosinase de mammifères.20	
Figure 7 : Inhibition du brunissement enzymatique catalysé par la tyrosinase.22	
Figure 8 : Différentes cibles des antibiotiques.31	
Figure 9: Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques.33	
Figure 10 : Réaction entre le DPPH• et le composé antioxydant pour former le DPPH.39	
Figure 11 : Formation du radical cation ABTS+• à partir de l'ABTS.40	
Figure 12 : Rendement d'extraction (A), polyphénols totaux (B), flavonoïdes (C) et tanins condensés (D) des extraits de <i>L. delicatulum</i>48	
Figure 13 : Activité anti-radicalaire du DPPH• des extraits de <i>L. delicatulum</i> et standards.50	
Figure 14 : Effet piègeur du radical ABTS+• des extraits de <i>L. delicatulum</i> et les standards52	
Figure 15 : Activité anti-radicalaire de Galvinoxyl des extraits de <i>L. delicatulum</i> et standards53	
Figure 16 : Activité réductrice de Phénantroline des extraits de <i>L. delicatulum</i> (A) et standards (B). ...55	
Figure 17 : Activité réductrice de nanoparticule d'argent des extraits de <i>L. delicatulum</i> et standards.. 56	
Figure 18: Capacité à réduire le fer (pouvoir réducteur).57	
Figure 19 : Capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)..58	
Figure 20 : Cinétique de blanchiment du β -carotène.60	
Figure 21: Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine induite par la chaleur par les différents extraits de <i>L. delicatulum</i> et le Diclofénac.64	
Figure 22 : Photos de quelques zones d'inhibition obtenues avec l'EME des feuilles de <i>L. delicatulum</i>67	
Figure 23 : Photos de quelques zones d'inhibition obtenues avec l'EME des racines de <i>L. delicatulum</i>67	
Figure 24 : Photos des zones d'inhibition obtenues avec la Gentamicine.68	
Figure 25 : Toxicité des extraits méthanoliques et aqueux de <i>L. delicatulum</i> vis-à-vis des larves d' <i>Artemia salina</i>71	

Liste des tableaux

Tableau I: Utilisations traditionnelle de quelques espèces de <i>Limonium</i>	7
Tableau II: Espèces réactives de l'oxygène.....	8
Tableau III: Différents dérivés de l'acide benzoïque.....	14
Tableau IV: Différents dérivés de l'acide cinnamique.....	14
Tableau V: Différentes classes de flavonoïdes.....	15
Tableau VI : Quelques exemples de molécules d'origine naturelle à activité antityrosinase.	23
Tableau VII : Effets des principaux médiateurs impliqués dans le processus inflammatoires.	24
Tableau VIII : Exemples de plantes médicinales douées d'activités anti-inflammatoires.....	27
Tableau IX : Exemples de pathologies liées à l'inflammation.	28
Tableau X : Exemples d'antibiotiques commercialisés dérivant de molécules naturelles produites par les microorganismes.....	30
Tableau XI : Quelques exemples de molécules d'origine naturelle à effet antimicrobien.	35
Tableau XII : Screening phytochimique des extraits méthanoliques et aqueux de <i>L.delicatulum</i>	46
Tableau XIII : Valeurs IC ₅₀ (µg/ml) des extraits obtenues dans le Test de Galvinoxyl	54
Tableau XIV: Pourcentages d'inhibition du blanchiment du β-carotène par les extraits de <i>L. delicatulum</i>	59
Tableau XV : Coefficients de corrélation entre l'activité antioxydants et les teneurs en composés phénoliques.....	61
Tableau XVI: Activité anti-tyrosinase des extraits de <i>L. delicatulum</i>	63
Tableau XVII : Zones d'inhibition en mm obtenues avec les extraits de <i>L.delicatulum</i> contre les souches testées.	66
Tableau XVIII : Valeurs des CMI des extraits méthanoliques de <i>L.delicatulum</i>	69
Tableau XIX: Valeurs de LC50 des différents extraits méthanoliques et aqueux de <i>L.delicatulum</i>	71

Introduction générale

Les produits d'origine végétale constituaient, depuis l'antiquité, une source de remèdes pour plusieurs maladies infectieuses et métaboliques. De nos jours, les plantes ont reçu un énorme attrait de la part des consommateurs et des chercheurs, même avec les grandes avancées de la chimie organique pour le développement de molécules plus efficaces et moins dangereuses. En effet, les produits naturels et leurs dérivés constituent plus de 50% des médicaments utilisés dont un quart vient des plantes supérieures (**Eldeen et al., 2005**). Ces dernières ont l'aptitude de synthétiser de nombreux composés appelés métabolites secondaires et constituent donc un immense réservoir de composés d'une grande diversité chimique, possédant un large éventail d'activités biologiques.

La surproduction des espèces réactives d'oxygènes, au-delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques conduit au stress oxydant, qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs troubles tels que le cancer, les maladies neurodégénératives, cardiovasculaires et inflammatoires. Alors que l'utilisation de molécules antioxydantes de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels (**Bammou et al., 2020**). De plus, le traitement actuel de l'inflammation est basé sur l'utilisation des anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens. Ces molécules sont efficaces mais une prise à long terme peut entraîner des effets indésirables graves tels que les saignements gastro-intestinaux et les ulcères gastroduodénaux (**Orliaguet et al., 2013**).

Il y a plusieurs enzymes dont l'inhibition est considérée comme une cible du traitement ou prévention des maladies apparentées, y compris la tyrosinase. Cette dernière est une enzyme clé de mélanogénèse, chez l'homme la perturbation de l'activité de la tyrosinase cause des problèmes esthétiques et peuvent conduire à la maladie de Parkinson (**Ketata et al., 2017**). En effet, les faibles pénétrations cutanées et les effets mutagènes de composés d'origine chimique tels que l'hydroquinone utilisés dans les cosmétiques ont conduit à la recherche d'agents alternatifs pour traiter l'hyperpigmentation de la peau (**Nerya et al., 2003**). Cependant chez les végétaux, l'activité de cette enzyme est associée à un brunissement enzymatique indésirable conduit à des conséquences préjudiciables à la qualité organoleptique de l'aliment avec des conséquences économiques importante. De ce fait, de nombreuses études se sont concentrées sur l'utilisation additifs naturels pour diminuer la progression du brunissement dans la production des aliments (**Germanas et al., 2007**).

D'un autre côté, l'émergence de la résistance bactérienne, vis-à-vis des antibiotiques, constitue un sérieux problème de santé publique du fait de l'inefficacité et du nombre limité des agents antimicrobiens disponibles. En outre, devant le nombre très limité de nouvelles molécules antimicrobiennes en développement, l'augmentation des résistances présente une

sérieuse menace (**Magiorakos et al., 2012**).D'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouvelles molécules antimicrobiennes, d'origine naturelle, à cause de la toxicité des antibiotiques synthétiques.

La composition chimique et les composés bioactifs du genre *Limonium* sont rares et il existe un réel besoin d'une meilleure définition de leur mécanisme d'action. Par conséquent, la présente étude s'intéresse au *Limonium delicatulum* dans la continuité des efforts en cours sur les recherches phytochimiques et les propriétés biologiques des espèces de *Limonium*.

Dans ce contexte,le présent travail a pour objectif la mise en évidence de la présence de certains types de métabolites secondaires et d'évaluer les activités biologiques des extraits méthanoliques et aqueux de *Limonium delicatulum* afin de déterminer les potentiels pharmacologiques y compris ses activités antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-tyrosinases. En plus de déterminer l'activité antimicrobienne et cytotoxique.

Ainsi, l'étude est divisée en trois parties :

- ✓ La première partie de ce document est consacrée à une synthèse bibliographique ; sur la plante choisie, les composés phénoliques,le stress oxydant, la tyrosinase, l'inflammation, ainsi qu' un aperçu général sur l'activité antimicrobienne.
- ✓ La seconde partie du manuscrit est consacrée à la partie expérimentale, à savoir :
 - L'extraction, screening phytochimique, et dosage des composés phénoliques
 - Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydantes,anti-inflammatoire et antityrosinase
 - Evaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits testée sur un nombre de souches bactériennes pathogènes ainsi que leur effet cytotoxique sur les larves d'Artémia.
- ✓ Enfin la troisième partie présente les résultats obtenus ainsi que leurs discussions.

Chapitre 1 : Revue bibliographique

- 1 . Présentation de la plante étudiée : *Limonium delicatulum***
- 2 . Stress oxydant et radicaux libres**
- 3 . Polyphénols**
- 4 . Tyrosinase**
- 5 . Inflammation**
- 6 . Activité antibactérienne**

1. Présentation de la plante étudiée : *Limonium delicatulum*

1.1 Appartenance botanique

Limonium delicatulum est une plante appartient à la famille des Plumbaginaceae. Cette dernière comportant environ 650 espèces regroupées en 27 genres (Kubitzki, 1993). En Algérie, les Plumbaginaceae sont représentées par 33 espèces appartenant à 4 genres. La majorité des espèces de cette famille appartiennent au genre *Limonium* qui comprend environ 603 espèces généralement connues par les lavandes de la mer et sont distribuées dans les régions côtières dans presque toute la planète (Rodrigues et al. 2015).

1.2. Description botanique

Limonium delicatulum est une plante vivace, caractérisée par une longueur de 30 à 80cm, glabre, avec des tiges ramifiées à sa partie supérieure. Les feuilles sont sous forme d'une rosette radicale, de couleur bleu verdâtre, ovales de 10-25cm de long sur 15 à 30cm de large, présentant 2 paires de nervures latérales bien marquées presque parallèles. L'inflorescence est paniculée, pyramidale de 6-8cm avec des fleurs violettes de symétrie 5 et le calice est partagé jusqu'à sa base en cinq découpures pointues (Quezel et Santa, 1963).

1.3. Habitat et Distribution

L. delicatulum est une plante rosette que l'on trouve dans les régions côtières et les marais salés (Swapana et al., 2013). C'est est une plante native de la région méditerranéenne et l'Asie, mais elle est largement rencontrée dans plusieurs parties du monde, dans les régions froides et tropicales (Dolores Lied et al., 2005), en Egypte, en Tunisie, au Maroc, et aussi en Algérie (Quezel et Santa, 1963).

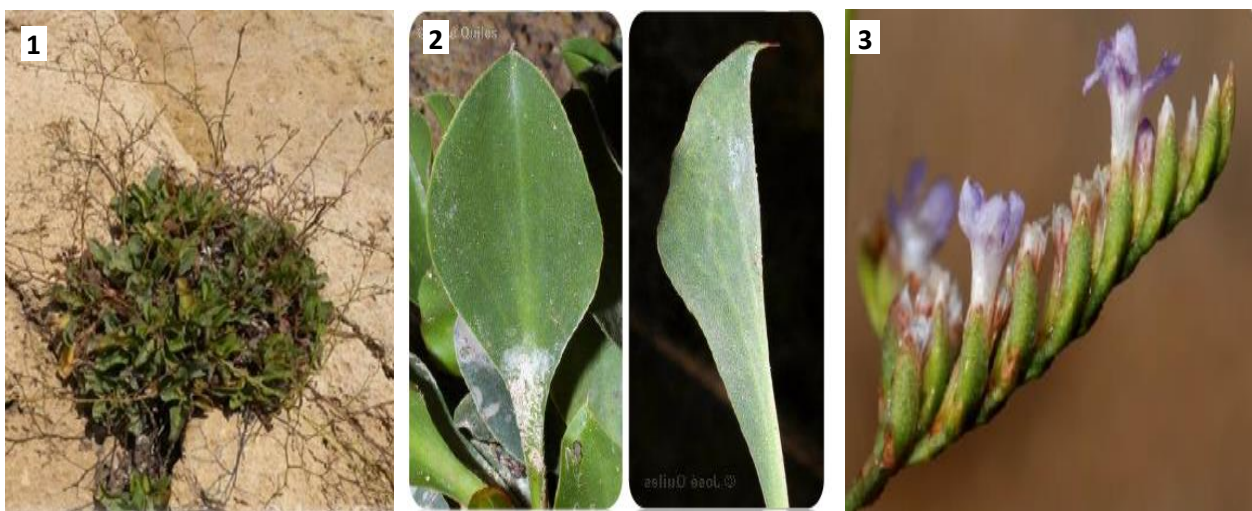


Figure 1: Photographies de *Limonium delicatulum* : Parties aériennes (1), Feuilles (2), et fleurs (3).

L. delicatulum est une espèce halophile des milieux salés, elle fleurit entre avril et octobre. La croissance de la plante dans des conditions difficiles indique que la plante peut tolérer un large éventail de conditions environnementales difficiles et résister aux stress abiotiques tels que le sel, la température élevée et les déficits hydriques (**Medini et al., 2014**). La plasticité remarquable de la plante lui permet de réduire ses dépenses d'eau, malgré la forte puissance d'évaporation de l'atmosphère, et enfin la concentration des métaux dans le sol des marais salés constitue un facteur déterminant dans la croissance, l'abondance, et la répartition des espèces végétales dont *L. delicatulum* (**Mezaache, 2004**).

1.4. Classification systématique (Cronquist ,1988)

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*.

Classe : *Magnolipsida*.

Sous-classe : *Caryophyllidae*.

Ordre : *Plumbaginales*.

Famille : *Plumbaginaceae*.

Genre : *Limonium*.

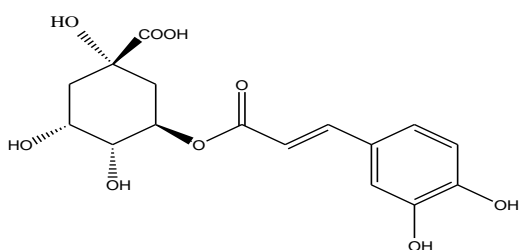
Espèce : *Limonium delicatulum*.

1.5. Composition chimique

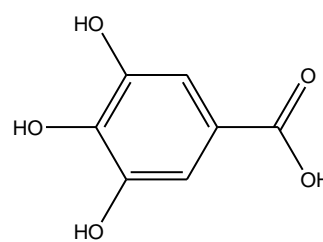
L'intérêt des halophytes est due essentiellement à leur composition chimique qui contient différents composés bioactifs comme les vitamines, les polysaccharides, et les polyphénols avec plusieurs effets pharmacologiques. En effet, l'exposition continue aux facteurs stressants comme la température et la salinité élevées stimulent la synthèse de plusieurs molécules comme moyens de défense et d'adaptation aux conditions de l'environnement (**Rodrigues et al. 2015**). Beaucoup d'espèces du genre *Limonium* constituent une source de différentes classes de métabolites secondaires avec diverses activités biologiques (**Ksouri et al., 2011**). Les composés phénoliques sont les plus étudiés comme composés d'intérêt pour ce genre. Par exemple **Foddai et al. (2014)** ont identifié plusieurs composés comprenant l'acide quinique, l'acide gallique, la catéchine, l'Epigallocatechin, la quercétine et la myricetin et leurs glycosides, dans les espèces *Limonium contortirameum* et *L. virgatum*. De même la composition phénolique de *L. delicatulum* a été déterminée par **Medini et al. (2014)** qui a rapporté des teneurs élevées en composés phénoliques comme les flavonoïdes et les tannins évaluées par des techniques de dosage colorimétriques. En plus, l'analyse par chromatographie en phase gazeuse (HPLC) a conduit à l'identification de l'acide chlorogénique, l'acide gallique, la rutine, l'acide 2-*p*-hydroxybenzoïque, l'acide 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoïque et l'acide *p*-coumarique comme les composés principaux dans

l'extrait méthanolique. En outre, une étude très récente effectuée par **Ruiz-Riaguas et al. (2020)** ont identifié un nombre de flavonoïdes et d'acides phénoliques avec la dominance des glycosides du flavonoïde Myricétine (figure 2).

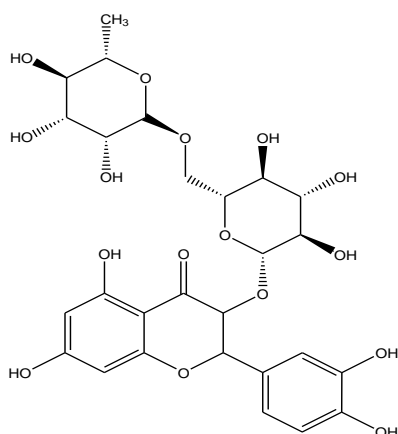
L'acide p-coumarique a des applications connues dans les industries alimentaire, sanitaire, cosmétique et pharmaceutique. Les autres phénols identifiés ont également des effets protecteurs importants. **Bouayed et al. (2007)** ont constaté que l'acide chlorogénique a une activité anxiolytique et antioxydante. De plus, l'acide gallique et la rutine se sont révélés protecteurs contre les effets délétères du H_2O_2 (**Cemili et al.,2008**).



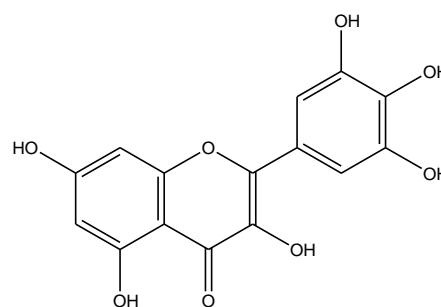
1. Acide chlorogénique



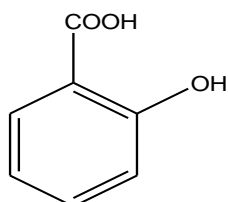
2. Acide gallique



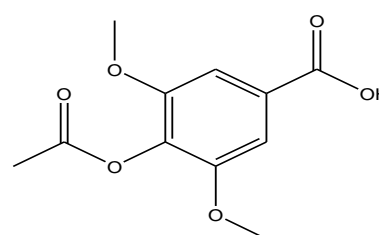
3. Rutine



4. Myricetine



5. Acide 2-p-hydroxybenzoïque



6. Acide 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoïque

Figure 2 : Structure chimique des principaux composés phénoliques identifiés dans *Limonium delicatulum*.

1.6. Effets thérapeutiques et utilisations traditionnelles de quelques espèces de *Limonium*

De nombreuses espèces et genres des *Plumbaginaceae* ont fait partie de l'arsenal de la médecine traditionnelle de plusieurs populations mondiales. Plusieurs espèces du genre *Limonium* ont été utilisées sous forme de décoctions ou d'infusions dans la médecine traditionnelle pour le traitement des hémorragies, des infections, et de la fièvre et beaucoup d'autres maladies (**Amrani et al., 2017**). Des études précédentes ont montré l'intérêt thérapeutiques de plusieurs espèces de *Limonium* exerçant divers effets en particulier l'effet antioxydants. Cet effet est exercé soit par neutralisation de radicaux libres ou par l'activité enzymatique comme la superoxyde dismutase, les peroxydases, et la glutathionne réductase (**Souid et al., 2019**). Beaucoup d'autres effets ont été également rapportés comme l'effet antitumoral, antiinflammatoire, antiprolifératif, antiviral (**Tang et al., 2012 ; Amrani et al., 2019 ; Mazouz et al., 2020**).

Les études pharmacologiques ainsi que phytochimique de l'espèce *L. delicatulum* sont très rares. Ce n'est que récemment que **Medini et al. (2014)** ont rapporté que les extraits organiques de la plante récolté pendant la période de floraison et végétative ont exercé une très forte activité antioxydants et un léger effet antimicrobien contre certaines souches bactériennes pathogènes. Plus récemment, **Ruiz-Riaguas et al. (2020)** ont également rapporté l'effet antioxydants important des extraits méthanoliques et aqueux des feuilles de *L. delicatulum*. De plus, l'effet inhibiteur des extraits sur un certain nombre d'enzymes (acétylcholinestérase, butyrylcholinestérase, α -amylase, α -glucosidase, et lipase) considérés comme d'importantes cibles pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, du diabète, et de l'obésité a été rapporté par la même recherche.

Le tableau ci-dessous donne quelques espèces de *Limonium* avec leurs utilisations traditionnelles selon les pays.

Tableau I: Utilisations traditionnelle de quelques espèces de *Limonium*.

Espèce	Organe/préparation	Effet thérapeutique
<i>Limonium sinense</i>	Racines, plante complète	- Effets Hépto-protectifs (Chaung et al., 2003)
<i>Limonium Brasiliense</i>	Infusion des racines, Extrait éthanolique des parties aériennes et des racines	- Effet anti-inflammatoire, activité antivirale contre l'herpès simplexe type-1 (HSV-1), propriétés hépto-protectives (De Paiva et al., 2003) -Hémorragies, rhumatisme, effets cardioprotecteurs, traitement de la dysménorrhée et les inflammations de l'utérus et de l'ovaire (Gancedo et al., 2018)
<i>Limonium axillare</i>	Extrait alcoolique des feuilles	Activité anticancéreuse (Kandil et al., 2000)
<i>Limonium algarvense</i>	Infusion and Décoction des fleurs	Effets antioxydants et anti-inflammatoire (Rodrigues et al., 2016)
<i>Limonium quesadense</i>	Extraits méthanolique et aqueux des feuilles	Activités antioxydants, anticholinestérase, anti-tyrosinase, anti-lipase (Ruiz-Riaguas et al., 2020)

2. Stress Oxydant et Radicaux libres

2.1. Généralités

Au sein de l'organisme, en situation physiologique, il existe un équilibre entre la production d'espèce réactive d'oxygène (ERO), qui est contrôlé par un système antioxydants renfermant des molécules enzymatiques et non enzymatiques endogènes et d'autres molécules exogènes (**Pincemail et al., 2002**), et la capacité antioxydante intracellulaire conduisant ainsi à une bonne régulation de l'état redox des cellules (**Durand et al., 2013**).

Les radicaux libres sont produits par les organismes aérobies et sont impliqués dans des processus physiologiques (transmission du signal, fonctionnement de certaines enzymes, défense immunitaire, cycle cellulaire, destruction par apoptose de cellules tumorales, différenciation cellulaire et la vasodilatation et (**Salganik 2001 ; Favier, 2006 ; Schrag et al., 2013**). Dans certaines conditions, il existe une baisse des défenses anti-oxydantes et/ou une hyperproduction des radicaux libres (**Roussel et Ferry, 2002**) entraînant ce qu'on appelle le stress oxydant qui est la conséquence du déséquilibre entre les antioxydants et les pro-oxydants (**De Moffarts et al., 2005**).

2.2. Oxydants

2.2.1. Espèces réactives d'oxygène (ERO)

L'oxygène (O₂) est une molécule indispensable à la vie (**Pincemail et al., 2002**). Il est nécessaire pour le métabolisme aérobie en tant qu'accepteur final des électrons de la chaîne respiratoire, 2 à 3 % de l'oxygène sont transformés en ERO particulièrement réactionnelles, si le processus de réduction de l'oxygène en eau n'est pas parfaits (**Koppenol, 2001**).

L'appellation ERO inclut les radicaux libres primaires de l'oxygène (radical superoxyde,, radical alkoxy, radical hydroxyle...etc),mais aussi certains dérivés réactives non radicalaires (radicaux secondaires) dont la toxicité est plus importante tels que le peroxyde d'hydrogène et le peroxyde d'hydrogène (**Bartosz, 2003 ; Halliwell et Whiteman 2004**). Le tableau II, résume les divers ERO.

Tableau II: Espèces réactives de l'oxygène (**Bartosz,2003**).

Espèces radicalaires		Espèces non radicalaires	
Nom	Symbole	Nom	Symbole
Anion superoxyde	O ₂ ^{•-}	Peroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂
Radical hydroxyle	OH [•]	Peroxyde organique	ROOH
Radical peroxyde	ROO [•]	Acide hypochlorique	HOCl
Monoxyde d'azote	NO [•]	Peroxyde nitrite	ONOO ⁻
Radical alkoxy	RO [•]	Oxygène singulet	¹ O ₂

2.2.2. Espèces réactives d'azote (ERN)

La forme radicalaire du monoxyde d'azote ($\text{NO}\bullet$) à un taux basal faible normale, joue un rôle régulateur (vasodilatation) ; mais dans les situations inflammatoire, il peut être produit en quantité plus importante (**Serteyn, 2002**). Il est paradoxalement impliqué dans de nombreuses pathologies telles que l'athérosclérose, le diabète, les lésions neuronales dégénératives et le cancer et (**Rezaire, 2012**).

Caractérisé par sa réactivité et sa grande capacité de diffusion dans les membranes cellulaires le $\text{NO}\bullet$ peut aisément réagir avec la plupart des espèces oxygénées moyenne et se transformer en dioxyde d'azote (NO_2), lequel peut donner du trioxyde d'azote (N_2O_3) pour enfin aboutir à un ion nitrate stable (NO_2^-). De plus, le $\text{NO}\bullet$ forme le peroxyneutre (ONOO) avec l' $\text{O}_2^{\bullet-}$, moins réactif que son précurseur azoté, mais responsable de l'oxydation de nombreuses biomolécules (**Rezaire, 2012**).

2.2.3. Principales sources des ERO

Les ERO sont produits dans l'organisme par de nombreux mécanismes tant exogènes ou endogènes.

2.2.3.1. Sources exogènes

Les facteurs exogènes associés à une production accrue et/ou à une diminution de l'élimination des ERO sont également très variés, parmi ces facteurs, on retrouve : tout d'abord les rayonnements (UV, X, γ), les radiations ionisantes et les radiations cosmiques (**Favier, 2006**). L'ingestion d'antibiotiques d'anticancéreux et d'alcool, est suivie de formation des radicaux libres selon divers mécanismes métaboliques *in vivo* (**Hadi, 2004**). Ainsi que les polluants : fumée de cigarette, pollution atmosphérique (dioxyde de soufre et d'azote (SO_2 , NO_2), les hydrocarbures et les métaux lourds et le dioxyde de carbone (CO_2) atmosphérique (**Valko et al., 2005**). L'alimentation riche en protéines et/ou en lipides et la faible consommation d'antioxydants (**Hu et al., 2006**).

2.2.3.2. Sources endogènes

À côté des sources non métaboliques (exogènes) d'EOR, les systèmes intracellulaires (endogènes) sont plus importants du fait que les EOR sont produits en continu durant toute la vie de chaque cellule dans l'organisme. Les EOR se forment de façon parasitaire dans toutes les réactions biochimiques comportant le transfert d'électrons ou la participation de l'oxygène. La principale source d'ERO est la chaîne de transfert d'électron des mitochondries qui dépend de l'activité enzymatique de la NADPH-oxydase. (**Wang et al., 2006**). Autres chaînes du transport d'électrons (ex : peroxymes et microsomes) dont les cytochromes P_{450} et b_5 s peuvent produire des ERO quand ils interrompent le cycle redox normal et détournent le flux d'électrons vers l' O_2 . En plus divers types cellulaires et tissus donnent naissance aux ERO par des réactions enzymatiques

ou par auto-oxydation au cours de leur métabolisme normale et parfois en réponse à un stimuli spécifique (Sevanian *et al.*, 1990).

2.2.4. Dommages macromoléculaires occasionnés par les ERO

La production excessive des ERO a pour conséquence l'apparition de dégâts tissulaires et cellulaires et souvent irréversibles dont différentes molécules biologiques, soient l'acide désoxyribonucleique (ADN), les protéines et les lipides (Favier, 2006 ; Valko *et al.*, 2006).

L'ADN est très vulnérable à l'attaque par les radicaux libres et subit donc différents dommages oxydatifs. Ces derniers peuvent induire des effets mutagènes ou l'arrêt des réplifications de l'ADN. Ils agissent en provoquant des modifications et des altérations des bases nucléiques, des pontages ADN-protéines ou des ruptures de chaîne simple ou double brin (Favier, 2003 ; Hadi, 2004).

Les lipides et précisément leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par les ERO, réaction appelée peroxydation lipidique. Ce mécanisme de dégradation des acides gras membranaires provoque la formation d'hydro-péroxydes instables qui induisent une diminution de la fluidité membranaire et donc une modification de différents récepteurs et de la transduction de signaux (Favier, 2003). Tandis que l'oxydation des protéines conduit à la formation des groupements carbonyles (C=O) et hydroxyles qui, favorise des modifications structurales très importante ; insolubilité, association, agrégation et résistance à la protéolyse (Martinez-Cayuela, 1995 ; Lehucher-Michel *et al.*, 2001 ; Valko *et al.*, 2007).

2.2.5. Implications pathologiques du stress oxydant

Les ERO dans l'étiologie de nombreuses maladies a été largement rapportée par la littérature (Diplock *et al.*, 1998;Aruoma, 1998 ;Martinez-Cayuela, 1995). De nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques, indiquent que le stress oxydant semble être un facteur capital dans plusieurs pathologies humaines différentes (Pincemail *et al.*, 2002) allant de l'athérosclérose au cancer, cataracte, tout en passant par les maladies inflammatoires, infections intestinales et le diabète.

Le rôle du stress oxydant a été également évoqué même dans des processus physiologiques tel que le vieillissement (Valko *et al.*, 2005), et il est potentiellement impliqué dans le développement des maladies liées à l'âge dont plusieurs maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et Parkinson (Atawodi, 2005 ; Georgetti *et al.*, 2003).

2.3. Anti oxydants

Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autre substrat oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ses substrats (Berger, 2006), ou de réagir facilement avec ses substances oxydantes pour les inactiver et les éliminer, ou diminuer leur superproduction (Vansant,2004).

La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu extracellulaire ou intracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en deux systèmes : enzymatiques et non enzymatiques (**Goudable et Favier, 1997**). Trois enzymes forment la clé de voûte de ce système antioxydant Il s'agit du superoxyde dismutase (SOD), de la catalase (CAT), et de la glutathione peroxydase (GPx). D'autres enzymes jouent un rôle non négligeable dans la lutte antioxydante comme : glutathion réductase, thioredoxine réductase et glutathiontransférase (**Sharma et al., 2012**).

Les systèmes antioxydants non-enzymatiques endogènes incluent comme des molécules très importantes : le glutathion, la bilirubine, l'acide lipoïque, l'acide urique (**Pincemail et al., 2002**), Ferritine, transferrine et albumine (**Marjorie, 2007**) . Des substances exogènes apportées par l'alimentation, telles que les vitamines C (acide ascorbique), E (tocophérols), Q (ubiquinone), les oligo-éléments (sélénium, cuivre, zinc, manganèse), β -carotène, les caroténoïdes (**Pincemail et al., 2002**), les flavonoïdes (**Pietta, 2000**) les polyphénols, les alcaloïdes, et les huiles essentielles (**Bruneton, 1999 a**), jouent le rôle de piègeurs de radicaux libres (**Favier, 2003 ;Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

3. Polyphénols

3.1.Généralités

Les composés phénoliques constituent un ensemble de molécules très largement répandues dans le règne végétal (**Gee et Johnson, 2001**), englobe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules naturels divisées en une dizaine de classes chimiques : les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols; les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes; les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes et d'autres classes existent en nombres considérables (**Dacosta, 2003**). Ces molécules présentent toutes un point commun : la présence d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones (phénol) porte une ou plusieurs fonctions hydroxyles (OH) libres ou engagé dans une fonction : éther, ester, hétéroside. (**Zerargui, 2015**).

Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieures et leur répartition tant qualitative que quantitative dans la plante varie selon les espèces, les tissus, les organes, ou encore les différents stades de développement (**Dehak, 2013**). Les polyphénols sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la germination des graines, la rhizogénèse, et la maturation des fruits (**Boizot et Charpentier, 2006**). Ainsi ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales, et les infections des pathogènes (**Gee et Johnson, 2001**).

Les polyphénols sont des molécules biologiquement actives (**King et Young, 1999**), et pourraient permettre de prévenir de nombreuses pathologies comme le cancer (**Brown et al., 1998**), les maladies cardio-vasculaires et dégénératives (**Paganga et al., 1999**). Un encouragement à la consommation d'aliments d'origine végétale riches en polyphénols constitue désormais une des principales recommandations en santé publique (**Gee et Johnson, 2001**).

3.2. Biosynthèse des polyphénols

L'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est divisée en deux grandes voies métaboliques principales :

3.2.1. Voie du shikimate

La voie de l'acide shikimique est la voie la plus importante pour la biosynthèse des composés aromatiques dans les plantes. Cette voie permet la transformation des monosaccharides, issus du métabolisme primaire, en acides aminés aromatiques (tyrosine phényalanine et tryptophane (**Ghasemzadeh A. et Ghasemzadeh N., 2011**). Ces acides aminés par désamination conduisent à la formation des acides cinnamiques et *p*-coumarique et à leurs dérivés, tels que les lignines, les acides benzoïques, acétophénone, lignanes, et les coumarines (**Bruneton, 1999 a**).

3.2.2. Voie d'acétate-malonate

La glycolyse et la β -oxydation aboutissent à la formation de l'acétylCoA donnant le malonate.

C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase permettant de former des noyaux aromatiques (**Akroum, 2010**). La voie de l'acétate-malonate intervient dans la synthèse d'un second noyau benzénique de nombreux composés ayant déjà un noyau aromatique obtenu par la voie du shikimate chez les végétaux supérieurs (**Richter, 1993**).

Donc La diversité structurale des composés phénoliques est due à cette double origine biosynthétique et augmente par la fréquence de combinaison des deux voies dans l'élaboration des composés d'origine mixte tels que les flavonoïdes (**Bruneton, 1999 b; Chira et al., 2008**).

3.3. Classification

Vue la diversité structurale des composés phénoliques, on peut distinguer des différentes classes de ces métabolites, en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure du squelette de base (**Harborne, 2000**), parmi ces dernières on trouve : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins et lignines et plus rares, les coumarines, les stilbènes et les quinones (**Balasundram et al., 2006**).

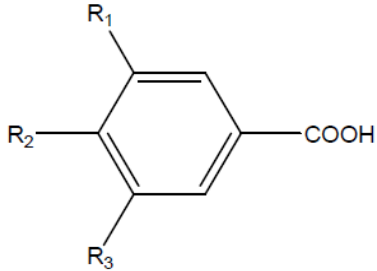
3.3.1. Acides phénoliques

Le terme d'acide phénolique peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (**Beddou, 2015**). Ils appartiennent à deux groupes, les acides benzoïques et les acides cinnamiques. Ces substances sont généralement à l'état soluble dans les vacuoles (**Macheix et al., 2006**).

3.3.1.1. Acides benzoïques

Les acides benzoïques sont des dérivés de l'acide benzoïque et présentent une structure générale de base de type (C6-C1) (**Harrar, 2012**), composée d'un noyau benzénique sur lequel s'attache une chaîne aliphatique à un carbone (tableau III). Ils incluent l'acide syringique, l'acide vanillique, et l'acide gallique, ce dernier est le composé le plus répandu dans la nature (**Chira et al., 2008**). Ces acides existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides et peuvent également être intégrés dans de nombreuses structures complexes comme celles de certains tannins (**Macheix et al., 2006; Richter, 1993**).

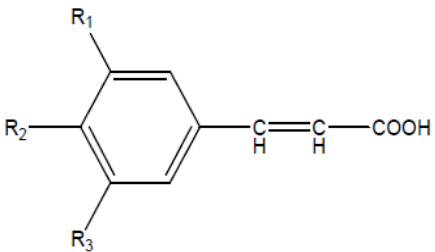
Tableau III: Différents dérivés de l'acide benzoïque (khater,2011).

Structure chimique de l'acide benzoïque	Substitutions			
	Dérivés d'acide benzoïque	R1	R2	R3
	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	H	OH	H
	Acide protocatéchique	H	OH	OH
	Acide vanillique	CH3O	OH	H
	Acide syringique	CH3O	OH	CH3O

3.3.1.2. Acides cinnamiques

Les acides cinnamiques sont dérivés de l'acide cinnamique et représentent une classe très importante, dont la structure générale de base de type C6-C3 (tableau IV) (Harrar, 2012). Ces acides sont rarement présents à l'état libre, ils existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques (Macheix *et al.*, 2006; Richter, 1993). Les acides cinnamiques les plus répandus dans la nature sont les acides *p* coumarique, caféique, sinapique et férulique et (Crozier *et al*, 2008).

Tableau IV: Différents dérivés de l'acide cinnamique (Bellebcir, 2008).

Structure chimique de l'acide cinnamique	Substitutions			
	Dérivés d'acide cinnamique	R1	R2	R3
	Acide <i>p</i> -coumarique	H	OH	H
	Acide caféique	OH	OH	H
	Acide férulique	CH3O	OH	H
	Acide sinapique	CH3O	OH	CH3O

3.3.2. Flavonoïdes

Le terme flavonoïdes dérive du latin *flavus* qui veut dire jaune. Les flavonoïdes sont des pigments de divers végétaux et sont responsables de la couleur des fleurs, des fruits et des feuilles (Andersen et Markham 2006). Parmi les polyphénols, ces composés constituent le groupe le plus abondant (Chira *et al.*, 2008), environ 4000 flavonoïdes ont été identifiés (Heim *et al.*, 2002). Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs et ils sont largement

abondants dans les légumes feuilles, ainsi que dans les téguments externes des fruits (**Wang et Mazza, 2002**). Chez les plantes, les flavonoïdes sont impliqués dans les processus de défense contre les ultraviolets, la stimulation des nodules de fixation de l'azote et la résistance aux maladies (**Chira et al., 2008; Marais et al., 2006**). Ils se trouvent soit à l'état libre, dans ce cas ils sont aglycones, soit sous forme de C- ou O-glycosides, et dans ce cas ils sont liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose, l'arabinose, ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères (**Dacosta, 2003**).

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et ils se caractérisent par un squelette de base à quinze atomes de carbone C6-C3-C6 (**Tapas et al.,2008; Pietta, 2000**), constitué de deux unités aromatiques,de cycle en C₆ (A et B),reliés par un hétérocycle en C₃ oxygéné (figure3) (**Balasundram et al., 2006**).

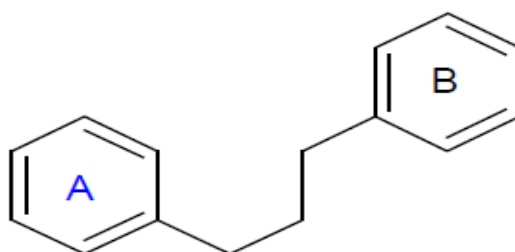
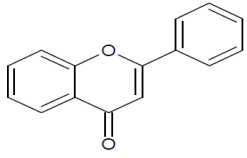
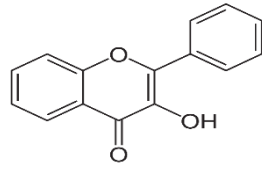
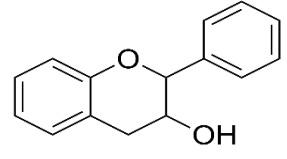
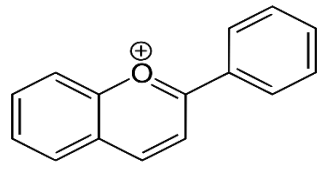
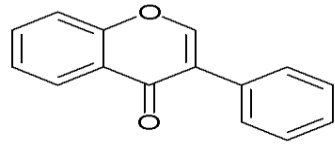
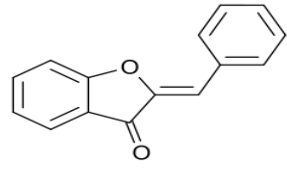
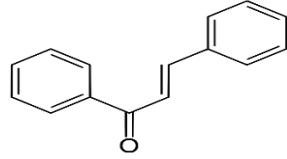


Figure 3 : Squelette chimique de base des flavonoïdes (**Heim et al., 2002**).

La structure de l'hétérocycle ainsi que son degré d'oxydation permettent de distinguer les différentes classes des flavonoïdes (**Macheix et al.,2006**) les plus importantes sont: les flavanones, flavones, flavonols, les isoflavones, ,flavan-3-ols et les anthocyanidines.Ils varient dans leurs caractéristiques structurales par la diversité fonctionnelle autour de l'oxygénation de l'hétérocycle (tableau V) (**Scalbert et Williamson 2000 : Pietta, 2000**).

Tableau V: Différentes classes de flavonoïdes d'après **Bruneton (2009)**.

Structure des différentes classes de flavonoïdes	Exemples	Substitutions					
		5	6	7	3'	4'	5'
	Naringénine	OH	H	OH	H	OH	H
	Hesperitine	OH	H	OH	OH	OMe	H

<p>Flavones</p> 	<p>Apigénine</p> <p>Chrysin</p> <p>Lutéoline</p> <p>OH H OH H OH H</p> <p>OH H OH H H H</p> <p>OH H OH OH OH H</p>																		
<p>Flavonols</p> 	<p>Kempférol</p> <p>Quercétine</p> <p>Myricétine</p> <p>OH H OH H OH H</p> <p>OH H OH OH OH H</p> <p>OH H OH OH OH OH</p>																		
<p>Flavan-3-ols</p> 	<p>Catéchine</p> <p>Gallocatéchine</p> <p>H H OH H OH H</p> <p>OH H OH H OH H</p>																		
<p>Anthocyanidines</p> 	<p>Pelargonidines</p> <p>Cyanidines</p> <p>Delphinidine</p> <p>OH H OH H OH H</p> <p>OH H OH OH OH H</p> <p>OH H OH OH OH OH</p>																		
<p>Isoflavones</p> 	<p>Génistéine</p> <p>Daidézéine</p> <p>OH H OH OH OH OH</p> <p>OH H OH OH OH H</p>																		
<p>Aurones</p> 	<p>Castillène</p> <p>Hispidol,</p> <p>aureusidine,</p> <p>sulfurétine,</p> <p>maritimetine</p>																		
<p>Chalcones</p> 	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>3</th> <th>4</th> <th>2'</th> <th>4'</th> <th>6'</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Butéine</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Phlorétine</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> </tr> </tbody> </table>		3	4	2'	4'	6'	Butéine	OH	OH	OH	OH	H	Phlorétine	H	OH	OH	OH	OH
	3	4	2'	4'	6'														
Butéine	OH	OH	OH	OH	H														
Phlorétine	H	OH	OH	OH	OH														

3.3.3. Tanins

Les tanins sont des substances phénoliques de structure variée, de saveur astringente solubles dans l'eau, et ayant des poids moléculaires compris entre 500 et 3000 unité (Sereme *et al.*, 2010).

Ils sont aptes à la préparation du cuir cela en formant des complexes stables avec le collagène (**Paris et Hurabielle., 1981**).

Selon leur composition et leur réactivité chimique, on distingue deux groupes de tanins différents : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Macheix et al., 2006**).

3.3.3.1. Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des oligo- ou polyesters de glucides et d'acides phénols. Le terme "tanin hydrolysable" décrit leur sensibilité à l'hydrolyse par voie enzymatique ou chimique (**Sereme, 2010**). Selon la nature de celui-ci on distingue : les tanins galliques, et les tanins ellagiques (**Paris et Hurabielle., 1981**).Ce groupe est principalement responsable des effets toxiques pouvant apparaître lors de la consommation de certaines plantes (**Veireling et al., 2003**).

3.3.3.2. Tanins condensés

Les tanins condensés sont des polymères flavanolique constitués d'unités flavan-3-4-diol ,tels que la catéchine ou l'épicatéchine (**Khanbabaea et Ree., 2001**). Le degré de polymérisation varie considérablement de quelques molécules de flavanols à plus de 50 (**Wollgast et Anklam., 2000**). Ils sont résistants à l'hydrolyse et seules les attaques chimiques fortes permettent de les dégrader contrairement aux tannins hydrolysables.

les tannins condensés sont également désignés par le terme « proanthocyanidine » car par traitement acide et à chaud,ils peuvent libérer des pigments rouges (les anthocyanidines).Ces derniers ne traversent pas la barrière intestinale, ils sont donc beaucoup moins toxiques que les tanins hydrolysables (**Dykes et Rooney,2006**).

3.3.4. Lignines

Les lignines sont des polymères fortement ramifié, composants du bois avec l'hémicellulose et la cellulose localisée dans les parois cellulaires et plus spécialement dans les parois secondaires des éléments conducteurs, contribuant, à la grande résistance mécanique,l'imperméabilité à l'eau et à la rigidité des tiges lignifiées. (**Martone et al., 2009**). Ils sont constitués de deux unités de phénylpropane (C6-C3) et entrent dans la composition de certaines céréales, graines, légumes, fruits, et ils sont fortement 1000 fois plus concentrés dans les graines de lins (**El Gharras, 2009**). Les lignines sont des très grands polymère, insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques, il sont donc impossible de les extraire sans les faire subir d'importantes dégradations (**Hopkins,2003**).

3.3.5. Stilbènes

Les stilbènes se caractérisent par un squelette de base à quatorze atomes de carbones C6-C2-C6. Ce sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux. .Ces composés se trouvent dans notre alimentation en très petite quantité, les sources principales des stilbènes sont, le soja, les arachides

et les raisins (**Crozier et al., 2006**). Le plus connu d'entre eux est le resvératrol (figure 4) qui a été largement étudié pour ses propriétés anticancéreuses mises en évidence lors de l'étude des activités biologiques de plantes médicinales (**Kundu, 2008 ;El Gharras, 2009**).

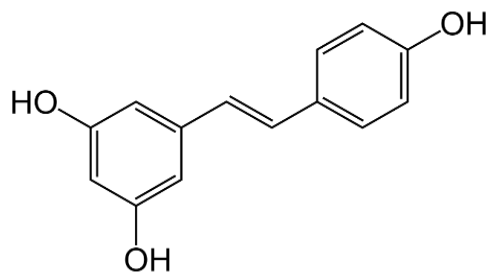


Figure 4: Structure chimique de Resvératrol

3.3.6. Coumarines

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone (**Lacy et O’Kennedy 2004**). Ce sont des composés issues du métabolisme de la phénylalanine via un acide cinnamique et l’acide *p*-coumarique. Le squelette de base des coumarines est constitué de deux cycles accolés avec neuf atomes de carbone (C6-C3),et toutes sont substituées en C7 par un hydroxyle (figure 5). Elles se trouvent dans la nature soit à l’état libre ou bien combiné avec des sucres (glycosylée), et elles sont responsables de l’odeur caractéristique du foin (**Cowan, 1999 ; Hoffmann, 2003**).

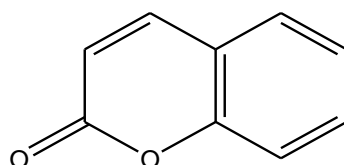


Figure 5 : Structure chimique des coumarines

3.4. Activités biologiques et effet pharmacologique des polyphénols

Les polyphénols sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, ces activités sont attribuées en partie aux propriétés anti-oxydantes de ces composés naturels. Ils sont susceptibles de réagir avec la plupart des ERO (**Sokol-Letowska A et al., 2007**); ils ont la capacité à inhiber la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxyde et peroxydes (**Hu et al., 2005**). Les composés phénoliques ont des propriétés antimicrobiennes et antivirales vis-à-vis de différents micro-organismes pathogènes (**Chung et Wei, 2001**). .

La principale propriété initialement attribuée aux flavonoïdes, est d’être venotonique et vasculoprotectrice (**Bruneton, 1999**). Actuellement, les flavonoïdes sont connus par des effets hypocholestérolémiants, anticancéreux (**Narayana et al., 2001 ; Seyoum et al., 2006**), anti-inflammatoires, anti-allergiques, anti-thrombotiques, anti-tumoraux et hépatoprotecteurs (**Middleton et al.,2000**).

A côté des activités citées précédemment, les flavonoïdes possèdent (d'autres activités : activité antidiabétique (**Marfak, 2003**). Certains flavonoïdes (notamment du soja) ont un effet préventif sur le cancer du sein, de la prostate et l'ostéoporose (**Besle et al., 2004**).

Les tanins présentent une activité antiulcéreuse, antiparasitaire, (**Chung et Wei, 2001**) et exercent un effet antidiarrhéique (**Bruneton, 1999**), qui est du à l'inhibition de la motilité intestinale (**De Bruyne et al., 1999**), ainsi ils ont également un effet vasoconstricteur sur les petits vaisseaux superficiels en favorisent la régénération des tissus en cas de blessures superficielles ou de brûlure (**Bruneton, 1999 a**).

Les coumarines sont utilisées pour leurs propriétés vasculoprotectrices, neurosédatives, diurétiques anti-inflammatoire, anticoagulante, antitumorale, Ils ont la capacité de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes, et peroxydes. Ils préviennent également la peroxydation des lipides membranaires (**Hennebelle et al., 2007 ; Khan et al., 2005 ; Thati et al., 2007**).

4 .Tyrosinase

4.1. Généralités sur la tyrosinase

La tyrosinase (EC 1.14.18.1) aussi appelée polyphénol oxydase ou monophénol monoxygénase, est une métalloprotéine transmembranaire de type I qui catalyse les deux premières étapes communes de la mélanogenèse (Seo et al., 2003).

La tyrosinase a été découverte pour la première fois en 1856 par Schoenbein dans le champignon *Boletus luciferus*. Elle semble être universellement distribuée chez les animaux, les plantes, les champignons et les bactéries. C'est une glycoprotéine de 569 acides aminés ayant une masse moléculaire d'environ 128 à 133 KDa (Leboukh, 2011). Elle est formée de 4 sous-unités, son site actif possédant deux atomes de cuivre qui sont nécessaires à sa fonction catalytique (figure 6) (Hall et al., 2005). La structure primaire est typiquement organisée en trois domaines : le domaine N terminal responsable de la maturation de la protéine enzymatique et de son adressage ; le domaine C-terminal qui couvre le site enzymatique et permet de garder l'enzyme sous forme inactive sur chemin sécrétoire ; le domaine central catalytique qui est le plus conservé chez toutes les espèces (Okombi, 2005).

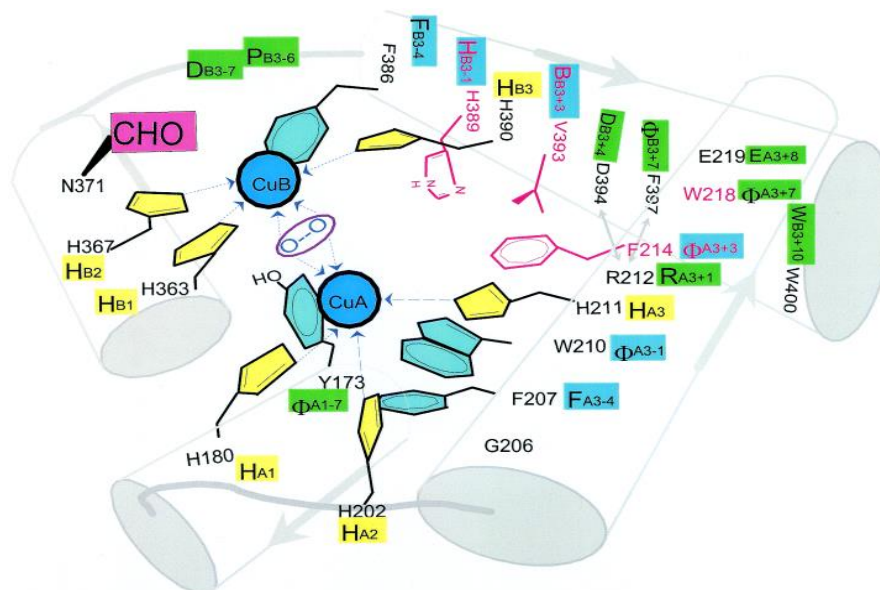


Figure 6 : Modèle du site actif de la tyrosinase de mammifères (Garcia et Solano, 2002).

4.2. Rôles physiologiques et effets indésirables de la tyrosinase

La tyrosinase humaine encodée par un gène situé sur le locus c du chromosome 11 est l'enzyme limitante dans l'initiation de la mélanogenèse (Zhao et Eling, 1996). Chez les mammifères, elle catalyse les réactions suivantes : L'hydroxylation de la L-tyrosine en 3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) ; il s'agit de l'activité monophénol hydroxylase. Ainsi l'oxydation de la L-DOPA en Dopaquinone ; dans ce cas on parle d'une activité catéchol oxydase (Rodriguez et al., 1991). De plus l'oxydation de la 5,6-dihydroxyindole (DHI) en indole quinone (Hamann et al., 2016).

Bien que la mélanine ait principalement une fonction photoprotectrice dans la peau humaine, l'accumulation d'une quantité anormale de mélanine dans différentes parties spécifiques de la peau est une caractéristique courante dans de nombreux types de troubles cutanés, y compris l'hyperpigmentation acquise (**Artès et al.,1998**), le lentigo solaire ou sénile, le mélasma, le mélanome ainsi que la neurodégénérescence associée à la maladie de Parkinson (**Ketata et al.,2017**). De plus son absence ou des mutations de son gène conduisent à une diminution voire à un arrêt de la pigmentation. Il a été établi que la mutation de son gène est associée à l'albinisme oculocutané de type I (**Spritz et Ho, 1997**).

Chez les insectes, les tyrosinases sont impliquées dans la production d'o-diphénols et quinones pour la pigmentation, la cicatrisation des plaies, dans le processus de sclérotisation, l'encapsulation des parasites et joue un rôle important dans le développement et les fonctions défensives (**Lee, 2002, Gederman et al., 2002**).

Dans l'agroalimentaire, la tyrosinase est connue sous le nom de polyphénol oxydase (PPO), est responsable des réactions de brunissement enzymatique des fruits et de certains végétaux (**Gederman et al., 2002**). Le brunissement est causé par l'oxydation des composés phénoliques, les réactions des amines,acides aminés, peptides et protéines avec des quinones (**Carpenter et al.,1981**). Ces réactions produisent des changements indésirables du point de vue organoleptique et en valeur nutritive du produit et éventuellement la sécurité des aliments (**Lee, 2002**).

4.3. Inhibiteurs de la tyrosinase

L'hyperpigmentation de la peau humaine et le brunissement enzymatique des fruits ne sont pas souhaitables. Ces phénomènes ont encouragé les chercheurs à rechercher des inhibiteurs de sources naturelles (tableau VI) , synthétiques, et semi synthétique puissants de la tyrosinase pour anti-brunissement des aliments et pour prévenir ou traiter les troubles de la pigmentation (**Mosher et al., 1983, Maeda et Fukuda ,1991**).

L'inhibition de l'activité de la tyrosinase peut être accomplie par l'un des éléments suivants:

- La réduction chimique de la dopaquinone par des agents réducteurs comme l'acide ascorbique, qui est utilisé comme inhibiteur de la mélanogénèse en raison de sa capacité à réduire le retour o-dopaquinone à la dopa, évitant ainsi les formations de dopachrome et de mélanine. (**Friedman M, 1996**).
- Un piègeur de o-Dopaquinone tel que la plupart des composés contenant du thio, qui sont des inhibiteurs de mélanogénèse bien connus et réagissent avec dopaquinone pour former des produits incolores (figure7). Le processus mélanogénétique est donc ralenti jusqu'à ce que tout le charognard soit consommé, puis il reprend son rythme initial (**Friedman et Bautista ,1995**).

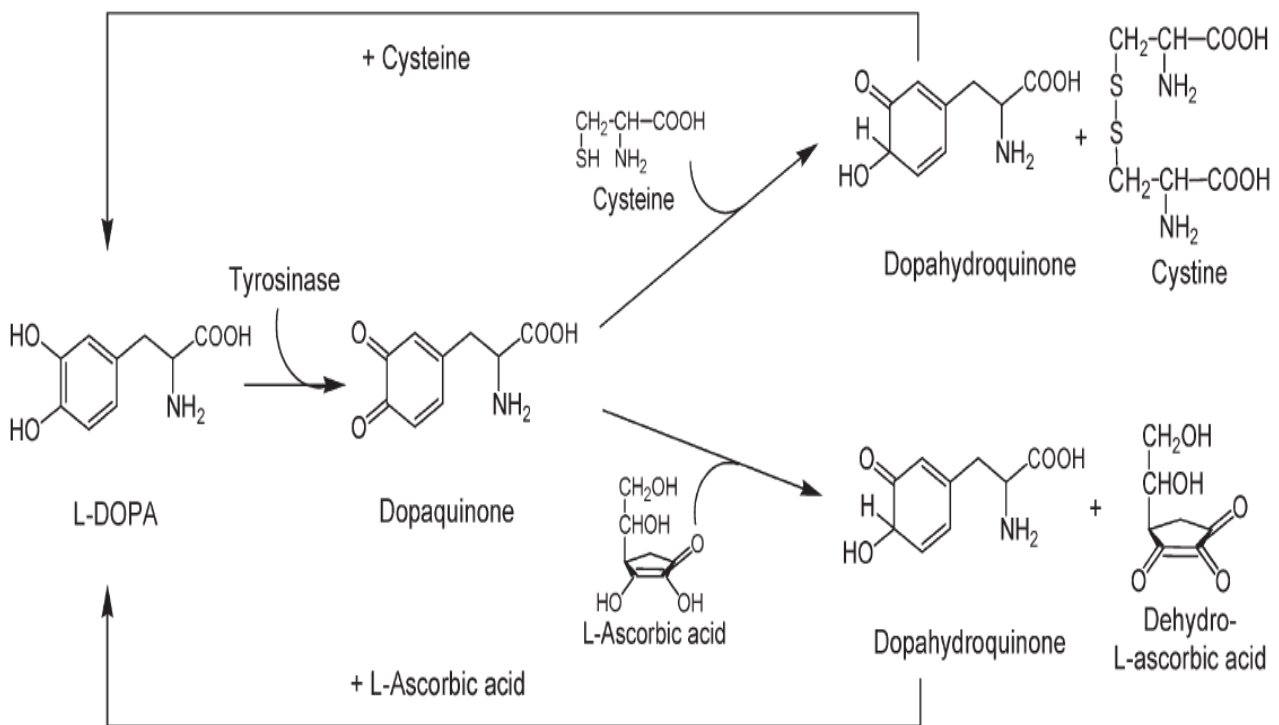


Figure 7 : Inhibition du brunissement enzymatique catalysé par la tyrosinase en piégeant l'intermédiaire dopaquinone avec de la cystéine ou de l'ascorbique acide.

- Substrats enzymatiques alternatifs tels que certains composés phénoliques, qui montrent une bonne affinité pour l'enzyme, la formation de dopachrome est empêchée. (**Badria et al., 2001**).
- Inactivateurs d'enzymes non spécifiques tels que les acides ou les bases, qui dénaturent de manière non spécifique l'enzyme, inhibant ainsi son activité (**Kubo et Kinoshita, 1998, Schallreuter et Wood 1990**).
- Inactivateurs de tyrosinase catalysés par la tyrosinase en formant une liaison covalente avec l'enzyme, inactivant ainsi pendant la réaction catalytique de manière irréversible l'enzyme. Ils inhibent l'activité de la tyrosinase en induisant l'enzyme catalysant la «réaction suicide» (**Espín et al., 2001**).
- Inhibiteurs spécifiques de la tyrosinase. Les composés se lient de manière réversible à la tyrosinase et réduisent sa capacité catalytique (**Cabanes et al., 1994**).

En plus de l'inhibition de l'activité catalytique de la tyrosinase, d'autres approches pour traiter l'hyperpigmentation ont été identifiées comprennent :

- L'accélération de la dégradation de la tyrosinase,
- L'interférence avec la maturation et le transfert des mélanosomes. (**Ando et al., 2007**).
- L'inhibition de la transcription de l'ARNm de la tyrosinase,
- L'aberration de la glycosylation et de la maturation de la tyrosinase (**Zhu et Gao, 2008**).

Tableau VI : Quelques exemples de molécules d'origine naturelle à activité antityrosinase.

Composé	Origine	Mode d'action
Arbutine	Ericacées	Altère la synthèse d'ADN, d'ARN et la formation du mélanosome (Matsubayashi et al., 2002)
Résorcinol	<i>Artocarpus incisus</i> (Moracées)	Analogues de substrat de la tyrosinase (Rescigno et al., 2002)
Resvératrol	<i>Rheum officinale</i> , (Polygonacées)	Inhibe l'activité DOPA-oxydase (Briganti et al., 2003)
Acide kojique	Champignons du genre <i>Agaricus</i> et <i>Penicillium</i> .	Inhibe l'activité catécholase (Battaini et al., 2000)
Mimosine	<i>Mimosa pudica</i> (Fabacées)	Chélation du cuivre (Rescigno et al., 2002)
Phénylthiourée	/	Dégradation de la tyrosinase (Hall et al., 2005)
Flavonoïdes et dérivés	- <i>Crocus sativus</i> , (Iridacées) - <i>Heterotheca inuloides</i> , (Astéracées) - <i>Buddleia coricea</i> , (Loganiacées)	Chélation du cuivre (Badria et al., 2005)
Cromones et l'aloésine	<i>Aloe vera</i> (Liliacées)	Moduler la synthèse de mélanine via une inhibition compétitive (Jones et al., 2002)

5. Inflammation

5.1. Généralités

L'inflammation est un processus de défense immunitaire de l'organisme en réponse à une agression d'origine endogène (cellules cancéreuses ou pathologies auto-immunes), exogène (brûlure, infection, allergie, traumatisme) dont le but est de maintenir son intégrité. (Iwalewa *et al.*, 2007 ; Barton, 2008). Ce processus est caractérisé cliniquement par la chaleur, rougeur, gonflement et douleurs, de plus, il peut survenir une altération du fonctionnement de l'organe touché (Hamdan, 2010). Au niveau tissulaire, la réponse inflammatoire se caractérise par l'augmentation de la dénaturation de protéines, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, et l'altération de membranes cellulaires (V Stankov, 2012).

Cette réponse, est un phénomène bénéfique pour l'organisme, dénommée inflammation aiguë, son but est de mobiliser le système immunitaire afin d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires (Hellal, 2007). Elle dure de quelques jours à quelques semaines, d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculoexsudatifs intenses (Charles *et al.*, 2010). Ainsi, non contrôlée, l'inflammation persistante peut être un facteur étiologique de diverses maladies chroniques comme l'athérosclérose, l'arthrite rhumatoïde, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives et le cancer (Weill *et al.*, 2003 ; Medzhitov, 2010).

5.2. Médiateurs d'inflammation

La réponse inflammatoire est initiée et contrôlée par de nombreux médiateurs chimiques, pro ou anti-inflammatoires, qui peuvent être des substances protéiques plasmatiques, présentes dans le sang circulant, ou proviennent de cellules telles que les mastocytes, les thrombocytes, les neutrophiles, les monocytes et les macrophages (Iwalewa *et al.*, 2007). Les rôles de ces médiateurs sont résumés dans le tableau VII.

Tableau VII : Effets des principaux médiateurs impliqués dans le processus inflammatoires.

Médiateurs de l'inflammation	Cellules sécrétrices	Rôles dans le processus inflammatoire
Histamine (Mayol <i>et al.</i> , 2013)	Mastocytes, plaquettes, éosinophiles et basophiles	- Augmente la perméabilité vasculaire, permet la contraction des muscles lisse et induit l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire.
Sérotonine (Rankin, 2004)	Mastocytes et plaquettes.	- Augmente la perméabilité vasculaire, et stimule la contraction des muscles lisses.

Leucotriènes (Henrotin et al., 2001)	Essentiellement par les leucocytes	- Stimule la production de l'IL-2, de l'IFN- γ et de l'IL-4 par les lymphocytes T. -Augmentent la perméabilité vasculaire,et participent à la formation de l'oedème, - Possèdent des propriétés chimiotactiques.
Prostaglandines (Iwalewa et al., 2007)	Essentiellement par les leucocytes	- Renforce l'action de des leucotriènes,histamine, de la bradykinine et provoquent la vasodilatation, -- Augmente la sensibilité des neurones et est responsable de la douleur.
Platelet activating factor (PAF) (Rankin, 2004)	Plaquette, neutrophiles, monocytes et cellules endothéliales.	- Augmente l'adhésivité de la paroi vasculaire et l'agrégation des plaquettes, - la libération des enzymes lysosomiales et la production des ERO.
TNF- α et IL-1 β (Koechlin, 2006)	Macrophages	-Stimulent l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales favorisant ainsi la migration des leucocytes vers le site enflammé, -Stimulent l'activation de la phospholipase A2, la libération des chimiokines, et activent la production intracellulaire d'espèces réactives d'oxygène.
IL-6 (Ostrowski et al., 1999 ; Mayol et al., 2013)	Lymphocytes T	-Favorise le recrutement des monocytes sanguins, -Induit localement l'activation des phagocytes,vers les tissus enflammés, et la production de la protéine C réactive.
IL-8 (Henrotin et al., 2001 ; Mayol et al., 2013)	Lymphocytes T	- Possède des propriétés chimioattractantes pour les monocytes es neutrophiles, et les macrophages, -Induit la libération d'enzymes lysosomiales,d'oxydant et de médiateurs lipidiques.
Métalloprotéases (Manicone et McGuire, 2008 ; Mayol et al., 2013)	Cellules de l'épiderme	- Modifient la matrice extracellulaire en dégradant ses composants et facilitent la migration des cellules immunitaires vers le site inflammatoire.
Substance P (Henrotin et al., 2001 ; O'Connor et al., 2004)	Mastocytes	- Stimule la production d'immunoglobulines et la prolifération des lymphocytes, - Stimule le chimiotactisme et favorise la sécrétion des cytokines de l'inflammation,libération des radicaux oxygénés, l'histamine et les dérivés de l'acide arachidonique .
Bradykinine (Rankin, 2004)	Présente dans le plasma sous forme de kininogènes	- Accroît la vasodilatation, la perméabilité vasculaire et stimule la contraction des muscles lisses.

5.3. Anti-inflammatoires

5.3.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont des médicaments aux propriétés anti-inflammatoires, antalgiques et antipyrétiques. Plusieurs classifications sont proposées, fondées

soit sur la structure des AINS, la puissance, les modalités d'action et/ou la sélectivité anti-COX (Cuvillon et Viel, 2002). En effet, les AINS agissent tous en inhibant les deux isoformes de la cyclo-oxygénase (COX-1 et COX-2), diminuant ainsi la synthèse des prostaglandines (notamment la PGE2 et la PGI2), importants médiateurs de l'inflammation et du thromboxane A2 (Nicolas *et al.*, 2001).

Les AINS, en inhibant la synthèse de prostaglandines qui ont un rôle ubiquitaire et des fonctions physiologiques importantes dans l'organisme conduisant à des effets secondaires et des événements défavorables. Sa production basale permet l'homéostasie tissulaire : production de mucus, de bicarbonates, maintien de l'hémodynamique rénale en cas d'hypoperfusion en particulier et maintien du flux sanguin sous muqueux gastrique (Risser *et al.*, 2009). L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les AINS semblait donc, jusqu'à récemment, devoir obligatoirement s'accompagner d'effets délétères (Blain *et al.*, 2000).

5.3.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)

Les médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol. Les glucocorticoïdes (GC) traversent librement les membranes cellulaires, se fixent sur des récepteurs spécifiques qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires aux stéroïdes et migrent vers le noyau et agissent directement sur l'ADN en se fixant sur des séquences spécifiques, dites GRE (Glucocorticoid Response Element) (Barnes, 1998). Ce complexe intervient dans la régulation de la transcription des gènes cibles en réduisant la production de facteurs chimiotactiques, la phagocytose, la perméabilité capillaire, bloquant ainsi la libération d'histamine, de sérotonine, et de bradykinines. De plus, les GC peuvent inhiber l'action de certaines protéines nucléaires transactivatrices, dont la protéine activatrice-1 (AP-1) et le NF- κ B, augmenter la transcription des gènes anti-inflammatoires et inhibant ainsi l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6) récepteurs et molécules d'adhésion et la production de la phospholipase A2 (Rhen et Cidlowski, 2005).

Comme pour les AINS, l'usage des glucocorticoïdes est associé à de nombreux effets indésirables. Le risque d'apparition de ces effets indésirables s'accroît avec l'augmentation de la posologie et le prolongement de la durée du traitement. Divers troubles peuvent être observés tels que, la dérégulation de la synthèse naturelle de glucocorticoïdes à la fin du traitement, l'hypertension artérielle, ainsi que des troubles digestifs (apparition d'ulcères gastro-duodénaux), endocriniens (prise de poids), musculosquelettiques (ostéoporose) (Henzen, 2003).

5.3.3. Anti-inflammatoires naturels

La phytothérapie est utilisée depuis toujours dans la médecine traditionnelle. Le nombre de composés phytochimiques, trouvé dans les plantes médicinales est très vaste, et leurs spectre d'activité est tout aussi grand (**Sawadogo et al., 2008**) . Les plantes anti-inflammatoires regroupent des espèces de diverses familles dont les principes actifs sont responsables de l'activité anti-inflammatoire en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxygénase ainsi que par d'autres mécanismes (**Barnes, 1998**).

Tableau VIII : Exemples de plantes médicinales douées d'activités anti-inflammatoires.

Plantes	Protocole	Mode d'action
<i>Limonium spathulatum</i> (Plumbaginaceae)	Partie aérienne	L'inhibition du pro-inflammatoire :l'oxyde nitrique (NO) (Mazouz et al.,2020)
<i>Zygophyllum gaetulum</i> (Zygophyllaceae)	Partie aérienne	Inhibe la libération de l'histamine, la sérotonine, les kinines et la cyclooxygénase (Ait El Cadi et al.,2012)
<i>Ruta chalepensis</i> (Rutaceae)	Feuilles, tiges, et fleurs	Inhibition de la dénaturation des protéine (albumine bovine : BSA) (Gali et Fedjou, 2019)
<i>Phoenix dactylifera</i> (Arécaceae)	Fruit	Inhibition de la proteine kinase C (Bouhlali et al.,2020)
<i>Centella asiatica</i> (Apiaceae)	Plante entière	Stabilisation des membranes d'érythrocytes (Chippada et al.,2011)
<i>Drynaria quercifolia</i> (Polypodiaceae)	Rhizomes	Inhibition du COX I et COX II (Das et al.,2014)
<i>Cardiospermum halicacabum</i> (Sapindaceae)	ND	Inhibition du NO et TNF- α (Huang et al.,2011).
<i>Wedelia trilobata</i> (Asteraceae)	Fleurs,tiges	Inhibition de la sécrétion des protéinases (Govindappa. et al. ,2011)
<i>Mangifera indica L</i> (Anacardiaceae)	Tiges	Inhibition de PLA2, TNF- α ,PGE ₂ (Guarrido et al.,2004)

ND : non déterminé.

5.4.Pathologies inflammatoires

De nombreuses maladies inflammatoires sont liées à des mécanismes considérés comme dysfonctionnement immunitaire. Ces affections récemment regroupées sous le terme d'IMID

(*Immune Mediated Inflammatory Diseases*) comprennent trois grandes entités nosologiques : les maladies auto-immunes localisées (spécifiques d'organe) et systémiques (non spécifiques d'organe) et les maladies auto-inflammatoires, les affections inflammatoires de mécanisme indéterminé dont le mécanisme n'est pas auto-immun (**Sibilia,2007**). Quelques exemples sont rapportés dans le tableau IX.

Tableau IX : Exemples de pathologies liées à l'inflammation (**Nathan, 2002**).

Désordres dans lesquelles le rôle pathogénique principal revient à l'inflammation

Asthme, goutte, polyarthrite rhumatoïde, eczéma, artériosclérose, arthrose, thyroïdite d'Hashimoto, lupus érythémateux disséminé, maladie de Crohn , maladie d'Alzheimer.

Maladies d'origine infectieuse dans lesquelles l'inflammation contribue à la pathologie

Tuberculose, hépatite C, dysenterie bactérienne, syndrome de sepsis.

Maladies d'origines diverses dans lesquelles la fibrose post-inflammatoire est la cause principale de la pathologie

Cirrhose hépatique poste virale ou alcoolique, Bilharziose, fibrose pulmonaire, rejet d'allogreffe chronique.

6. Activité antibactérienne

6.1. Généralités

Les agents antimicrobiens désignent un ensemble de différentes molécules agissant à faibles concentrations et exerçant un effet antimicrobien sur un nombre de microorganismes (bactéries, virus, champignons, parasites) (Swingleton et Sainsbury, 2006), par deux mécanismes principaux : ceux qui détruisent appelés microbicide, et ceux qui les inhibent sont appelés microbiostatique (Prescott et al., 2003). Les antibiotiques, sont des produits d'origine naturelle élaborés par des microorganismes (moisissures : *Penicillium* et *Aspergillus* ou bactéries : des genres *Streptomyces* et *Bacillus*) et constituant la grande partie des agents antimicrobiens disponibles sur le marché, mais en inclut généralement parmi eux les dérivés semisynthétiques et entièrement synthétiques (Nauciel, 2000 ; Peláez, 2006). Depuis la découverte de la pénicilline en 1929, d'autres agents antimicrobiens plus efficaces ont été isolés particulièrement d'actinobactéries et de champignons, et mis au point par l'élucidation des cibles médicamenteuses et par une modification des molécules médicamenteuses (Kohanski et al., 2010). Le tableau X représente quelques exemples d'antibiotiques commercialisés.

La plupart des antibiotiques inhibent des voies métaboliques, certains agissent comme antagonistes métaboliques ou antimétabolites, ou inhibiteurs compétitifs, d'autres substances agissent en endommageant ou en entravant les fonctionnements normaux des microorganismes. Chaque famille d'antibiotiques possède son propre mode d'action (figure8) ((Nauciel et Vildé, 2009).

- Les antibiotiques agissant sur la synthèse de la paroi bactérienne en inhibant la DD-transpeptidase ou l'enzyme responsable de la formation des ponts entre les chaînes des peptidoglycane conférant ainsi la rigidité à la paroi, comprennent les bêta-lactamines (Charlier et al., 1998).
- Les antibiotiques agissant sur la synthèse protéique en inhibant la transcription de l'ARNm en protéine au niveau de la sous-unité 50S, en bloquant le transport des aminoacyl t-RNA au niveau de la sous-unité ribosomale 30S (Walsh, 2003), ou par liaison irréversible avec la sous-unité 30S (Kim et Nicolau, 2007), comprennent les aminosides, les tetracyclines, les macrolides (Carbon et al., 1994).
- Les antibiotiques agissant sur la synthèse des acides nucléiques en inhibant certaines enzymes intervenant dans la transcription et la réplication de l'ADN comprenant le triméthoprim, les quinolones, les nitro-imidazoles et les rifamycines (Cattoir, 2004).
- Les polymyxines agissant au niveau des membranes plasmique (Bergogne et al., 1995).

Tableau X : Exemples d'antibiotiques commercialisés dérivant de molécules naturelles produites par les microorganismes (Peláez, 2006).

Métabolite d'origine	Nom commercial	Espèce productrice
Pénicillines	Pénicilline G, V, Ampicilline, Méthicilline, Amoxicilline, Carbenicilline	<i>Penicillium spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i>
Céphalosporines	MEFOXIN (Céfoxitine), CECLOR (Cefaclor), CLAFORAN (Céfotaxime), ROCEPHIN (Céftriaxone), CEFTIN (Céfuroxime)	<i>Acremonium spp.</i> , <i>Emericellopsis spp.</i> , <i>Amycolatopsis lactamdurans</i> , <i>Streptomyces clavuligerus</i>
Thienamycine	PRIMAXIN (Imipenem), INVANZ (Ertapenem)	<i>Streptomyces cattleya</i>
Erythromycine	ERYTHROCIN, ZITHROMAX (Azithromycine), BIAXIN (Clarithromycine), KETEK (Telithromycine)	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>
Vancomycine	VANCOCIN	<i>Streptomyces orientalis</i>
Fosfomycine	MONURIL	<i>Streptomyces fradiae</i>
Mupirocine	BACTROBAN	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Acide fusidique	FUSIDIN LEO	<i>Fusidium griseum</i>
Streptogramines	SYNERCID (Dalfopristine/quinupristine)	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>
Daptomycine	CUBICIN	<i>Streptomyces roseosporus</i>

Le nom commercial est en majuscule, les noms entre parenthèses désignent les molécules issues de la semi-synthèse du métabolite d'origine.

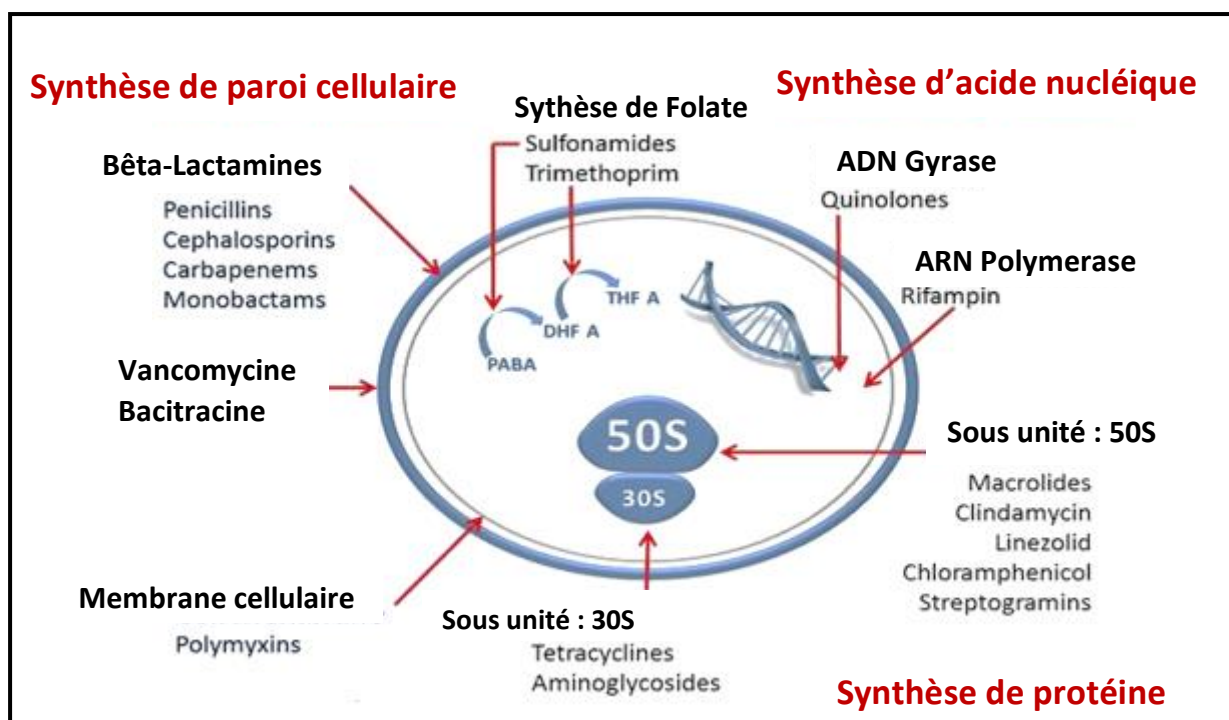


Figure 8 : Différentes cibles des antibiotiques (Munteanu et Uivarosi,2021).

6.2. Résistance microbienne

L'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques est un problème mondial sérieux, il a été observé dès les premières années en raison de l'utilisation accrue de ces agents antimicrobiens en médecine humaine, vétérinaire et dans l'agriculture. Ceci a orienté la recherche pour l'identification et le développement de nouvelles biomolécules antimicrobiennes efficaces avec de nouveaux mécanismes d'action (Goossens *et al.*, 2005).

6.2.1. Définitions

La résistance microbienne aux antibiotiques aurait deux origines essentielles, naturelle et acquise. La première est programmée au niveau du pool génomique alors que la deuxième est développée en fonction des conditions métaboliques (Julian et Dorothy,2010). En effet, la résistance naturelle est une résistance intrinsèque, due essentiellement à la présence de gènes spécifiques (Allen *et al.*, 2010). Elle se caractérise par des modifications structurales et métaboliques. Les gènes de résistance sont exprimés soit d'une manière constitutive ou bien induite en répondant à un signal enzymatique établi par la mise en oeuvre d'un processus d'échappement vis-à-vis de l'antibiotique (Doyle, 2006). Tandis que la résistance acquise, peut être définie d'un point de vue microbiologique par la présence d'un déterminant génétique : Acquisition des gènes de résistance ou mutation.

Grâce à ce processus les bactéries des mêmes espèces partagent entre elles des informations génétiques, ou entre des espèces différentes (Springman *et al.*,2009).

L'acquisition d'ADN se fait le plus souvent par conjugaison, elle se fait alors par l'intermédiaire de plasmides ou ADN (transposons). Dans certaines espèces l'acquisition d'ADN peut se faire par transformation, le transfert de gène de résistance par l'intermédiaire d'un bactériophage (transduction) est rare (**Nauciel, 2000**).

La résistance peut être à spectre croisée concernant plusieurs agents antibiotiques de modes d'actions et structures différentes ou étroit, limitée à certain nombre d'antibiotiques de structures voisines (**Cattoir, 2004**). Trois groupes de souches résistantes ont été distingués, selon le nombre d'agents antimicrobiens auxquels les bactéries présentent une résistance : les souches résistantes à plusieurs (trois ou plus) classes d'agents antimicrobiens qui sont désignées par le terme MDR (*multidrug resistant*), les souches résistantes à tous ou presque tous les agents antimicrobiens disponibles ou *extremely drug resistant* (XDR), et la dernière catégorie représente les bactéries résistantes à tous les agents antimicrobiens ou *pandrug resistant* (PDR) (**Magiorakos et al., 2011**).

6.2.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Les microorganismes possèdent des mécanismes évolués qui leur permettent d'échapper à l'action des antimicrobiens. Plusieurs mécanismes de résistance bactérienne ont été décrits. Cette dernière se peut avoir lieu par les mutations simples réduisant l'affinité à la cible de l'antibiotique, par la dégradation ou la modification des antibiotiques par des enzymes spécifiques secrétées par les bactéries (**Silver, 2011**), ou par la diminution de la concentration de l'agent antibactérien à l'intérieur de la cellule (**Wright, 2005**).

6.2.2.1. Modification des cibles des antibiotiques

Dans certaines situations, les bactéries ont la capacité de modifier l'affinité de ses protéines de liaison à des antibiotiques spécifiques (figure 9). C'est le cas des protéines de liaison à la pénicilline telles que la protéine dite PBP2a (penicillinbinding protein 2a) qui diminue l'affinité de l'oxacilline et autres bêtalactamines (**Tenover, 2006**). Certaines souches pathogènes mobilisent le positionnement de leurs organites pour échapper à l'action des antibiotiques. Par exemple, les ARN ribosomiques de méthylation (rRNA methylase), suite à des mutations chromosomiques, modifient l'emplacement topologique des ARNr 16S vers des positions spécifiques privilégiant ainsi ces complexes de l'action des antibiotiques de la famille des aminoglycosides (**Jana et Deb, 2006**).

6.2.2.2. Inhibition d'antibiotiques

Certaines bactéries synthétisent des enzymes qui inhibent l'action des antibiotiques en dégradant ou en modifiant ce dernier (figure 9). La modification des antibiotiques peut se faire de différentes façons selon les réactions chimiques catalysées (**Dzidic et al., 2008**). Les

enzymes qui réalisent le blocage et/ou la dégradation des antibiotiques sont diverses, par exemple, la β -lactamase détruisant les antibiotiques de la famille des β -lactamines comme la pénicillines et les rendant inactives (**Quincampoix et Mainardi, 2001**). D'autres enzymes telles que les acétyltransférases, les nucléotidyltransférases et les phosphotransférases sont connues par leurs capacités à modifier l'affinité des antibiotiques de la famille des aminoglycosides (**Jacoby et Munoz-Price, 2005**).

6.2.2.3. Réduction de la concentration intracellulaire de l'antibiotique

Certaines souches bactériennes empêchent les antibiotiques de rentrer dans la cellule bactérienne, et cela grâce à un mécanisme de transport particulier dit pompe à efflux (figure 9) qui leur permet d'exporter les antibiotiques à l'extérieur (**Li et Nikaido, 2009**) et/ou une imperméabilité par exemple :La résistance à l'imipénème chez *Pseudomonas aeruginosa* par modification ou perte de la porine OprD (**Cattoir, 2004**).

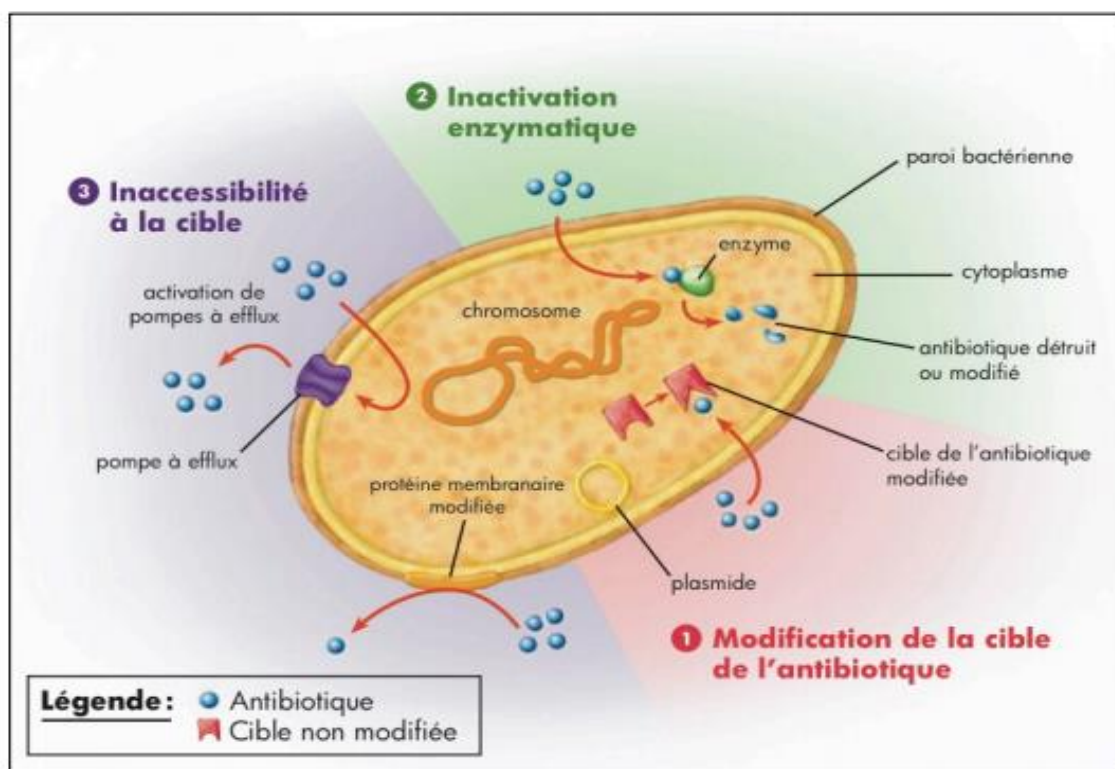


Figure 9: Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques (**Coûtès ,2016**).

6.3. Agents antimicrobiens dérivant des plantes

La toxicité des produits synthétiques est devenue un sérieux problème de santé publique qui concerne une large gamme d'antibiotiques et qui se manifeste dans tous leurs champs d'application, d'où l'intérêt croissant de chercher de nouveaux composés d'origine naturelle en particulier celles produites par les plantes (**Khan et Ahmad, 2012**).

Les plantes sont considérées comme une source importante de molécules à activité antimicrobienne, qui appartiennent à plusieurs classes comme les polyphénols, les terpenoïdes,

les alcaloïdes, les peptides...etc. (Cowan, 1999), et pouvant être utilisés pour le traitement des maladies infectieuses (Sher, 2009). Par exemple, les polyphénols renferme plusieurs sous classes incluant les acides phénoliques, flavonoïdes, coumarines, et tannins...etc ,dont l'activité antimicrobienne a été largement étudiée (Daglia, 2012).

Les dérivés naturels et synthétiques des coumarines qui présentent un noyau 2H-1-benzopyran-2-one dans leur structure possèdent une activité antimicrobienne largement rapportée dans la littérature contre un grand nombre de bactéries Gram positif et Gram négatif (Al-Majedy et al., 2017).

L'hydrophobicité des flavonoles permet de s'insérer dans les phospholipides membranaires et exercer leurs effets antibactériens à l'intérieur de la cellule (Daglia, 2011).

Les alcaloïdes représentent un groupe de composés structurellement diversifié synthétisés par les plantes, par certains animaux et microorganismes (Hesse M, 2002). Ils ont inspiré le développement de plusieurs médicaments antibactériens, avec la synthèse de la quinine par hasard produisant les quinolones dont la première quinolone à effet antibactérien est l'acide nalidixique. En association avec les antibiotiques couramment utilisés, il a été montré que certains alcaloïdes d'origine naturelle ou semi-synthétiques ont un effet synergique (Hraiech et al., 2012, Bogatcheva et al., 2011; Parhi et al., 2012).

Il existe d'autres classes chimiques possédant différents composés à activité antimicrobienne comme les composés terpéniques (mono-terpènes, sesquiterpènes,) présents dans l'huile essentielle de certaines plantes, les isothiocyanates, les thiosulfates, les polyamines, et les glucosides, (Cowan et al., 1999). Des exemples de quelques substances synthétisées par les plantes à effet antimicrobien sont représentés dans le tableau XI.

Tableau XI : Quelques exemples de molécules d'origine naturelle à effet antimicrobien.

Composé	Origine	Mécanisme d'action
<i>Chrysine</i> (Critchfield et al., 1996)	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Inactivation de certaines enzymes membranaires.
<i>Epigallocatechine</i> (Shimamura et al., 2007)	<i>Camellia sinensis L</i>	Fixation sur le peptidoglycane et perturbation de la synthèse de la paroi
<i>Phloridzine</i> <i>Apiine</i> (Bernard et al., 1997)	Rosaceae, Symplocaceae <i>Petroselinum crispum</i>	Inhibition de la topo-isomérase
<i>Pergularinine et Tylophorinidine</i> (Narasimha Rao et Venkatachalam, 2000)	<i>Pergularia pallida</i>	Inhibition de la dihydrofolate réductase
<i>Berbérine</i> <i>Piperine</i> (Freiburghaus et al., 1996)	Espèces de <i>Berbéris</i> <i>Pipéracées</i>	Inhibition de la réplication par le blocage de l'activité de l'ADN-polymérase .
<i>Thymoquinones</i> <i>Anthraquinone</i> (Marini et al., 2015)	<i>Nigella sativa</i> <i>Cassia italica</i>	Fixation aux adhésines, inactivation de certaines enzymes membranaires.
<i>Sanguinarine</i> (Beuria et al., 2005)	<i>Sanguinaria canadensis</i>	Perturbation de la formation de l'anneau Z lors de la division cellulaire .
<i>Terpènes : α-pinene, β-pinene, γ-terpinene, p-cymène, terpinène-4-ol, α-terpinéol.</i> (Dunkic et al., 2010)	Plusieurs plantes	Inhibition de la respiration oxydative.
<i>Carvacrol et Thymol</i> (Delaquis et al., 2002)	Plusieurs plantes	Désintégration de la membrane externe et libération du matériel cellulaire à l'extérieur.

Chapitre 2 : **Matériel et Méthodes**

1. Matériel végétale

Les feuilles et les racines de *Limonium delicatulum* ont été récoltées en Août 2018 lors de la floraison au niveau de la région de Tella ,Sétif (Nord-Est Algérien). La plante a été authentifiée par le Dr Aliat Toufik,département de biologie,Université Bordj Bou Arréridj.

Les feuilles et les racines ont été séchées à l'air libre, à l'ombre et broyer en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique.

2. Préparation des extraits

Les feuilles et les racines séchées de *L. delicatulum* ont été macérée avec du méthanol 100% ou l'eau distillé pendant 24 h à température ambiante (**Sanogo et al., 2006**). Les extraits résultants ont été filtrés à travers un filtre Whatman (papier filtre Whatman n ° 4). Les extraits méthanoliques (EME) et aqueux des feuilles et des racines sont concentrés sous vide dans un évaporateur rotatif (BUCHI, R215, Suisse), les résidus obtenus ont été maintenus à 4 ° C pour une analyse plus approfondie.

3. Rendement d'extraction

Le rendement en pourcentage (%), est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait et celle de la plante sèche en poudre. Il est calculé par la formule suivante (**Falleh et al.,2008**) :

$$\text{Rendement} = (\text{PB} / \text{PA}) \times 100$$

PB : poids d'extrait brut.

PA : poids de la plante sèche en poudre.

4. Screnning phytochimique

Un criblage phytochimique a été effectué selon des procédures standard basées sur la formation d'un précipité ou l'observation de changements de couleur dans le mélange initial ,afin de révéler les différents métabolites secondaires présents dans l'EME et aqueux de *L.delicatulum*, y compris les stéroïdes, les flavonoïdes, les coumarines, les saponines, les tanins, les anthraquinones alcaloïdes, les quinones et les triterpènes,.

4.1. Test des tanins

Les tanins ont été détectés en utilisant le test du chlorure ferrique. 2 mL de chaque extrait a été ajouté à 1 mL de solution de chlorure ferrique (FeCl₃, 1 %). L'apparition d'une couleur verdâtre ou bleuâtre après agitation, indiquait la présence de tanins (**Mouffouk et al., 2019**).

4.2. Test des triterpénoïdes

La présence de triterpénoïdes a été déterminée en mélangeant des volumes égaux (0.5ml) d'extrait, d'anhydride acétique (C₄H₆O₃) et d'acide sulfurique concentré (H₂SO₄). La formation d'un anneau bleu-vert après agitation a révélé la présence de triterpénoïdes (**Kumari et al., 2017**).

4.3. Test des saponines

Une décoction a été préparée à partir de deux parties de *L. delicatulum* (1 % p / v), après avoir ajouté 20 ml d'eau distillée, le mélange préparé a été agité dans un cylindre gradué pendant 15 minutes. L'apparition de mousse confirme la présence de saponines (Kumar et al., 2009).

4.4. Test des alcaloïdes

Un millilitre d'extrait testé a été mélangé avec trois gouttes de réactif Dragendorff. La présence d'alcaloïdes en solution est révélée par l'apparition d'un précipité rouge orangé (Fransworth, 1966).

4.5. Test des coumarines

Un volume de 2 ml d'extrait a été ajouté à 3 ml d'hydroxyde de sodium à 10 % (NaOH), l'observation de la couleur jaune indique la présence de coumarines (Rizk, A.M., 1982).

4.6. Test des quinones

Un millilitre de chaque extrait a été ajouté à 500 μ L d'hydroxyde de sodium (NaOH, 1 %). Après agitation, l'apparition d'une couleur rouge indique l'existence de quinones (Mouffouk et al., 2019).

4.7. Test des stéroïdes

Cinq cents microlitre d'anhydride acétique, 2 mL de chloroforme et 3 gouttes d'acide sulfurique concentré ont été ajoutés à 2 mL d'échantillons. Après agitation, l'observation d'une coloration bleue a confirmé l'existence de stéroïdes (Fransworth, 1966).

4.8. Test des flavonoïdes

Un volume de 500 μ L d'acide chlorhydrique concentré, 5 gouttes d'acide acétique, 500 μ L d'eau distillée et 5 gouttes d'acide isoamilique et un morceau de magnésium (Mg) ont été ajoutés à 500 μ L de l'extrait testé. Le mélange obtenu a été agité pendant 1 min. L'apparition immédiate d'une couleur rouge-violet ou rose orangé indiquait la présence de flavonoïdes (Mouffouk et al., 2019).

4.9. Test des anthraquinones

Dix millilitres de H_2SO_4 ont été bouillis avec 500 mg d'extrait et filtrés à chaud, puis 5 ml de chloroforme ont été agités avec le filtrat. Dans un autre tube à essai, la couche de chloroforme a été prélevée et 1 ml d'ammoniaque dilué a été ajouté. Le changement de la couleur indique la présence d'anthraquinone (Ayoola al., 2008).

5. Analyse colorimétrique des composés phénoliques

5.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits de *L. delicatulum* a été déterminée par la méthode de Al-Duais et al. (2009) utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Elle est basée sur la réduction de ce dernier (mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique

($H_3PMo_{12}O_{40}$) lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. Le mélange réactionnel est composé de 20 μ l de l'échantillon, 100 μ l de réactif Folin-Ciocalteu (1/10 dans l'eau) et 75 μ l de carbonate de sodium (7,5%). Les microplaques sont agités et conservés durant 30 min, dans l'obscurité à température ambiante, puis l'absorbance est mesurée à 765 nm contre un témoin négatif, en remplaçant l'échantillon par le méthanol ou l'eau distillée. Une courbe d'étalonnage à différente concentration d'acide gallique est réalisée. Les résultats sont exprimés en μ g équivalent acide gallique par mg d'extrait (μ g EAG/mg de l'extrait).

5.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes est basé sur la formation d'un complexe jaune entre les ions chlorure et les flavonoïdes. La méthode de **Topçu et al. (2007)**, modifiée et adapté pour une utilisation dans les microplaques de 96 puits, est utilisée pour la détermination du taux des flavonoïdes. Une aliquote de 50 μ l de chaque extrait est mélangée avec 10 μ l de nitrate d'aluminium ($Al(NO_3)_3$, 10 %), 10 μ l d'acétate de potassium (1 M) et 130 μ l de méthanol. Après 10 min d'incubation la lecture est faite à 430 nm contre un blanc échantillon contenant 50 μ l d'échantillon et 150 μ l ml de méthanol. Une courbe d'étalonnage est réalisée avec la quercétine et les résultats sont exprimés en μ g d'équivalent quercétine par mg d'extrait (μ g EQ/mg d'extrait).

5.3. Dosage des tanins condensés

La teneur en tanins condensés est estimée en utilisant la méthode décrite par **Saci et al. (2019)**. Un volume de 25 μ l de chaque extrait est ajouté à 150 μ l de la solution vanilline/méthanol (4 %, m/v), ensuite 75 μ l de l'acide chlorhydrique (30 %) est additionné. L'absorbance est mesurée à 500 nm contre un blanc après une incubation de 15 min à température ambiante. Une courbe d'étalonnage est réalisée avec la catéchine et les résultats sont exprimés en μ g ECAT/mg d'extrait.

6. Evaluation de l'activité antioxydante

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* de nos extrais a été réalisée par huites différentes méthodes à savoir : le pouvoir réducteur, le piégeage du radical libre DPPH, le piégeage du radical ABTS⁺, le piégeage du radical Galvinoxyl, le test de blanchiment de β -carotène, le test de phénantroline, le test de la réduction des nanoparticules de l'argent, et la réduction de l'ion Cu^{2+} par la méthode CUPRAC.

6.1. Activité anti-radicalaire du radical DPPH

L'activité anti-radicalaire du radical DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) est déterminée selon la méthode de **Gali et Bedjou (2019)**. Elle est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH (figure 10) dont la solution possède une coloration violette et une absorption caractéristique à 517 nm. Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène. Ceci provoque la perte de la coloration violette en coloration jaune.

Brièvement, la solution de DPPH est préparée à 1 mM dans le méthanol, puis 160 µl de cette solution est ajoutée à 40 µl de chaque extrait à différentes concentrations. La réaction entre les extraits et le radical DPPH est effectuée sur microplaque de 96 puits ensuite les mélanges sont incubés à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 minutes, contre un contrôle contenant la solution de DPPH et le méthanol. Les résultats sont exprimés en termes d'absorbances à 517 nm. Le BHA, le BHT, le Trolox et l'acide ascorbique sont utilisés comme standards. Les résultats sont exprimés en termes de pourcentages déterminés par la formule suivante :

$$\%I = (A_c - A_e) / A_c * 100 \quad (1)$$

%I = pourcentage d'inhibition

A_e : Absorbance en présence de l'échantillon (extrait ou BHA)

A_c : Absorbance du contrôle en absence de l'échantillon

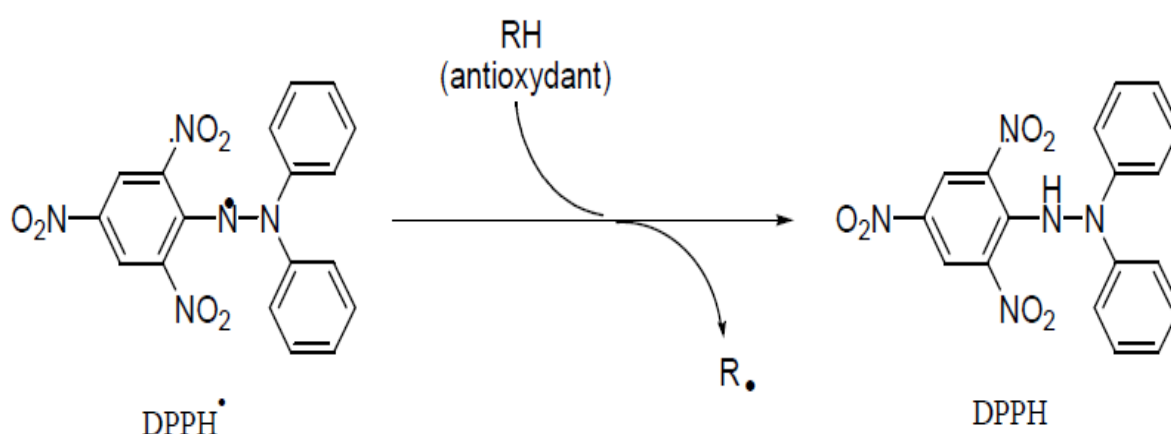


Figure 10 : Réaction entre le DPPH• et le composé antioxydant pour former le DPPH (Serigne et al., 2015).

6.2. Activité anti-radicalaire de l'ABTS^{•+}

La méthode de Re et al. (1999) est utilisée pour la mesure de la capacité des extraits méthanolique et aqueux, des feuilles et des racines à inhiber le radical ABTS, par le suivi au spectromètre à 734 nm. En présence d'un antioxydant, le passage du radical ABTS^{•+} à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de la coloration vert bleu intense (figure 11).

Le cation ABTS^{•+} est généré en mélangeant 5 ml de persulfate de potassium (K₂S₂O₈) à 4,9 mM avec 5 ml d'une solution aqueuse d'ABTS (14 mM). Le mélange est ensuite stocké à température ambiante durant 16 h à l'abri de la lumière. La solution est diluée avec de l'éthanol jusqu'à une absorbance de 0,7±0,02 à 734 nm.

Brièvement, 40 µl de chaque extrait ainsi que les standards (BHA, BHT, Trolox, Acide Ascorbique), à différentes concentrations, sont ajoutés à 160 µl de la solution d'ABTS^{•+} diluée dans une microplaque à 96 puits. La lecture est effectuée après 10 min d'incubation. Les pourcentages d'inhibitions sont calculés en appliquant la formule (1) précédente où A_c représente l'absorbance de la solution ABTS^{•+} en absence de l'échantillon.

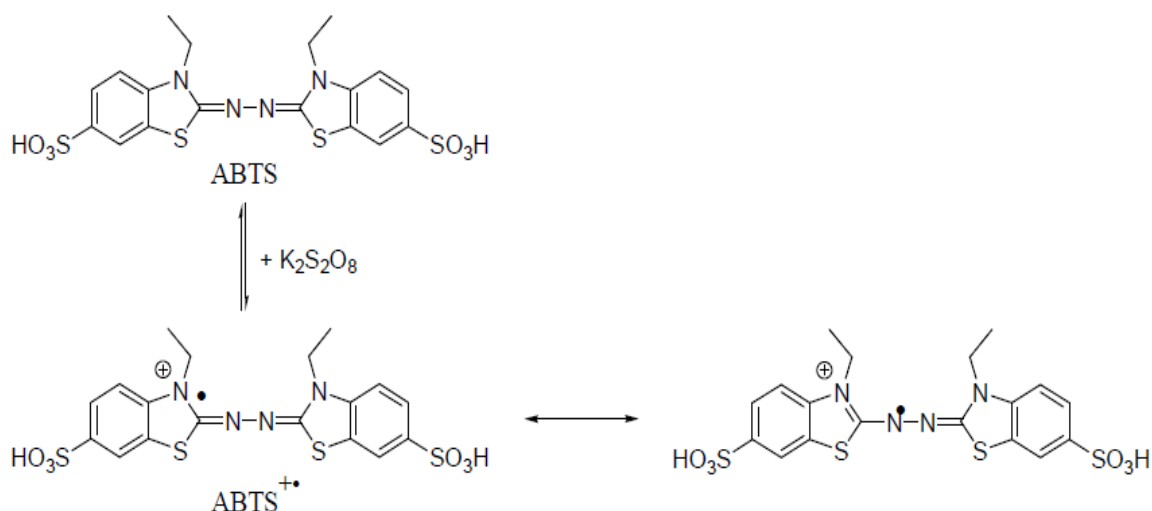


Figure 11 : Formation du radical cation ABTS^{+•} à partir de l'ABTS (Serigne *et al.*, 2015).

6.3. Activité anti-radicalaire du radical Galvinoxyl (GOR)

Le galvinoxyl est un radical libre stable, il est utilisé pour mesurer l'effet anti-radicalaire des différentes molécules. Ce test est basé sur la capacité des composés antioxydants à réduire le radical galvinoxyl (GOR) de couleur initialement jaune qui se traduit par la disparition de cette couleur, dont l'intensité est mesurée à 428nm (Imai *et al.*, 2019).

L'activité de piégeage contre le radical galvinoxyle a été évaluée selon la méthode décrite par Shi *et al.* (2001). Brièvement, 40 μ l de chaque échantillon, à différentes concentrations sont mélangés avec 160 μ l de la solution galvinoxyle (0,1 mM dans le méthanol). Après incubation pendant 120 min dans l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 428 nm. Le BHA, le BHT, l'acide ascorbique et le Trolox ont été utilisés comme standards. Les pourcentages d'inhibition ont été déterminés selon la formule précédente (1).

6.4. Test de Phénanthroline

Cette méthode est basée sur la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} par un antioxydant. Le Fe^{2+} ainsi formé réagit avec le 1,10-phénanthroline pour former le complexe de ferroïne de couleur rouge orange (Yefrida *et al.*, 2018). La concentration de ce complexe est déterminée à 510 nm, la couleur intense signifie un puissant effet réducteur.

La réduction des ions fer a également été testée par le dosage de la phénanthroline selon la méthode de Szydłowska-Czerniak *et al.* (2008). Dix microlitres de l'échantillon ont été mélangés avec 30 μ L de O-phénanthroline (0,5% dans le méthanol), 110 μ L de méthanol et 50 μ L de $FeCl_3$ (0,2%). L'absorbance a été mesurée à 510 nm après incubation pendant 20 minutes à 30 °C. Le BHA, le BHT, l'acide ascorbique et le Trolox ont été utilisés comme standards. Les valeurs $A_{0,5}$ ont été calculées à partir des courbes de régression.

6.5. Test de la réduction des nanoparticules d'argent (Ag⁺)

La méthode est basée sur la réduction des ions Ag⁺ qui se trouve en suspension (nanoparticules). Cette réduction entraîne l'augmentation de la taille des particules et qui est observée par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 423nm.

La réduction des ions d'argent (Ag⁺) a été évaluée par la méthode proposée par **Özyürek et al. (2012)**. Cinquante microlitres d'eau distillée et 130 µl de solution SNP (AgNO₃ 1 mM, solution de citrate à 1 %) ont été ajoutés à 20 µl des extraits étudiés ou des standards dans une microplaque à 96 puits. Le mélange est incubé à 25 ° C pendant 30 min. L'absorbance a été mesurée à 423 nm. Le Trolox et l'acide ascorbique ont été utilisés comme standards et A_{0,5} a été déterminé à partir des courbes de régression.

6.6. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est évalué par la méthode d'**Oyaizu (1986)** avec certaines modifications. La méthode est basée sur la réduction de l'ion Fe³⁺ (fer ferrique) du ferricyanure de potassium (Fe³⁺(CN)₆) en fer ferreux (Fe²⁺(CN)₆). Le produit, ainsi formé, est visualisé par l'addition des ions Fe³⁺ provenant du FeCl₃ qui conduit à la formation du complexe Fe³⁺₄[Fe²⁺(CN)₆]₃ de couleur bleu dont l'intensité est mesurée à 700 nm (**Hsu et al., 2006**).

Le protocole consiste à mélanger 20 µl d'extrait, 40 µl de tampon phosphate (0,2 M, pH 6.6), et 40 µl de ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ (1%). Le mélange est ensuite incubé à 50°C pendant 20 min. Après cela, 40 µl d'acide trichloracétique (TCA) (10 %), 20 µl de chlorure de fer (FeCl₃) (0.1 %), et 40 µl d'eau distillée, sont ajoutés et la lecture est effectuée dans un lecteur de microplaque (Perkin Elmer, Enspire) à 700 nm. Le BHA, BHT, Trolox et l'acide ascorbique sont utilisés comme standards. Les résultats sont représentés sous forme d'absorbances en fonction de la concentration.

6.7. Capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

Les ions Cu²⁺ du complexe bis (neocuproïne)-cuivre(II) (Nc(Cu)₂²⁺), résultant de la réaction entre le chlorure de cuivre (CuCl₂) et le néocuproïne (2,9-diméthyl-1,10-phenanthroline) (Nc), sont réduits par un agent antioxydant. L'absorbance du complexe, ainsi formé (Nc-Cu(I)), est suivie par spectrophotométrie à 450 nm (**Apak et al., 2007**).

Le protocole consiste à faire réagir 40 µl de chaque extrait, à différentes concentrations, avec 50 µl de CuCl₂ (0,01 M), 50µl de néocuproïne (7,5.10⁻³ M dans l'éthanol) et 60 µl d'acétate d'ammonium (1 M) sur une microplaque de 96 puits. La lecture est faite à 450 nm après une heure d'incubation à température ambiante. Le BHA, BHT, Trolox et l'acide ascorbique sont utilisés comme standards. Les résultats sont exprimés en termes d'absorbances à 450 nm.

6.8. Test de blanchiment du β -carotène

L'évaluation de la capacité des extraits méthanoliques à inhiber la peroxydation lipidique a été déterminée par la méthode décrite par **Sabudak et al. (2013)**. L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes suite à l'abstraction des atomes d'hydrogène à partir de groupements méthylènes. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène (disparition de la couleur rouge). Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchiment du β -carotène (**Deba, 2008**).

L'émulsion β -carotène-acide linoléique est préparée par la solubilisation de 0,5 mg de β -carotène dans 1 ml de chloroforme puis 200 μ l de tween 40 et 25 μ l d'acide linoléique sont ajoutés. Le chloroforme est complètement éliminé dans un rotavapeur, et le résidu est repris dans 100 ml d'eau oxygénée, l'émulsion en résultant est agitée vigoureusement.

Dans une microplaque de 96 puits 40 μ l de chaque extrait à différentes concentrations sont additionnés de 160 μ l de l'émulsion β -carotène-acide linoléique. L'absorbance est mesurée immédiatement (T_0) à 470 nm, puis la plaque est incubée à 45 °C dans une étuve et la lecture est faite chaque 30 min pendant 120 min. La même procédure est effectuée avec le BHA et le BHT comme contrôle positif et le contrôle négatif qui consiste en 40 μ l de méthanol/eau distillé à la place de l'échantillon. Les pourcentages d'inhibition sont calculés selon la formule suivante :

$$AA (\%) = [1 - ((A_{(t=0)} - A_{(t=120)}) / (A_{0(t=0)} - A_{0(t=120)}))] * 100 \text{ où}$$

$A_{(t=0)}$: est l'absorbance en présence de l'échantillon à $T=0$

$A_{(t=120)}$: est l'absorbance en présence de l'échantillon à $T=120$ mn

$A_{0(t=0)}$: est l'absorbance du blanc à $T=0$

$A_{0(t=120)}$: est l'absorbance du blanc à $T=120$ mn.

7. Activité inhibitrice de la tyrosinase

L'effet inhibiteur des extraits de *L. delicatulum* sur l'activité de la tyrosinase a été évalué par la méthode décrite par **Deveci et al. (2018)**. Des aliquotes de 10 μ l d'extraits de feuilles et de racines à différentes concentrations sont déposées dans une microplaque à 96 puits, ensuite 150 μ l de tampon phosphate de sodium (100 mM, pH 6,8) et 20 μ l de solution enzymatique de tyrosinase (150 unités / ml) sont ajoutés. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, 20 μ l de L-DOPA (5 mM) sont ajoutés au mélange réactionnel. La microplaque a été laissée pendant 10 minutes supplémentaires à 37 °C et l'absorbance est mesurée à 475 nm en utilisant un lecteur de microplaques multimode (Perkin Elmer, EnSpire, Singapour). L'acide kojique est utilisé comme standard. L'activité anti-tyrosinase a été exprimée en taux d'inhibition calculés en utilisant la formule précédente (1).

8. Activité anti-inflammatoire

8.1. Inhibition de la dénaturation de BSA

L'activité anti-inflammatoire a été déterminée *in vitro* par la dénaturation de la BSA par la chaleur selon la méthode décrite par **Kandikattu et al. (2013)**. Un volume de 1 ml de chaque extrait (feuilles et racines) est mélangé avec 1 ml de solution d'albumine de sérum bovin (0,2 %) préparée dans le tampon Tris-HCl (50 mM, pH 6,6). Les tubes sont ensuite chauffés à 37 °C pendant 15 min puis à 72 °C pendant 5 min. L'absorbance est mesurée à 660 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-visible après refroidissement à température ambiante. L'expérience a été réalisée en triplicata. Le Diclofénac de sodium (VOLTARENE®) est utilisé comme standard. L'effet protecteur des échantillons contre la dénaturation de la BSA a été présenté sous forme de pourcentages d'inhibition calculés suivant la formule précédente (1).

9. Activité antibactérienne

9.1. Souches bactériennes et préparation de la suspension bactérienne

Les souches bactériennes testées correspondent à trois souches Gram négatif : *Salmonella enterica serovar Typhi* (ATCC 14028TM), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853TM), *Escherichia coli* (ATCC25922TM) et trois Gram positif : *Listeria monocytogenes* (ATCC13932TM), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923TM), *Bacillus subtilis* (ATCC6633TM). A partir d'une culture bactérienne jeune (18h), une suspension de chaque bactérie est préparée dans 5 ml de l'eau physiologique stérile (0.9 %) puis l'absorbance est ajustée à une valeur de 0.1 correspondant à une charge de 10⁸ UFC/ml, à la longueur d'onde $\lambda = 625$ nm.

9.2. Test de sensibilité sur milieu gélosé

L'activité antimicrobienne a été étudiée selon la méthode de diffusion en milieu solide (**Devillers et al., 1989**). La gélose Muller Hinton est coulée dans des boîtes de Petri, après solidification la suspension bactérienne estensemencée en utilisant des écouvillons. A l'aide d'une pipette Pasteur stérilisée des puits de 6 mm de diamètre ont été réalisés dans la gélose. Quarante microlitres de chaque échantillon, à différentes concentrations (200, 100, 50,25, et 12,5 mg/ml), sont transférés dans les puits. Pour permettre la diffusion des extraits, les boîtes sont conservées à 4°C pendant 3h. Après incubation à 37 °C/24 h, les zones d'inhibition ont été mesurées. Le test est réalisé en duplicata. Un disque d'un antibiotique (gentamicine) est utilisé comme standard.

9.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice est déterminée comme étant la concentration minimale de l'extrait qui inhibe la croissance de 90% de la population bactérienne. La méthode de microdilution en milieu liquide est utilisée pour la détermination de la CMI, en utilisant des plaques

à 96 puits (Chebaibi et al., 2011) . Les échantillons sont solubilisés dans du DMSO. Le bouillon Muller Hinton (MHB) est utilisé comme diluant puis des dilutions de moitié sont réalisées. Le tétrazolium (MTT : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5 diphényltétrazolium bromide) est utilisé comme indicateur de viabilité. Cinquante microlitre de chaque dilution de l'échantillon testé est transférés dans les puits de la microplaque contenant 50 µl de MHB, puis 50µl de la suspension bactérienne sont transférés. La charge bactérienne, dans le volume final, est de 5.10^6 UFC. La microplaque est ensuite incubée à 37 °C pendant 24 h.

À la fin de la période d'incubation, vingt microlitres de la solution MTT(0.4 g/L) sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est ensuite réincubée pendant 10 à 30 minutes à 37 °C.

La croissance bactérienne est révélée par la présence d'une couleur bleu violet tandis que la persistance de la couleur jaune initiale signifie le contraire. Un contrôle ne contenant pas l'échantillon testé est réalisé.

10. Evaluation de la cytotoxicité sur les larves d'Artémia salina (BrineShrimp test)

C'est un test simple et facile à réaliser pour mettre en évidence la toxicité générale des extraits d'origine végétale. Cette méthode fournit des données de dépistage préliminaires qui peuvent être soutenu par des bioessais plus spécifiques une fois les composés ont été isolés (Pisutthanan et al., 2004).

10.1. Eclosion des œufs d'Artémie

La mise au point des différents paramètres a été effectuée afin de créer un biotope d'Artémia salina *in vitro*. Cette étude préliminaire a pour objectif de déterminer et de créer les conditions indispensables et adéquates à l'éclosion des œufs d'Artémia salina et la mise en culture des nauplius. La mise au point s'est portée essentiellement sur la détermination de la température et l'éclairage.

Les œufs (JBL Artemio Mix, Germany) ont été mis sous éclairage dans un litre d'eau de mer puis incubés dans un incubateur (Panasonic) à 28 °C pendant 48 h. Une aération continue a été assurée par une pompe (Champion, Atman®). Les larves (nauplius) ont été collectées et utilisés après 48 h d'incubation.

10.2. Test de cytotoxicité

La méthode de Meyer et al. (1982) a été utilisée pour évaluer la toxicité des extraits contre les larves d'*Artemia salina*. Les EMe des feuilles et des racines de *L.delicatulum* ont été dissouts dans l'eau de mer puis une série de dilutions a été préparée. Cent microlitre du milieu d'éclosion contenant 10 larves ont été déposés dans chaque puit de la microplaque. Ensuite 80 µl d'eau de

mer et 20 µl d'extrait à chaque concentration ont été additionnés. La microplaque est incubée à 28 °C pendant 24 h sous éclairage. Un contrôle négatif a été réalisé en remplaçant l'extrait par l'eau de mer.

Après incubation, les larves vivantes ont été dénombrées. Le bichromate de potassium est utilisé comme standard. La formule d'Abbott's est utilisée pour corriger les pourcentages de mortalité (McGaw et Eloff, 2005) dans le cas où la mort des larves s'est produite dans le contrôle:

$$TM (\%) = m - M/S * 100.$$

TM : Taux de mortalité en pourcentage.

m : Pourcentage de mortalité en présence de l'échantillon.

M : Pourcentage de mortalité dans le contrôle.

S : Pourcentage des survivants dans le contrôle.

11. Analyse statistique

La comparaison des résultats des dosages et des activités biologiques, entre les différents échantillons, a été effectuée par l'analyse de la variance (ANOVA) utilisant le logiciel GraphPad prisme version 5. One way ANOVA suivi du test Tukey à comparaison multiple est utilisé pour toutes les comparaisons. L'intervalle de confiance est fixé à 95%, les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs à $p \leq 0,05$.

Chapitre 3 :
Résultats et discussion

1. Tests phytochimiques

Le criblage phytochimique qui a pour but la mise en évidence de la présence de certains types de métabolites secondaires, a été effectué en utilisant la méthode standard basée sur des réactions qualitatives de coloration et de précipitation. Le tableau XII indique les différents groupes chimiques recherchés .

Tableau XII : Screening phytochimique des extraits méthanoliques et aqueux de *L.delicatulum*.

Composés phytochimiques	EMe. des feuilles	EMe. des racines	EAq. des feuilles	EAq. des racines
Tanins	+	+	+	+
Triterpènes	+	+	+	+
Saponins	+	+	+	+
Anthraquinones	-	+	-	-
Quinones libres	-	-	-	-
Alcaloïdes	+	+	-	-
Flavonoïdes	+	+	+	+
Stéroïdes	+	-	+	-
Coumarines	+	-	+	-

Absence du composé ; + : présence du composé

L'analyse phytochimique des extraits aqueux et méthanoliques préparé à partir des feuilles et des racines de la plante *L. delicatulum* a révélé la présence de plusieurs classes de métabolites secondaires à savoir les tanins, les triterpènes, les saponins, les flavonoïdes. Les alcaloïdes sont présents uniquement dans les extraits méthanoliques de la plante . De plus les coumarines et les stéroïdes sont trouvés dans l'extrait méthanolique et aqueux des feuilles par contre ils sont absents dans les extraits des racines. Par ailleurs les anthraquinones ont été présentes dans l'EMe des racines et absentes dans le reste des extraits. Seuls le test de recherche des quinones libres a été révélé négatif dans tous les extraits testés.

Ces résultats indiquent la richesse de ces extraits en composés chimiques actifs connus par leurs diverses activités biologiques, et la capacité potentielle de traiter plusieurs maladies telles que le cancer, les pathologies oxydatives et neurodégénératives (**Curini et al., 2006 ; Guil-Guerrero et al., 2006**).

Très peu de recherches ont été documentées sur l'espèce *L. delicatulum* de ce fait, la présente étude est une contribution sur la connaissance pharmaco-chimique de cette plante. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) a conduit à l'identification de l'acide chlorogénique, l'acide gallique, la rutine, l'acide 2-p-hydroxybenzoïque, l'acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxybenzoïque et l'acide p-coumarique comme les composés principaux dans l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *L.delicatulum* (**Medini et al., 2014**). En outre, une étude très récente effectuée par **Ruiz-Riaguas et al. (2020)** ont identifié un nombre de flavonoïdes et d'acides

phénoliques avec la dominance des glycosides du flavonoïde Myricetin. La présence de ces composés peuvent être responsables du multiple activités biologiques observées.

2. Rendement d'extraction, teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes, et tanins.

Les rendements des extractions des phyto-constituants obtenus après épuisement de l'eau et le méthanol, ont permis d'établir l'histogramme présenté dans la figure 12A. Les effets séparés de la nature du solvant et du type d'organe, sur le rendement d'extraction ont été analysés grâce à l'ANOVA.

D'après les résultats obtenus, les extraits aqueux des feuilles et des racines ont donné les rendements les plus élevés avec des valeurs de $30,45 \pm 1,19$ et $26,85 \pm 0,55\%$, respectivement, tandis que le rendement le plus faible a été enregistré dans l'extrait méthanolique des racines ($20,6 \pm 0,1\%$) (figure 12A). La différence entre les taux d'extraction obtenus avec le méthanol et ceux obtenus avec l'eau est significative ($p < 0,05$). Le solvant influence donc fortement le taux d'extraction. Ainsi que la différence entre les taux d'extraction obtenus avec les feuilles et ceux obtenus avec les racines est significative ($p < 0,05$). Le taux d'extraction dépend donc du type d'organe considéré. Les feuilles de *L.delicatulum* montrent les rendements les plus élevés quel que soit le solvant.

De même, les teneurs en composés phénoliques dépendent fortement de l'organe végétal. Les racines ont donné les valeurs les plus élevées en polyphénols totaux ($772,52$ et $240,86 \mu\text{g EAG} / \text{mg}$ obtenus à partir de l'extrait méthanolique et aqueux, respectivement) par rapport aux feuilles qui présentaient les valeurs les plus faibles, et sont estimées à $582,13$ et $180,76 \mu\text{g EAG} / \text{mg}$ dans l'extrait méthanolique et aqueux, respectivement (figure 12B). En revanche, l'extrait méthanolique et aqueux des feuilles étaient plus riches en flavonoïdes ($212,77 \pm 1,19$ et $69,06 \pm 0,21 \mu\text{g QE} / \text{mg}$, respectivement) que les extraits de racines ($115,69 \pm 0,14$ et $32,67 \pm 0,09 \mu\text{g} / \text{mg}$, respectivement) (figure 12C). Néanmoins, les extraits méthanoliques et aqueux des racines possèdent les valeurs les plus élevées en tanins condensés ($678,87 \pm 0,11$ et $276,75 \pm 0,28 \mu\text{g EC} / \text{mg}$ d'extrait, respectivement) par rapport aux feuilles ($338,42 \pm 0,21$, $70,98 \pm 0,05 \mu\text{g}$ d'extrait EC/mg, respectivement) (figure 12D).

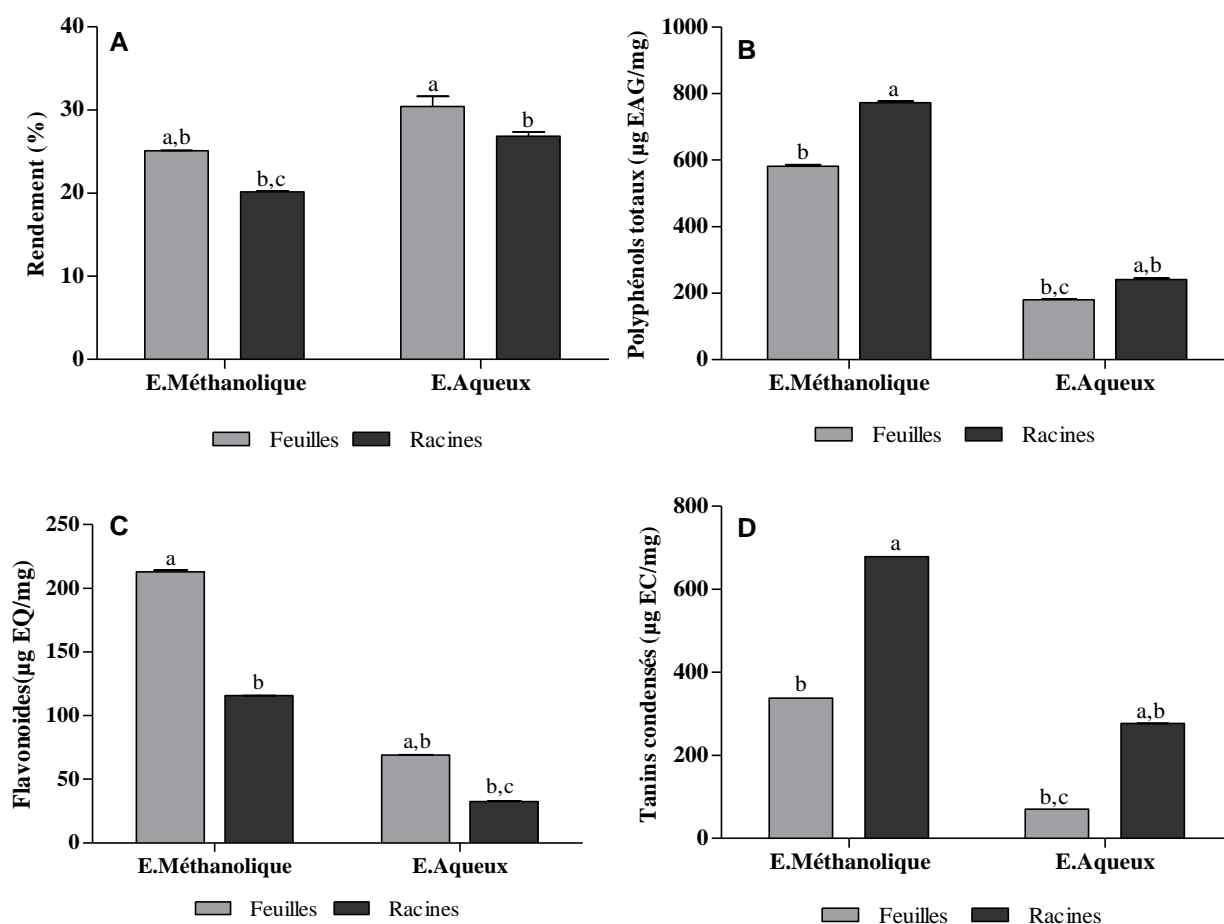


Figure 12 : Rendement d'extraction (A), polyphénols totaux (B), flavonoïdes (C) et tanins condensés (D) des extraits de *L. delicatulum*. Les résultats sont en moyenne \pm SD (n = 3). Les données avec des lettres différentes étaient significativement différentes (test de Tukey, $p < 0,05$).

Les teneurs les plus élevées en polyphénols et en tanins condensés ont été trouvées dans les racines, où elles fournissent probablement une protection contre l'invasion par des agents pathogènes des plantes (Ashok et Upadhyaya, 2012). Donc les polyphénols ne sont pas distribués uniformément dans les parties des plantes (Kukic et al. 2008). L'utilisation du méthanol s'est avérée meilleure pour l'extraction des composés phénoliques que l'eau, ce qui est cohérent avec l'étude réalisée par Medini et al. (2014), qui ont rapporté que le solvant influençait l'extraction des composés phénoliques de la partie aérienne de *L. delicatulum*. En effet, plusieurs facteurs peuvent influencer le rendement et la teneur en composés phénoliques comme le type et la concentration de solvant, la méthode d'extraction, la partie de la plante, la température, etc. (Karoune et al., 2015; Ćujić et al., 2016; Gali et al., 2020).

La teneur en polyphénols des différents extraits de *L. delicatulum* est très peu rapportée dans la littérature. Des teneurs en polyphénols totaux entre 46.5 ± 1.81 mg EAG/g et 12.3 ± 0.52 mg EAG/g ont été obtenues respectivement avec l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux de la partie

aérienne de la plante. Tandis que le dosage des flavonoïdes et des tanins a donné, des valeurs de 5.55 ± 2.95 et 2.15 ± 0.16 mg EC/g d'extrait pour l'extrait méthanolique et de 48.38 ± 0.75 et 8.14 ± 0.44 mg EC/g d'extrait pour l'extrait aqueux, respectivement (**Medini et al., 2014**). Récemment, **Ruiz-Riaguas et al. (2020)** ont rapporté des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes de l'extrait méthanolique et aqueux des feuilles de 151.1 ± 1 mg EAG/g, 31.1 ± 0.04 mg EAG/g, et 42.1 ± 0.8 et 5.80 ± 0.09 mg Equivalent de Rutine (ER)/g d'extrait, respectivement. La variabilité des teneurs en polyphénols chez cette espèce végétale obtenue par notre étude et celle de la littérature est du probablement à la différence de la méthode d'extraction, à la composition phénoliques des extraits (**Hayouni et al., 2007**), aux facteurs génotypiques (**El-Waziry, 2007**), aux conditions biotiques (espèce, organe et l'étape physiologique) et abiotiques (conditions environnementales, nature de sol, facteurs climatiques) (**Ksouri et al., 2008 ; Atmani et al., 2009**).

3. Activités antioxydantes

Les effets antioxydants des produits naturels pourraient être considérés comme un premier aperçu de la détection de leur potentiel et la pertinence ethnopharmacologique. Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers. Ils impliquent la neutralisation des radicaux libres, permettant ainsi d'interrompre la chaîne de soustraction des électrons et prévenir les dommages en attaquant d'autres molécules biologiques (**Li et al., 2008, Bellik et al., 2013**). De ce fait pour une large compréhension du mécanisme d'action des antioxydants présents dans les extraits de *L. delicatulum*, et vue la variété des composés qu'ils peuvent contenir plusieurs méthodes ont été développées. Les résultats ont été représentés par des valeurs IC_{50} et $A_{0.5}$. À partir des résultats obtenus, on peut voir que les extraits méthanoliques de feuilles et de racines possèdent une capacité antioxydante supérieure à celle des extraits aqueux. De plus, les extraits méthanoliques présentent une forte activité antioxydante très proche de celle des standards testés.

3.1. Activité anti-radicalaire du DPPH

Le radical libre DPPH est caractérisé par son adaptation à plusieurs échantillons dans une courte durée, aussi il est assez sensible pour détecter les ingrédients actifs à des basses concentration (**Katalinic et al., 2006**). Les pourcentages d'inhibition obtenus dans ce test sont représentés sous forme de courbes (figure 13).

L'EMe des racines montrent une inhibition très forte du radical libre utilisé (DPPH), suivi par l'EMe des feuilles avec des valeurs d' IC_{50} de $5,79 \pm 0,05$ et $10,58 \pm 0,18$ $\mu\text{g} / \text{ml}$, respectivement. De plus, ces extraits méthanoliques ont présenté une activité antioxydante plus élevée que le BHT (IC_{50} de $16,02 \pm 0,35$ $\mu\text{g} / \text{ml}$).

Les extraits aqueux ont également exercé une bonne activité antiradicalaire mais inférieure à celle des extraits méthanoliques. Les valeurs d'IC₅₀ obtenues pour les extraits aqueux de racines et de feuilles étaient de $69,34 \pm 0,95$ et $79,65 \pm 0,23$ $\mu\text{g} / \text{ml}$, respectivement.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Medini et al., (2014)**, dont l'EMe de la partie aérienne de *L.delicatulum* montre un effet inhibiteur de DPPH élevée par rapport à l'EAq avec des valeurs d'IC₅₀ de 5.25 ± 0.62 et 29 ± 5.73 $\mu\text{g} / \text{ml}$, respectivement, ainsi ils ont donné un effet inhibiteur plus puissant que le BHT (IC₅₀ de 11.5 ± 0.2 $\mu\text{g} / \text{ml}$), ce qui est en accord avec nos résultats. Dans une autre étude réalisée par **Ruiz-riaquas et ses collaborateurs (2020)**, ont montré que l'EMe et aqueux des feuilles de cette plante ont une activité anti radicalaire importante (470 ± 10 , 56 ± 1 mg ET /g, respectivement).

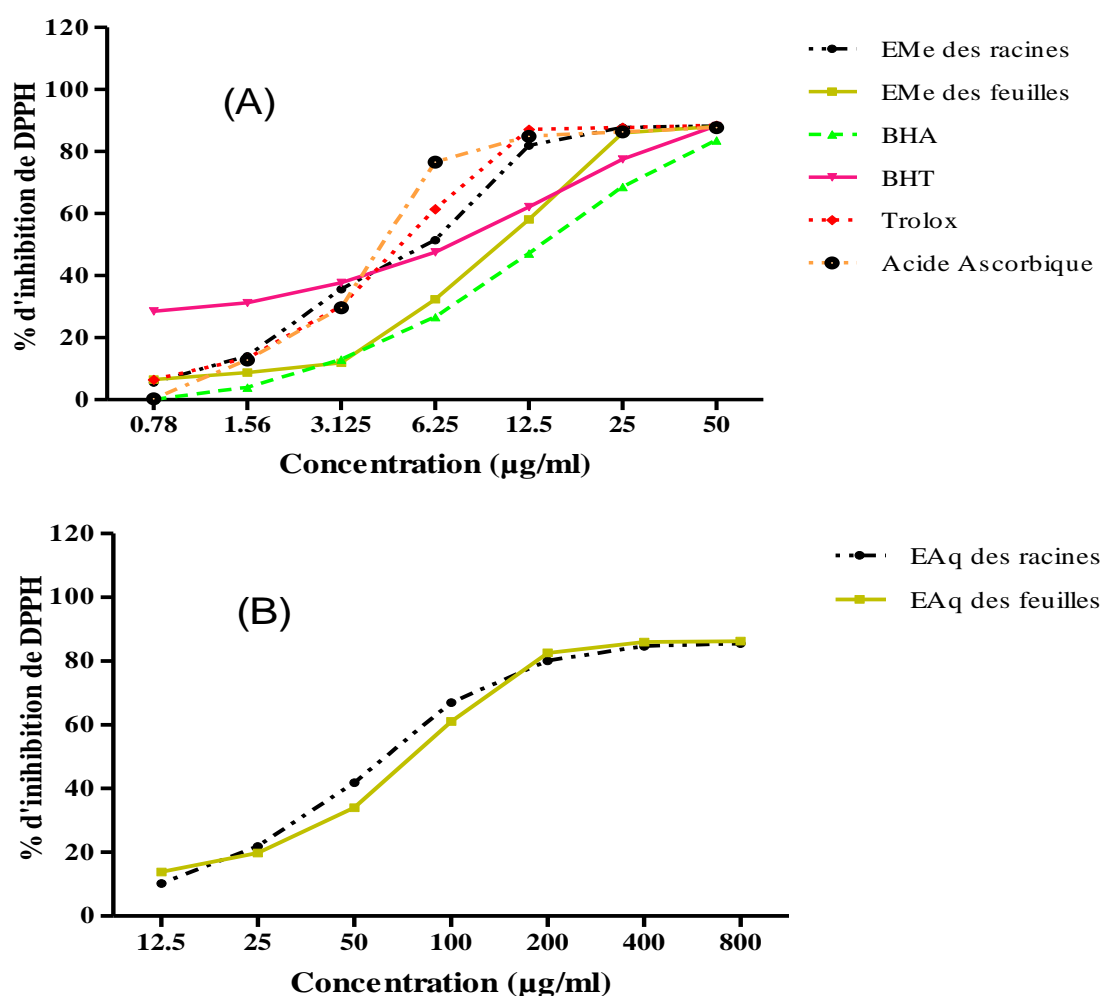


Figure 13 :Activité anti-radicalaire du DPPH des extraits de *L.delicatulum* et standards (BHT, BHA, Trolox, Acide Ascorbique). Extraits méthanoliques (A), et extrait aqueux (B). Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD.

3.2. Activité anti-radicalaire de l'ABTS^{•+}

Le radical libre ABTS pour sa simplicité et sa rapidité est souvent utilisé pour l'étude de l'activité anti-radicalaire des extraits ou des composés isolés. En contact avec un donneur d'hydrogène conduit à la forme réduite de l'ABTS et à la décoloration de la solution à 734 nm.

Le profil d'activité anti-radicalaire de chaque extrait testé vis-à-vis du radical ABTS^{•+} est présenté dans la figure 14. Ces courbes révèlent que le pouvoir anti-radicalaire est proportionnel à la concentration des extraits. A partir de ces données, la concentration efficace IC₅₀ a été déterminée. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XIV . On rappelle que l'IC₅₀ représente la quantité de réactifs nécessaire à l'inhibition de la moitié de la quantité initiale de radicaux libres présents.

La capacité antioxydante la plus élevée qui correspond à la valeur d'IC₅₀ la plus faible a été enregistrée avec l'EMe des feuilles suivi par l'EMe des racines et qui ont montré un effet de piégeage étroit du radical ABTS (6.56 ± 0.25 et 7.29 ± 0.04 µg / ml, respectivement). Il est à noter que ces valeurs sont meilleures que celle du standard utilisé : Le BHT (7.54 ± 0.69 µg / ml). Les taux les plus faibles sont enregistrés avec les extraits aqueux dont les valeurs d'IC₅₀ sont estimées à 26.01 ± 0.93 µg / ml pour l'extrait des feuilles et 29.16 ± 0.16 µg / ml pour l'extrait des racines.

De même, **Ruiz-riaquas** et son équipe (2020) ont montré que l'EMe et aqueux des feuilles de *L. delicatulum* possèdent une bonne activité de piégeage du radical ABTS^{•+} avec des valeurs de 360 ± 10 et 53 ± 8 mg ET/g, respectivement . Toutefois, il est important de signaler que l'utilisation de différents protocoles d'activités , réduit la fiabilité d'une comparaison entre deux études.

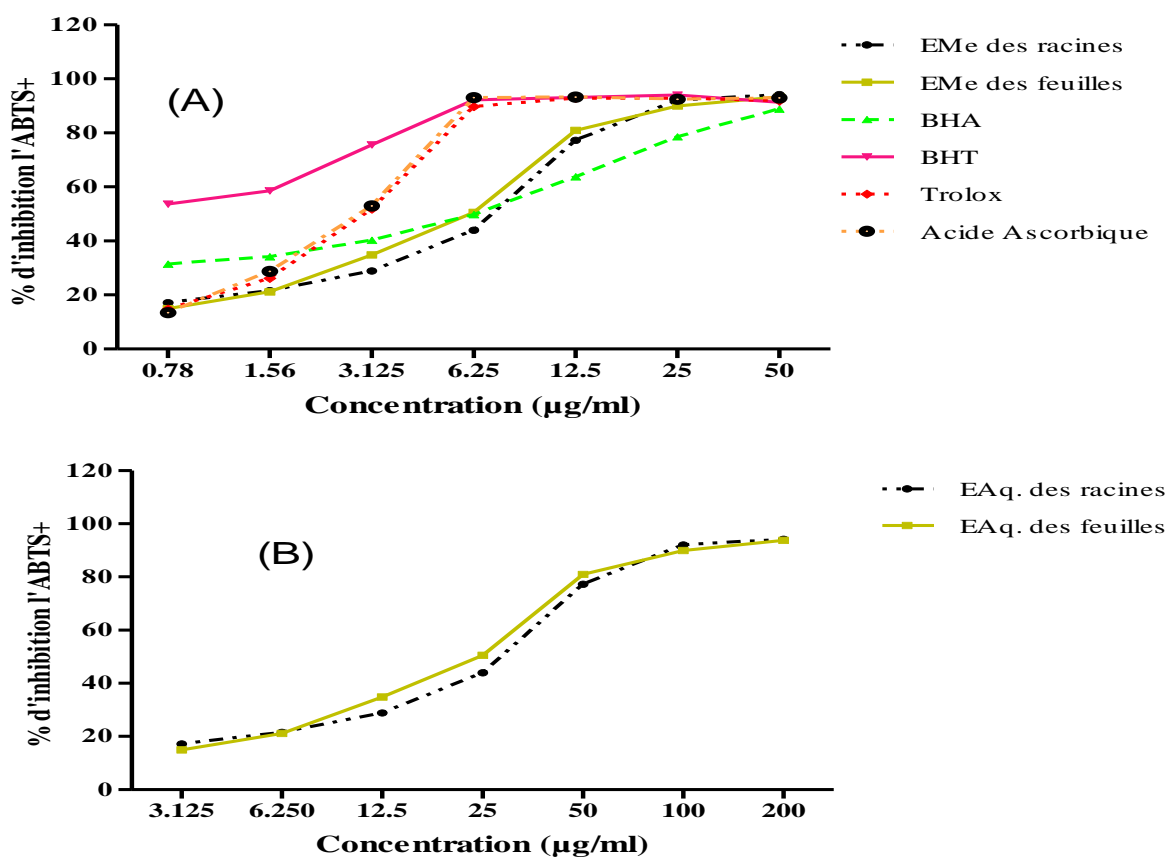


Figure 14 : Effet piègeur du radical ABTS^{•+} des extraits de *L. delicatulum*, et les standards (BHT, BHA, Trolox, Acide Ascorbique). Extraits méthanoliques (A) et extrait aqueux (B). Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD.

3.3. Activité anti-radicalaire du radical Galvinoxyl (GOR)

Le radical galvinoxyl (GOR) est utilisé pour déterminer l'activité anti-oxydante d'un composé en mesurant la capacité des molécules à tester de réagir en tant que donneur d'atome d'hydrogène ou d'électron.

Les résultats obtenus montrent que les extraits de *L. delicatulum* possèdent la capacité à réduire le radical galvinoxyl d'une manière dose-dépendante (figure 15).

L'EMe des racines a présenté une activité antioxydante légèrement supérieure à celle de l'EMe des feuilles (IC_{50} : $10,31 \pm 0,82$ et $11,09 \pm 0,16$ µg / ml, respectivement). D'autre part les extraits aqueux se sont avérés moins efficaces pour piéger le radical galvinoxyle : avec des IC_{50} de l'ordre de $50,17 \pm 2,09$ et $84,07 \pm 0,44$ µg/ml. Cette activité est significativement inférieure ($P < 0,05$) à celles des standards utilisés (tableau XIII).

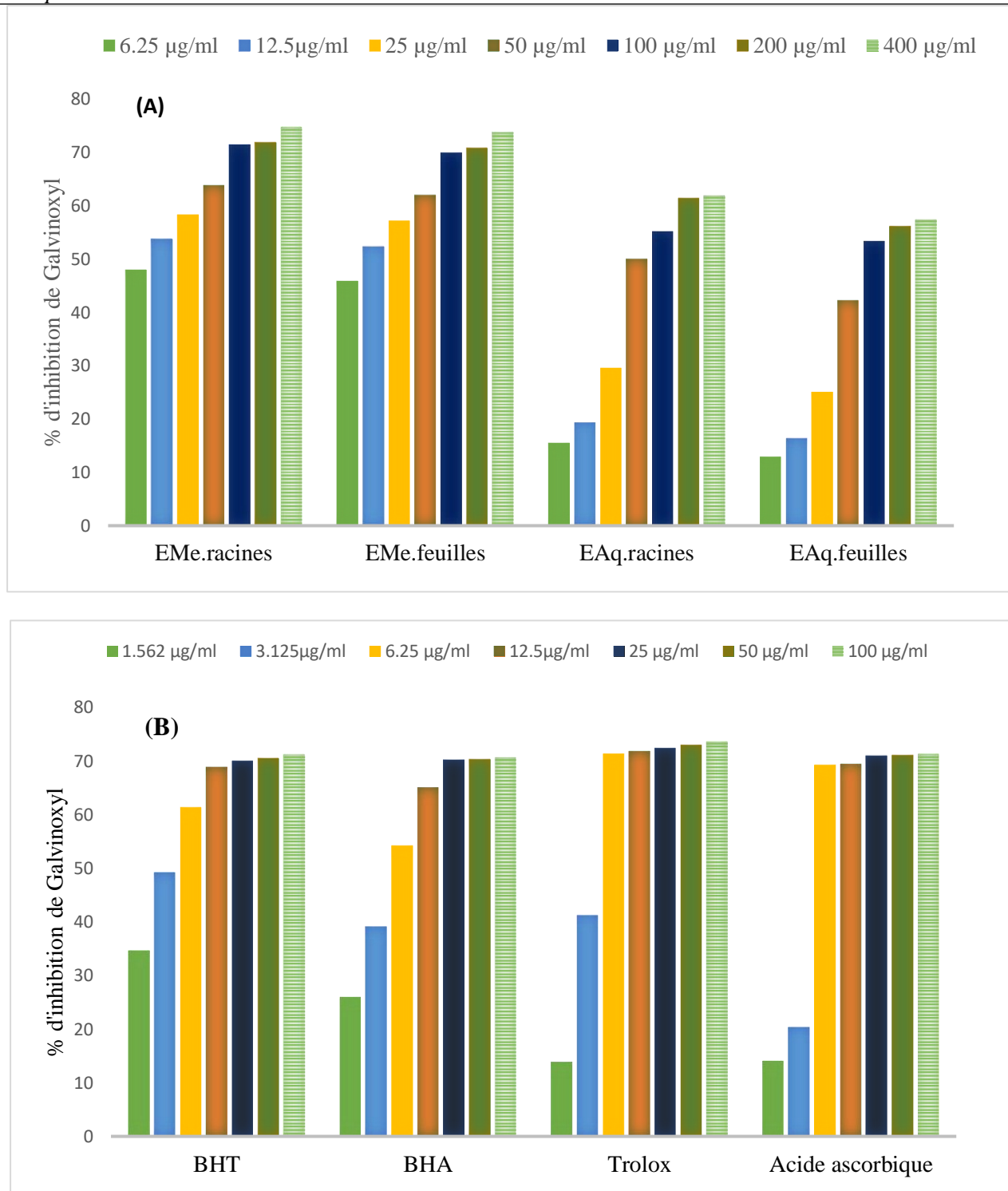


Figure 15 : Activité anti-radicalaire de Galvinoxyl des extraits de *L. delicatulum* (A) et standards (B).

Tableau XIII : Valeurs IC₅₀ (µg/ml) des extraits obtenues dans le Test de Galvinoxyl

Extrait/standards	Galvinoxyl
EMe des feuilles	11.09± 0.16 ^b
EMe des racines	10.31 ±0.82 ^b
EAq des feuilles	84.07±0.44 ^d
EAq des racines	50.17±2.09 ^c
BHA	3.32 ± 0.18 ^a
BHT	5.38± 0.06 ^a
Acide ascorbique	5.02± 0.01 ^a
Trolox	4.31 ± 0.05 ^a

Les comparaisons sont faites entre les A_{0,5} des extraits et les standards du même test

Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes à ($p < 0,05$).

3.4. Test de Phénanthroline

Le test de Phénanthroline est un test utilisé pour évaluer la capacité réductrice de *L.delicatulum*, basé sur la transformation des ions ferriques (Fe³⁺) en ions ferreux (Fe²⁺), les résultats obtenus pour les différentes extraits et standards sont présentés dans la figure 16.

Dans cette méthode, l'analyse de la réduction du fer métallique évaluée par la phénanthroline a montré que les racines étaient plus efficaces que les feuilles, que ce soit pour les extraits méthanoliques ou aqueux. La valeur la plus basse de A_{0,5} a été obtenue avec l'EMe des racines (3,55 ± 0,02 µg / ml), suivi par l'EMe des feuilles (7,34 ± 0,27 µg / ml), puis l'EAq des racines (11,82 ± 0,75 µg / ml) et l'EAq de feuilles (22,6 ± 1,36 µg / ml). De plus, la capacité exercée par l'EMe des racines ne présentait pas de différence significative avec celle obtenue avec le BHA et le Trolox (A_{0,5}: 2,24 ± 0,17 et 3,11 ± 0,09 µg / ml, respectivement), et elle est significativement supérieure à celle enregistrée avec l'acide ascorbique (A_{0,5}: 5,25 ± 0,20 µg / ml) (tableau XVI).

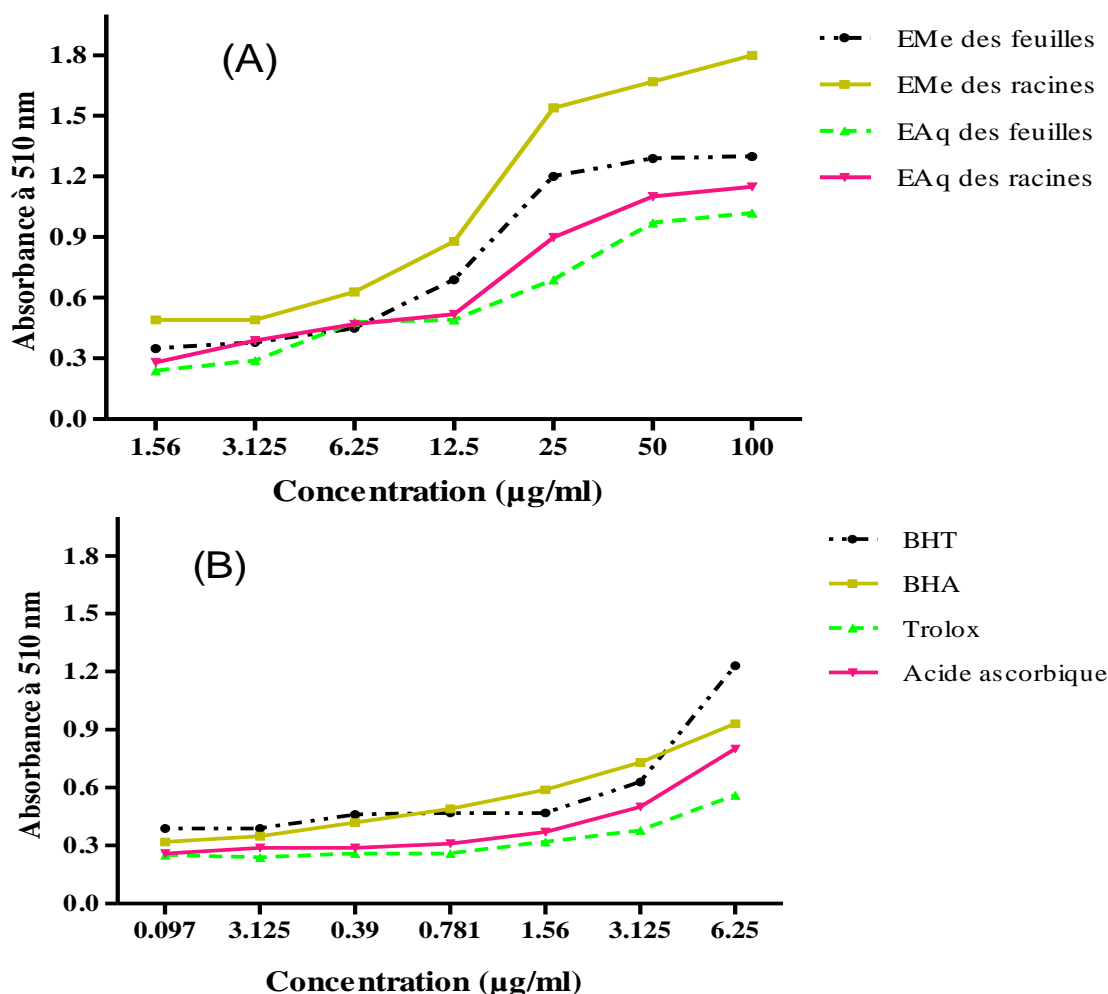


Figure 16 : Activité réductrice de Phénantroline des extrait de *L. delicatulum* (A) et standards (B).

3.5. Test de la réduction des nanoparticules d'argent (Ag⁺)

Une méthode quantitative spectrophotométrique sensible a été proposé dans cette recherche basé sur la réduction des ions Ag⁺ par les polyphénols aux nanoparticules d'argent sphériques (SNP) de surface très intense avec une bande d'absorption à 423 nm.

D'après les résultats obtenues, l'EMe des feuilles a montré un meilleur potentiel de réduction des ions d'argent (Ag⁺) que les racines avec une A_{0,5} de 9,45±0,9 et 21.66±0.08 µg/ml, respectivement, à différentes concentrations (6.25-400 µg/ml). De plus, la capacité antioxydante exercée par les extraits méthanoliques de *L. delicatulum* été significativement supérieure à celle obtenue avec le Trolox (A_{0,5}: 34,17 ± 1,23 µg/ml). Néanmoins, l'EAq des feuilles a présenté un effet plus élevé que l'EAq des racines avec des valeurs A_{0,5} de 46,60 ± 0,46 et 96,24 ± 2,02 µg/ml, respectivement) à des concentrations comprises entre 12.5-800 µg/ml (tableau XVII). Cette activité est dose dépendante (figure 17).

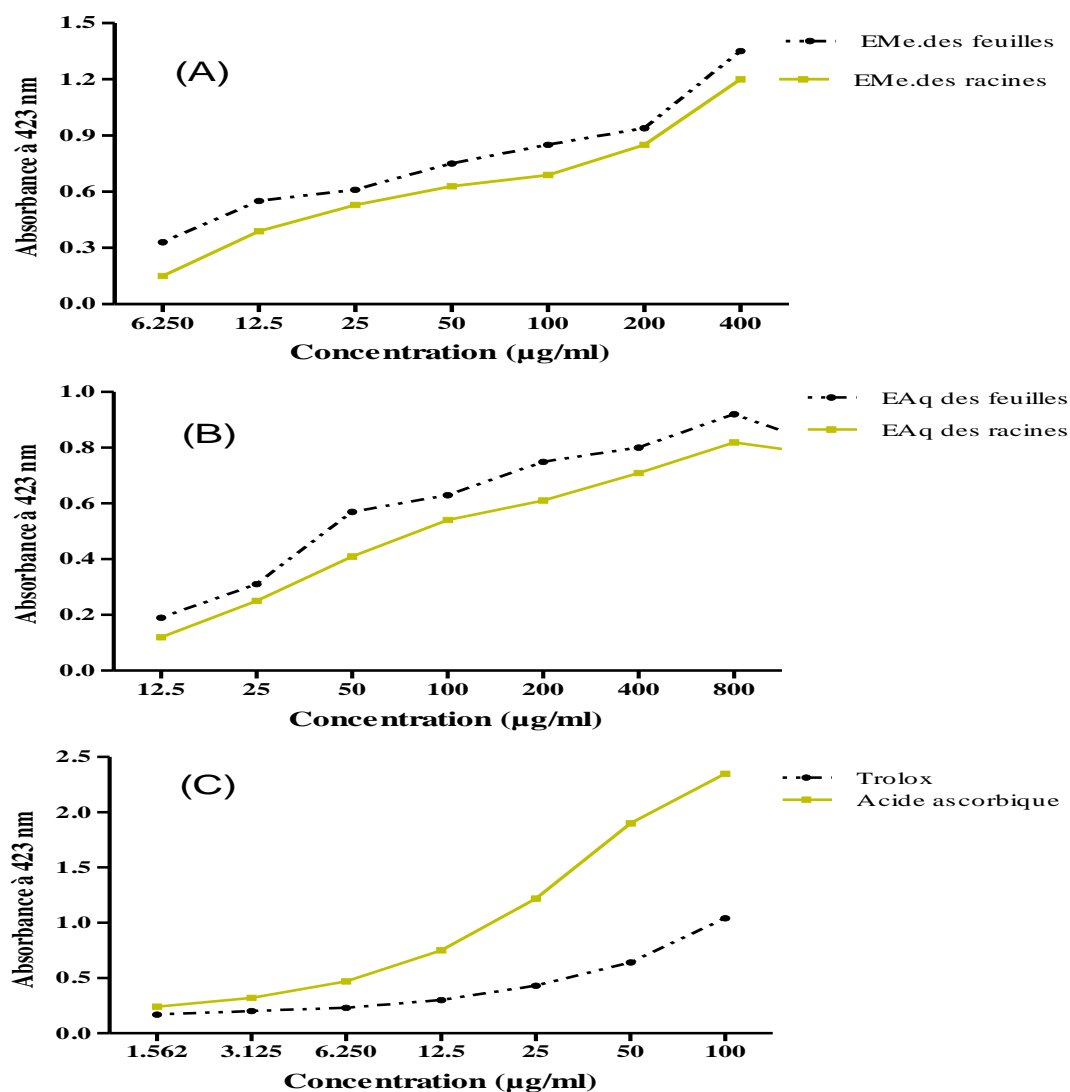


Figure 17 : Activité réductrice de nanoparticule d'argent des extraits de *L. delicatulum*. Extrait méthanolique (A), Extrait aqueux (B) et standards ; Trolox et Acide Ascorbique (C).

3.6. Pouvoir réducteur

La réduction est un mécanisme exercé par les antioxydants pour régénérer d'autres antioxydants oxydés. Le pouvoir réducteur est l'une des méthodes employées pour évaluer la capacité réductrice de *L. delicatulum*. Elle repose sur la capacité d'un extrait ou d'un composé à réduire les ions ferriques (Fe^{3+}) en ions ferreux (Fe^{2+}) (Le et al., 2007; Rahim et al., 2008). Les propriétés de réduction sont généralement associées avec la présence de réductones, qui ont la capacité de donner un électron aux radicaux libres et les convertir en formes plus stables (Amrania et al., 2019).

Les résultats de la capacité réductrice sont exprimés en $A_{0.5}$ qui signifie la concentration qui donne une absorbance de 0.5 est présentée dans le tableau XVIII. L'EMe de feuilles exerce un pouvoir réducteur plus élevé que l'EMe des racines via la capacité à donner des électrons avec une $A_{0.5}$ de l'ordre de $11,2 \pm 0,06 \mu\text{g} / \text{ml}$ et $20,51 \pm 0,3 \mu\text{g} / \text{ml}$, respectivement, à différentes

concentrations (6.25–400 µg/ml). De plus, la capacité exercée par l'EMe des feuilles ne présentait pas de différence significative avec celle obtenue avec le BHA et le BHT ($A_{0.5}$: 9.29 ± 0.22 et 8.41 ± 1.46 µg / ml, respectivement). Néanmoins, l'EAq des racines a présenté un effet plus élevé que l'EAq des feuilles avec des valeurs $A_{0.5}$ de $46,54 \pm 0,4$ et $95,57 \pm 2,02$ µg / ml, respectivement à des concentrations comprises entre 12.5-800 µg/ml. Cet effet est dose dépendant (figure 18).

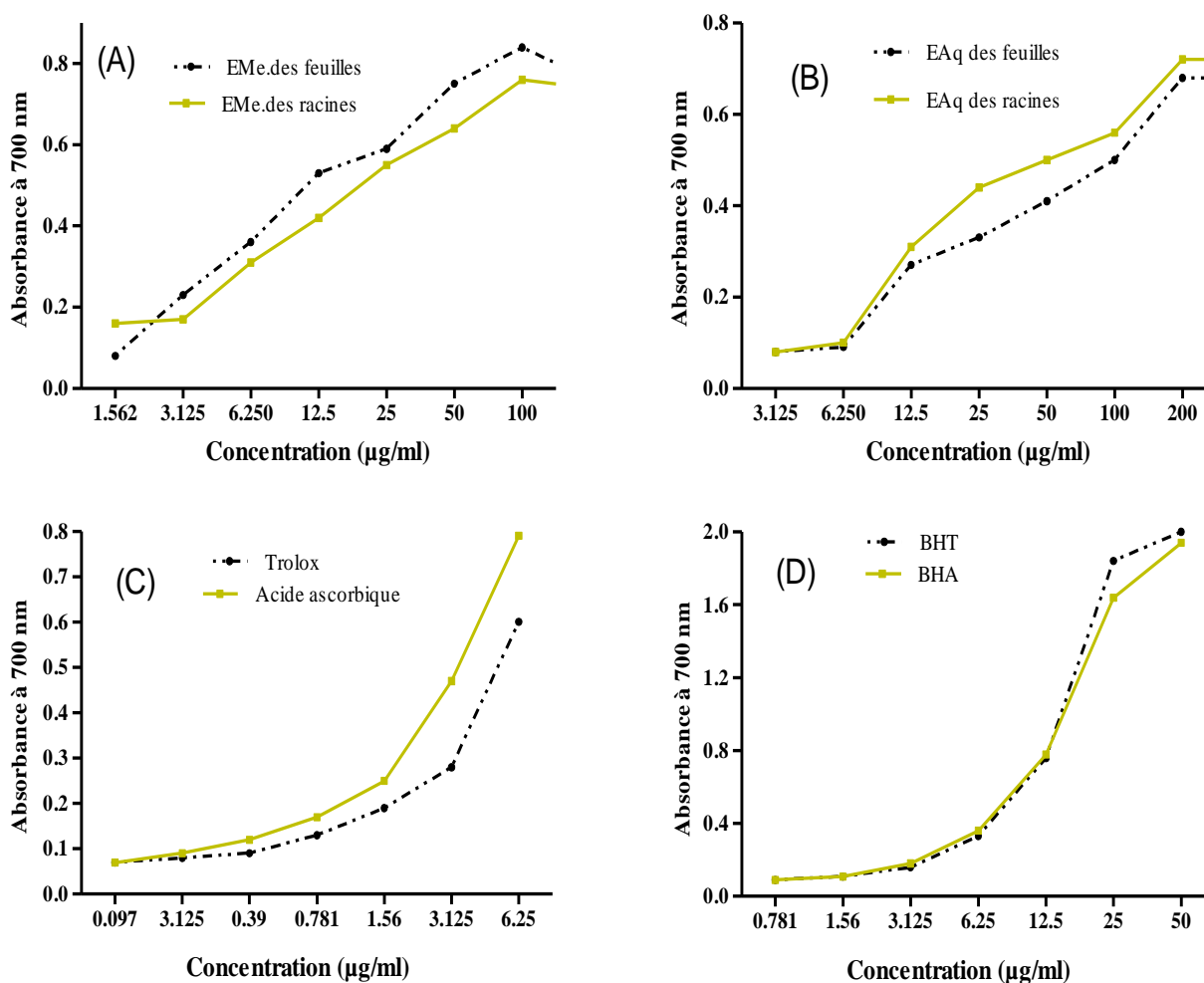


Figure 18: Capacité à réduire le fer (pouvoir réducteur). EMe de *L.delicatulum* (A).Extraits aqueux (B),les standards ;Trolox et acide ascorbique (C),BHT et BHA (D).

3.7. Capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

Une autre méthode de réduction utilisée pour évaluer la capacité réductrice des différents extraits de notre plante est la méthode de CUPRAC, par le suivi de la réduction des ion Cu^{2+} par des antioxydants. La valeur $A_{0.5}$ a été déterminée à partir du graphique d'absorbance en fonction de la concentration des extraits/standard (figure 19).

Les résultats obtenus indiquent une activité réductrice élevée des ion Cu^{2+} de l'EMe des racines ($A_{0,5}$ de $6,81 \pm 0,07 \mu\text{g} / \text{ml}$). Cette activité est plus fort que celle de l'acide ascorbique et le Trolox ($A_{0,5}$: $8,69 \pm 0,14$ et $8,31 \pm 0,15 \mu\text{g} / \text{ml}$, respectivement). Ainsi, l'EMe des feuilles a donné un effet intéressant pour réduire les ions cuivre avec une $A_{0,5}$ de l'ordre de $13,5 \pm 0,55 \mu\text{g} / \text{ml}$, par contre les extraits aqueux ont présenté le pouvoir réducteur le plus faible (tableau XIX).

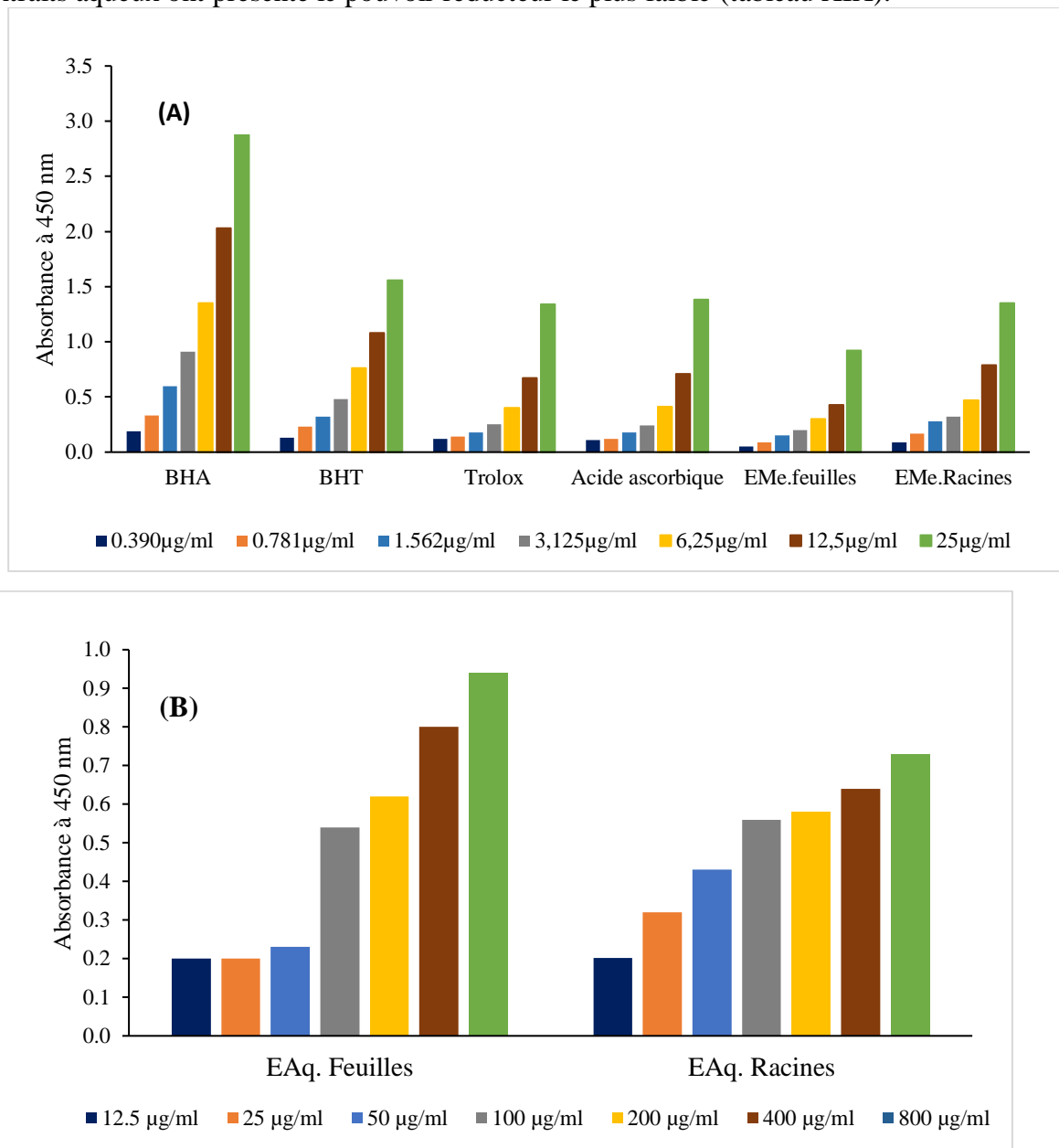


Figure 19 : Capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC).Extraits méthanoliques et standards (A).Extraits aqueux (B). Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD.

3.8. Inhibition de l'oxydation du β -carotène

Le test de blanchiment du β -carotène est utilisé pour simuler l'oxydation des lipides membranaires ce qui permet de mesurer l'activité antioxydante des différents échantillons. Les radicaux libres attaquent les acides gras de ces lipides qui pourrait entraîner de sévères altérations

structurales tout en déclenchant une chaîne de soustraction d'électrons et par conséquent la perte de leur fonction (Martínez-Cayuela, 1995).

Dans ce test, le peroxyde d'hydrogène oxyde l'acide linoléique générant des radicaux libres qui à leur tour attaqueront le β -carotène qui s'oxyde et perd sa couleur. Les antioxydants, présents dans les extraits protègent le β -carotène en faisant réagir avec les produits d'oxydation de l'acide linoléique. Les pourcentages d'inhibition sont représentés dans le tableau XIV.

L'analyse de la capacité antioxydante évaluée avec le test de blanchiment au β -carotène a révélé une très faible activité pour l'EMe des racines aux concentrations testées ($IC_{50} = 720 \pm 3,13 \mu\text{g} / \text{ml}$). Seule une légère activité a été affichée par l'EMe des feuilles avec une valeur IC_{50} de $98,6 \pm 0,32 \mu\text{g} / \text{ml}$, et un effet faible obtenu avec l'EAq de ses racines avec une IC_{50} de $293,17 \pm 0,14 \mu\text{g} / \text{ml}$. Ces résultats peuvent être attribués à la quantité très faibles des composés lipophiles due à l'utilisation des extraits aqueux et méthanoliques qui n'ont pas pu extraire une bonne quantité des composés lipophiles avec une capacité anti-oxydante contre le blanchiment du β -carotène.

L'inhibition est en fonction de la concentration et le temps, comme présentée dans la figure 20. D'après les résultats obtenus, on constate que l'absorbance à 470 nm diminue au cours du temps, avec des vitesses différentes selon le type d'extrait étudié et la concentration. Le blanchiment est plus rapide avec les extraits aqueux des feuilles et des racines de *L. delicatulum*. Par contre la dégradation du β -carotène est plus lente avec l'extrait méthanolique des feuilles.

Tableau XIV: Pourcentages d'inhibition du blanchiment du β -carotène par les extraits de *L. delicatulum*.

Extraits	% d'inhibition							
	12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	400 $\mu\text{g}/\text{ml}$	800 $\mu\text{g}/\text{ml}$	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
EMe.Feuilles	13.63 \pm 0.09	25.9 \pm 0.03	43.51 \pm 0.1	52.32 \pm 0,2	58,15 \pm 1,19	60.42 \pm 0.12	79.32 \pm 0.32	98.6 \pm 0.32 ^b
EMe. Racines	5.25 \pm 0.91	16,05 \pm 0.7	19,09 \pm 0,5	22,17 \pm 0,1	39,50 \pm 1,24	48,66 \pm 0,88	59,22 \pm 1.23	720 \pm 3,13 ^d
EAq. Feuilles	1.9 \pm 0,04	4,4 \pm 0,17	9,14 \pm 0,27	15,24 \pm 0,5	35,32 \pm 0,23	51,18 \pm 1,02	55,19 \pm 0.78	293.17 \pm 0.14 ^c
EAq. Racines	-	-	-	1.3 \pm 0,06	6,40 \pm 0.91	15,84 \pm 0,82	36,15 \pm 1,5	>800
	1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$	3,12 $\mu\text{g}/\text{ml}$	6,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
BHT*	48,34 \pm 0,19	51,96 \pm 2,7	59,19 \pm 0,2	69,61 \pm 0,9	72.50 \pm 0,48	81,14 \pm 0.84	86,09 \pm 1,04	1,24 \pm 0,01 ^a
BHA**	49.18 \pm 0.35	52.03 \pm 0.1	60.23 \pm 0.9	74.24 \pm 0.2	84.23 \pm 1.14	90.11 \pm 0.68	94.59 \pm 0.77	1.26 \pm 0,03 ^a

*BHT : Butylhydroxytoluène, **BHA : Butylhydroxyanisol, - : Absence d'inhibition

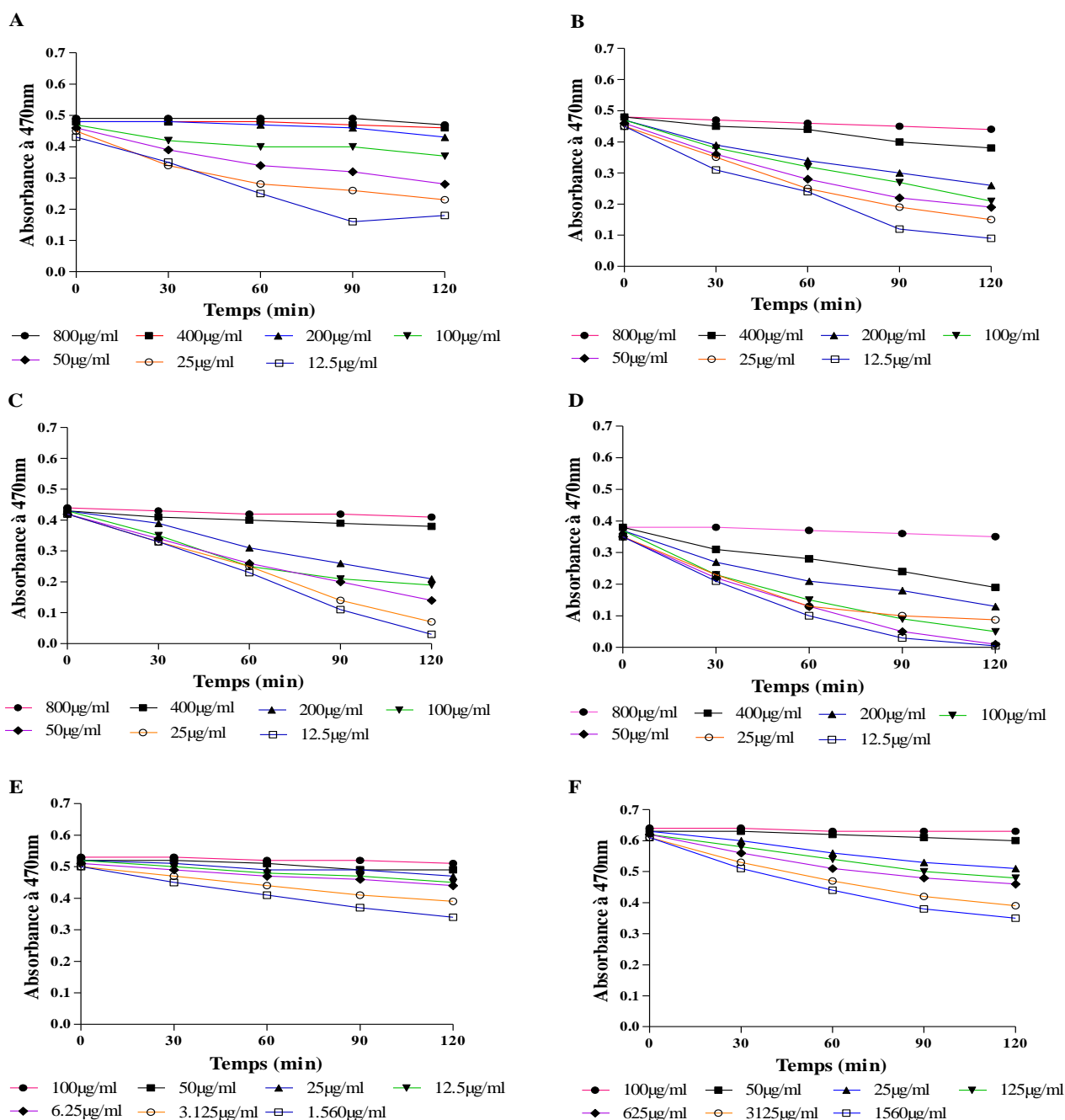


Figure 20 : Cinétique de blanchiment du β -carotène. EMe.Feuilles (A), EMe.Racines (B), EAq.Feuilles (C), EAq.Racines (D), BHT (E), et BHA (F).

Globalement, l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *L. delicatulum* à l'aide de différents tests, notamment DPPH, ABTS, galvinoxyl, pouvoir réducteur, CUPRAC, blanchiment au β -carotène, phénanthroline et nanoparticules d'argent a montré des effets antioxydants intéressants. Les extraits de *L. delicatulum* sont révélés être des agents hautement piègeurs des radicaux libres DPPH, ABTS et galvinoxyle. Ainsi, ces extraits ont exercé des propriétés réductrices remarquables pour la réduction des ions fer, cuivre et argent, qui leur permettent d'agir comme réducteurs par transfert d'électrons (Özyürek et al., 2012). Cependant, les extraits ont

montré un faible effet protecteur contre le blanchiment du β -carotène. En général, l'EMe des racines a montré une activité antioxydante la plus élevée pour des différents tests. Plusieurs études antérieures ont rapporté une relation étroite entre le contenu phénolique total et l'activité antioxydante d'extraits de plantes (**Dasgupta et De, 2004; Hossain et Rahman, 2011; Gali et Bedjou, 2019**). En effet, l'utilisation de plusieurs tests antioxydants complémentaires serait plus informatif et même nécessaire pour évaluer l'activité antioxydante d'extraits bruts caractérisés par la diversité des composés, qui peuvent agir selon un mécanisme d'action spécifique (**Zengin et al., 2018**). Néanmoins, chaque composé présent dans l'extrait peut agir indépendamment ou en synergie avec d'autres composés (**Rice-Evans et al., 1997, Wei et al., 2015**).

4. Corrélation entre les teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante

Le coefficient de corrélation de Pearson a été calculé pour démontrer l'existence d'une relation entre l'activité antioxydante et les teneurs en composés phénoliques des différents extraits. Les différentes valeurs du coefficient de Pearson sont présentées dans le tableau XV. Une corrélation significative a été obtenue entre les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins et l'activité antioxydants, mesurée par différentes méthodes. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études annoncées dans la littérature que le potentiel d'activité antioxydante d'un extrait dépend de sa teneur en composés phénoliques (**Deighton et al., 2000, Guettaf et al., 2016**). Il est évident que la forte activité antioxydante enregistrée dans nos extraits est attribuée essentiellement à leur richesse en polyphénols totaux et en tanins que les flavonoïdes en raison de la forte corrélation enregistrée entre eux. La moindre corrélation entre les flavonoïdes et l'activité antioxydante pourrait être expliquée que la plupart des flavonoïdes sont dans leur glycoside forme, qui sont moins efficaces que leurs formes aglycones (**Shahidi, 1997**).

Des coefficients de corrélation faibles ont été enregistrés avec la méthode de blanchiment du β -carotène montrant la haute spécificité de ce test pour des composés plus lipophiles dans l'activité antioxydante (**Kanatt et al., 2007**). En outre, la variation du coefficient de corrélation entre la teneur en composés phénoliques et les différentes activités antioxydantes indique qu'un seul test n'est pas suffisant pour évaluer l'effet antioxydant (**Frankel et Meyer, 2000; Silva et al., 2006**).

Tableau XV : Coefficients de corrélation entre l'activité antioxydants et les teneurs en composés phénoliques.

	DPPH	ABTS	GOR	CUPRAC	Pouvoir réducteur	Phénanthroline	SNP	Blanchiment du β -carotène
Polyphénols totaux	0.962	0.996	0.844	0.974	0.965	0.952	0.918	0.701
Flavonoïdes	0.561	0.694	0.522	0.543	0.521	0.511	0.686	0.652
Tanins	0.948	0.893	0.858	0.952	0.989	0.957	0.999	0.495

SNP : réduction des nanoparticules d'argent

5. Activité antityrosinase

Les extraits de feuilles et de racines de *L. delicatulum* ont été analysés pour l'activité inhibitrice de la tyrosinase. Les résultats ont montré que seuls les extraits méthanoliques exerçaient un effet antityrosinase dose-dépendant (tableau XVI), tandis que les extraits aqueux étaient inactifs pour toutes les concentrations utilisées. L'EMe des racines a fortement inhibé l'enzyme avec une valeur d'IC₅₀ de $9,87 \pm 0,15 \mu\text{g} / \text{ml}$ et été plus puissant que l'EMe des feuilles, qui a montré une valeur d'IC₅₀ de $25,23 \pm 0,21 \mu\text{g} / \text{ml}$. Il faut noter que l'extrait des racines de *L. delicatulum* été plus puissant que le standard (l'acide kojique) qui a exercé une activité proche de celle de l'extrait des feuilles (IC₅₀ = $24,77 \pm 0,5 \mu\text{g} / \text{ml}$).

Les racines de *L. delicatulum* ont montré un fort effet inhibiteur par rapport aux feuilles, qui peut être attribué à leur forte teneur en composés phénoliques et en tanins condensés. Ces derniers se caractérisent par leur effet astringent en raison de leur capacité à se lier fortement aux protéines et autres macromolécules. La liaison des tanins condensés aux enzymes peut impliquer l'inhibition de leur fonction (Ashok et Upadhyaya, 2012). En effet, les tanins condensés auraient un effet inhibiteur important sur la tyrosinase (Chen et al., 2014; Chai et al., 2018). Il a été démontré que d'autres molécules d'origine végétale comme les aldéhydes ou sont issues du métabolisme fongique, y compris l'acide kojique et l'acide azélaïque, inhibent potentiellement la tyrosinase (Kim et Uyama, 2005).

Selon la littérature, l'activité anti-tyrosinase de *L. delicatulum* est peu étudiée. Une seule étude récente rapporte l'inhibition de la tyrosinase par l'EMe et aqueux des feuilles de cette plante, dont les valeurs d'IC₅₀ sont estimées par 155.87 ± 0.01 et 18.87 ± 0.01 mg Equivalent Acide Kojique (EAK)/g, respectivement), il sont relativement différents par rapport à notre résultats d'où on a eu une absence totale de l'activité antityrosinase des extraits aqueux. Les différences observées peuvent être liées à la différence géographique, les conditions environnementaux auxquels pourraient s'ajouter la saison de la récolte, la durée et les conditions de stockage, les types d'organes de la plante et la méthode d'extraction. (Ruiz-Riaguas et al., 2020).

Tableau XVI: Activité anti-tyrosinase des extraits de *L. delicatulum*.

	% d' inhibition							IC ₅₀ µg/ml
	3.125 g/ml	6.25 µg/ml	12.5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	
EMe.F	20.73±0.19	38.3±0.28	48.36±0.54	53.93±0.95	55.36±1.22	63.54±1.22	69.17±0.65	24.77 ±0.5 ^b
EMe.R	32±0.83	45.18±0.19	53.30±0.83	59.67±1.08	64.34±0.65	75.99±1.72	78.75±0.83	9.87 ±0.15 ^a
EAq.F	-	-	-	-	-	-	-	-
EAq.R	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide kojique	19.25±0.23	27.95±0.89	38.56±0.19	49.19±1.02	54.24±0.32	61.42±1.32	65.18±0.38	25.23±0.21 ^c

Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes à ($p < 0,05$). (-) :non active.
F :Feuilles,R :Racines

6. Activité anti-inflammatoire

6.1. Inhibition de la dénaturation de BSA

La dénaturation des protéines est bien documentée parmi les causes de l'inflammation ,et la capacité à inhiber cette dénaturation est l'un des mécanismes d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens . Pour évaluer l'activité anti-inflammatoire de la plante étudiée la méthode utilisant la protéine BSA (Bovine Sérum Albumine) a été employée.

L'effet protecteur des extraits de *L. delicatulum* contre la dénaturation thermique de la BSA a été rapporté en tant que pourcentages d'inhibition (figure 21). Le taux d'inhibition était dose-dépendant. Les extraits méthanoliques des feuilles et de racines ont montré un effet protecteur très puissant contre la dénaturation de la BSA induite par chauffage à 72 ° C ($90,21 \pm 1,69$ et $89,74 \pm 1,63$ % à 500 µg / ml, respectivement) (figure 21 A).Elle est significativement plus élevées ($p \leq 0,05$) que le Diclofénac ($86,15 \pm 0,89$ %) (figure 21 C).Cela indique que ces extraits pouvait être une source de composés avec de puissants effets anti-inflammatoires.

D'autre part, les extraits aqueux ont exercé un faible effet anti-inflammatoire (figure 21 B) à la concentration la plus élevée (500 µg / ml) comparé aux extraits méthanoliques avec des taux d'inhibition de $43,32 \pm 0,13$ et $38,14 \pm 0,81$ %, respectivement. Ces résultats peuvent s'expliquer par les teneurs élevées des extraits méthanoliques en composés phénoliques notamment les flavonoïdes par rapport aux extraits aqueux.

Il a été rapporté que certains anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que le diclofénac , l'acide salicylique, phenylbutazone et l'indométacine n'inhibent pas seulement la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires,mais aussi possèdent un effet protecteur contre la dénaturation des protéines induite thermiquement à pH physiologique (pH: 6.2 à 6.5) (**Ramalingam et al., 2010; Sangeetha et al., 2011**). La dénaturation des protéines est un processus dû à l'altération des liaisons

hydrogène, hydrophobes, électrostatiques et disulfures, qui conduit à la perte de leurs structures secondaires et tertiaires. La plupart de ces protéines perdent leurs fonctions biologiques, et

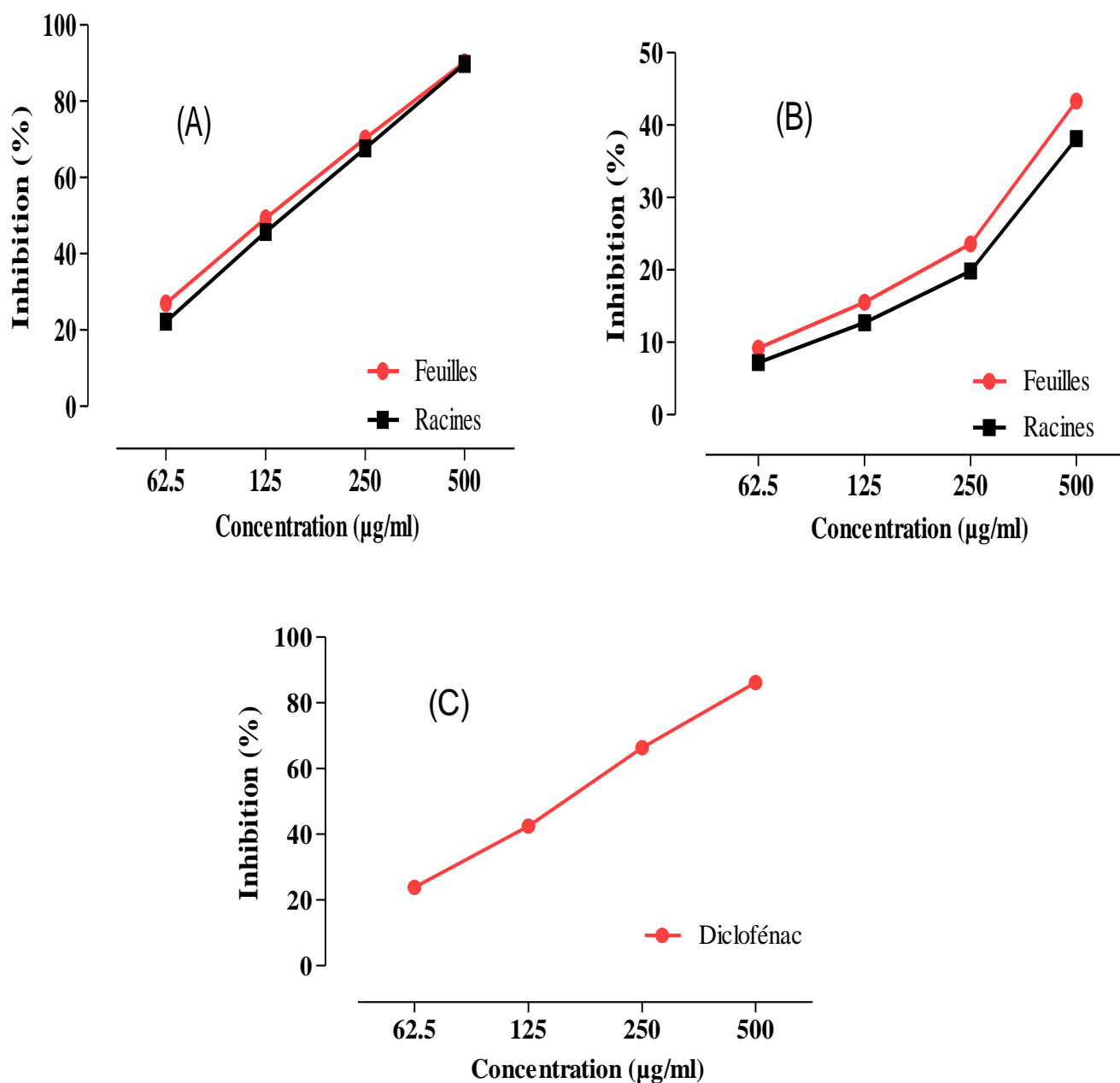


Figure 21: Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine induite par la chaleur par les différents extraits de *L. delicatulum* et le Diclofénac. (A) :Extraits méthanoliques, (B) :Extraits aqueux, (C) :Diclofénac. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD.

induisent la production d'auto-antigènes provoquant plusieurs dysfonctionnements auto-immunes dont des maladies rhumatismales et inflammatoires (Mouffouk et al., 2020). D'après les résultats, on constate que les extraits de *L. delicatulum* sont capables de contrôler la production d'auto-antigène par l'inhibition de la dénaturation des protéines. L'activité inhibitrice de la dénaturation de BSA est

peut être attribuée à la présence de différents composés bioactifs tels que les flavonoïdes et les protéines. Deux sites de liaison sur la BSA ont été identifiés comme étant des régions de résidus de thréonine et de lysine riches en tyrosine et aliphatique (Williams et al., 2008). Les tannins dans l'extrait ont été trouvés lors des criblages phytochimiques. On pense que les extraits de plantes ou les médicaments inhibent la dénaturation de la BSA grâce à leur capacité à se lier à la

7. Activité antibactérienne

7.1. Zones d'inhibition

Les différents extraits de *L.delicatulum* ont été testés sur des souches bactériennes Gram- (*Salmonella enterica serovar Typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) et Gram+ (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*). Les résultats des zones d'inhibition obtenues à différentes concentrations sont représentés dans le tableau XVII. En général, les extraits méthanoliques des feuilles et des racines de *L.delicatulum* se sont révélés actifs contre les souches Gram⁺ et les souches Gram⁻. Tandis que les extraits aqueux n'avaient aucune activité antimicrobienne. Le diamètre de la zone d'inhibition des témoins positifs et négatifs était nul en absence des extraits, et en présence du DMSO.

L'extrait méthanolique des racines s'est révélé le plus actif contre toutes les souches testées par rapport à l'EMe des feuilles. Il avait une activité inhibitrice modérée contre *E. coli*, *P. aeruginosa* et *L. monocytogenes* avec des zones d'inhibition de 15.5 ± 0.21 , 16 ± 0.88 et 17 ± 0.81 mm, respectivement obtenues avec 200 mg/ml. Le potentiel antibactérien était dose-dépendant.

L'EMe des feuilles montre également une bonne activité contre *L.monocytogenes* et *P.aeruginosa* avec des zones d'inhibition de 13.5 ± 1.1 mm et 14.5 ± 0.20 mm respectivement, alors qu'il est moins actif contre *Salmonella Typhi* et *Bacillus subtilis* (10.5 ± 1.1 et 10 ± 0.70 mm respectivement à 200 mg/ml), et ne possède aucune activité à la concentration de 25 mg/ml avec ces deux souches. À une concentration de 12.5 mg/ml de faibles zones d'inhibition ont été observées seulement avec *E.coli* et *L. monocytogenes* (Zone d'inhibition = 6 ± 0.00 et 5.25 ± 0.33 mm respectivement). Par contre cet extrait est inactif contre toutes les souches testées à la concentration de 6,25 mg/ml.

Tableau XVII : Zones d'inhibition en mm obtenues avec les extraits de *L.delicatulum* contre les souches testées.

Extraits	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)					
	Gram négative			Gram positive		
	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. monocytogenes</i>
EMe.des feuilles						
200mg/ml	12±0.00	10.5±1.1	14.5±0.20	11.25±0.07	10±0.70	13.5±1.1
100 mg/ml	10.5±0.15	8±1.2	8.5±0.94	9.75±0.2	8±0.00	10.75±0.75
50 mg/ml	9±0.34	6.25±0.76	6.5±0.81	8.5±0.00	06±0.51	8.5±0.00
25 mg/ml	8.25±0.09	-	5.25±0.21	6±0.32	-	7±0.00
12.5 mg/ml	6±0.00	-	-	-	-	5.25±0.33
6.25 mg/ml	-	-	-	-	-	-
EME.des racines						
200 mg/ml	15.5±0.21	12.5±0.63	16±0.88	14.25±0.00	12±0.71	17±0.81
100 mg/ml	12±0.00	11.25±0.56	14±0.70	12.5±0.5	10±0.21	12.5±0.25
50 mg/ml	11.5±0.71	9.5±0.81	10.5±0.22	10.5±1.1	9±0.00	10±0.75
25 mg/ml	10.5±0.23	8±0.41	8.5±0.11	8.5±0.33	7±0.00	7.3±0.22
12.5 mg/ml	9 ±0.00	-	-	6.5±0.00	-	6.9±0.37
6.25 mg/ml	6 ±0.00	-	-	-	-	5±0.75
EAq.des feuilles						
200 mg/ml	-	-	-	-	-	-
100 mg/ml	-	-	-	-	-	-
50 mg/ml	-	-	-	-	-	-
25 mg/ml	-	-	-	-	-	-
EAq.des racines						
100mg/ml	-	-	-	-	-	-
50mg/ml	-	-	-	-	-	-
25mg/ml	-	-	-	-	-	-
12.5mg/ml	-	-	-	-	-	-
Gentamicine						
100mg/ml	20±0.25	21±0.00	17±0.00	15±0.71	25±0.35	19±0.00

Les valeurs sont représentées en moyennes ± l'écart type de deux essais. *E. coli* : *Escherichia coli*, *S. typhi* : *Salmonella enterica serovar Typhi*, *P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* : *Staphylococcus aureus*, *B. subtilis* : *Bacillus subtilis*. *L. monocytogenes* : *Listeria monocytogenes* . (-) : Absence d'activité.

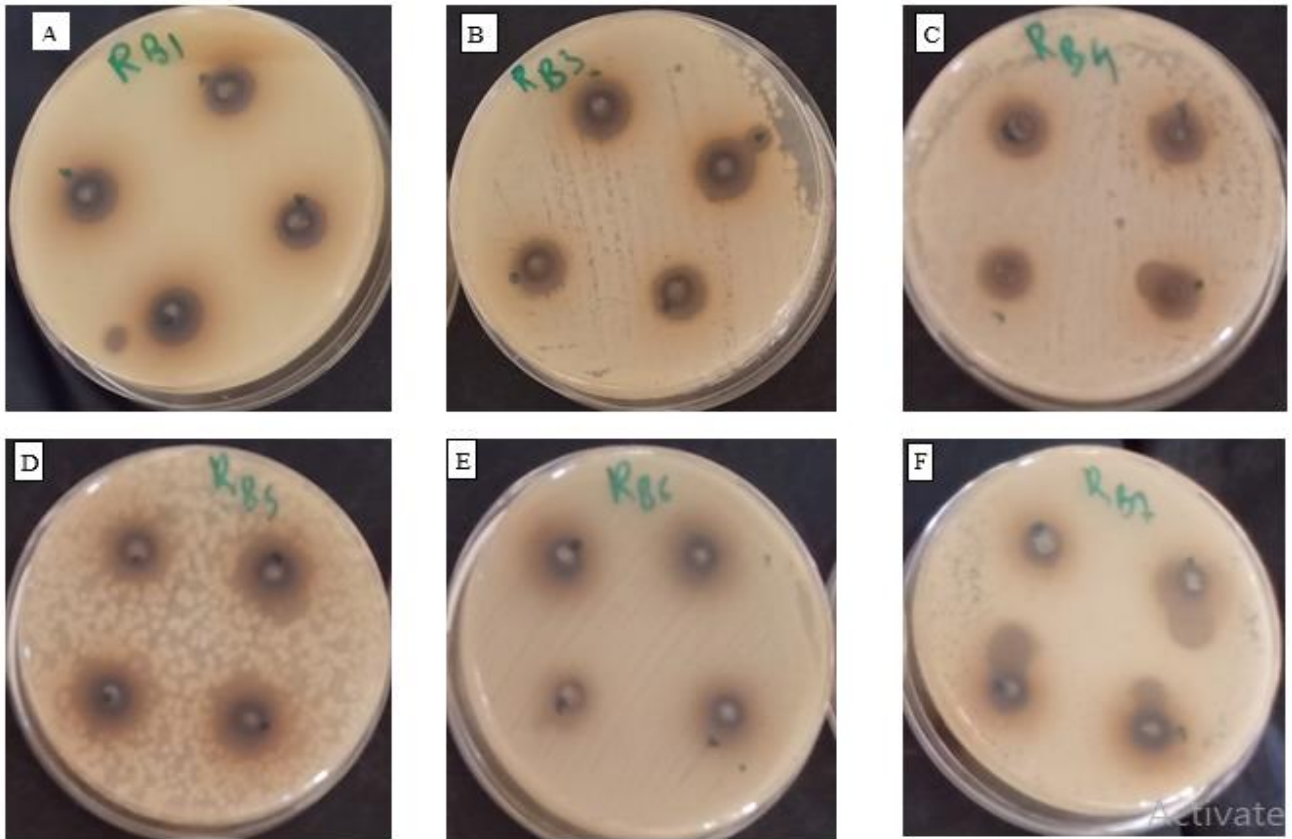


Figure 22 : Photos de quelques zones d'inhibition obtenues avec l'EME des racines de *L.delicatulum*, (A) : *P. aeruginosa*, (B) : *L. monocytogenes*, (C) : *E. coli*, (D) : *S. aureus*, (E) : *S. typhi*, (F) : *B. subtilis*.

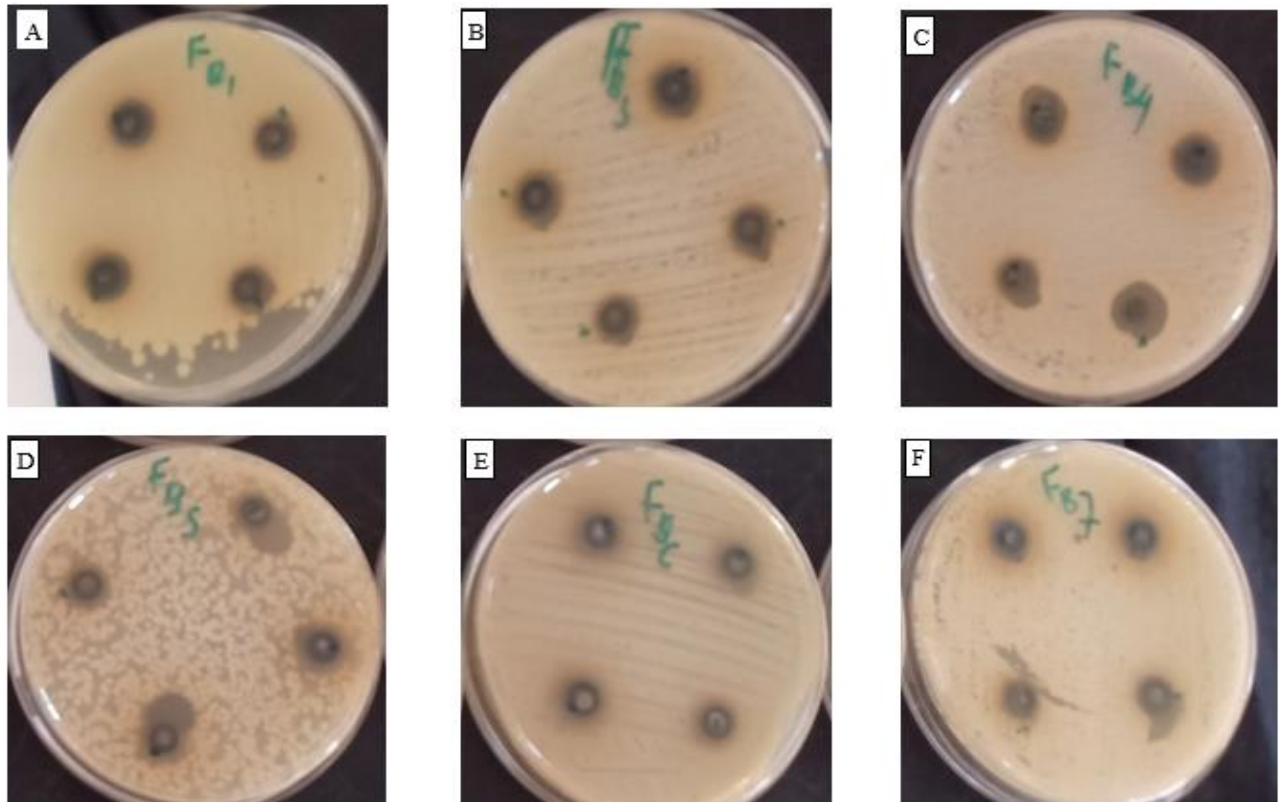


Figure 23 : Photos de quelques zones d'inhibition obtenues avec l'EME des feuilles de *L.delicatulum*. (A) : *P. aeruginosa*, (B) : *L. monocytogenes*, (C) : *E. coli*, (D) : *S. aureus*, (E) : *S. typhi*, (F) : *B. subtilis*.

L'antibiotique (Gentamicine) utilisé exerce une importante inhibition (figure 24) contre toutes les souches testées. La gentamicine appartient à la famille des aminoglycosides, qui agissent sur la synthèse de protéines en se liant à l'ARN ribosomique au site A du ribosome bactérien, ainsi il altère la perméabilité de la membrane cellulaire, entraînant la rupture progressive de l'enveloppe cellulaire puis éventuellement la mort de la cellule (Chanal *et al.*, 1980).

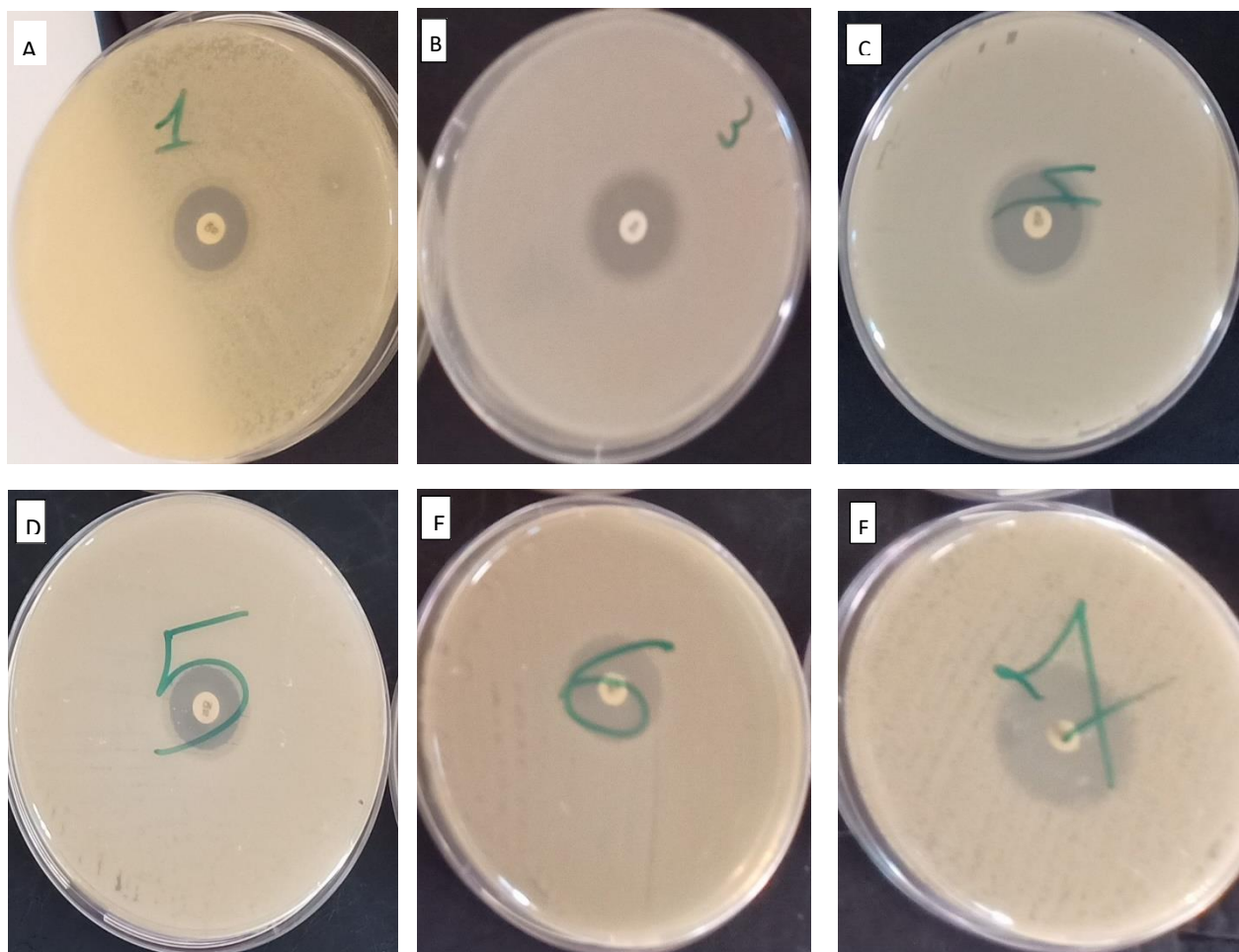


Figure 24 : Photos des zones d'inhibition obtenues avec la Gentamicine. (A) : *P. aeruginosa*, (B) : *L. monocytogenes*, (C) : *E. coli*, (D) : *S. aureus*, (E) : *S. typhi*, (F) : *B. subtilis*.

7.2. Concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI), des extraits ont été déterminées par la méthode de dilution en milieu liquide sur microplaque. La CMI correspond à la concentration la plus faible de l'échantillon à laquelle aucune croissance bactérienne n'est détectée. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau XVIII.

L'EMe des racines montre des valeurs de CMI inférieures à celles obtenues par l'EMe des feuilles. L'EMe des racines présentent une faible valeur de CMI contre *E. coli* et *L. monocytogenes* (3.125mg/ml) dénotant leur forte activité antibactérienne vis-à-vis ces deux souches, par contre

Tableau XVIII : Valeurs des CMI des extraits méthanoliques de *L.delicatulum*.

	CMI (mg/ml)					
	<i>E.coli</i>	<i>S.typhi</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>L.monocytogenes</i>
EMe.Feuilles	12.5	50	50	25	25	12.5
EMe. Racines	3.125	25	25	12.5	12.5	3.125

l'EMe des feuilles donne également une CMI de 12.5 mg contre ces deux souches. Par ailleurs la grande valeur de CMI été enregistrée avec *S.typhi* et *B. subtilis*, elle a été de 50 mg pour l'EMe des feuilles et 25 mg pour l'EMe des racines.

Les résultats obtenus ont révélé que les deux extraits méthanolique de *L.delicatulum* possèdent une activité antibactérienne,dont l'intensité varie en fonction de la partie de la plante utilisé ,la concentration et la sensibilité de la souche testée. En effet,ces différents résultats pourraient être attribués aux différents métabolites secondaires présents dans les extraits de la plante utilisée y compris les flavonoïdes ,les triterpenoïdes,les saponines (**Najafi et al.,2013 ; Singh et al.,2013**), ainsi que d'autres composés de nature phénolique ou les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools,phénols,aldéhydes),qui sont classifiés comme composé antibiotiques très actifs (**Oussalah et al.,(2007)**). Selon **Frag et al.,(1989)**, la présence des groupement OH dans les composés phénoliques est capable de former des liaison hydrogénées avec les sites actifs des enzymes et d'accroites l'activité antibactérienne.Les alcaloïdes et les coumarines détectés dans la plante peuvent aussi intervenir à l'activité importante exercée par les extraits méthanoliques des feuilles et des racine de *L.delicatulum* (**Ezmirly et Wilson, 1980**).L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant principal,mais à l'action combinée (synergie) de différents composés à l'origine de cet extrait (**Essawi et Srour,2000**).

En plus plusieurs études ont été menées pour comprendre le mécanisme d'action des extraits de plantes.Plusieurs chercheurs attribuent l'activité antibactériennee aux composés phénoliques.Ces composés peuvent interférer avec les biomembranes en causant des dommages cellulaires et provoquant la fuite de matériaux cellulaire et finalement la mort des microorganismes (**Veldhuizen et al.,2006**). C'est un mécanisme possible par lequel la croissance bactérienne peut être réduite ou totalement inhibée par l'effet des extrais méthanoliques de *L. delicatulum*.

Dans nos conditions expérimentales, les extraits aqueux n'ont démontré aucune activité inhibitrice sur toutes les souches aux doses testées. L'absence de l'activité peut être due à l'absence des compés actifs dans l'extrait ; car les extraits bruts des plantes sont toujours un mélange de composés actifs et non actifs (**Madhumitha et Saral,2011**) ,ou s'ils sont présents leur concentration est très faible de manière à ne pas être efficaces pour donner une zone d'inhibition

mesurable. De plus, il peut y avoir une perte de leur activité ainsi que le processus de séchage du matériel végétal peut causer des changements de certains constituants chimiques présents dans les feuilles ou les racines d'où leur inefficacité (**Parekh et Chanda,2007**) sachant que l'isolement successif des composés du matériel végétal dépend largement du type de solvant utilisé dans la procédure d'extraction (**Sivaraj et al.,2011**). L'efficacité d'un extrait dépend de sa concentration, de la plante du quelle il est issu et de la souche testée (**Klervi ,2005**).

Des résultats similaires ont été obtenus par **Medini et al. (2014)**, qui ont trouvé que l'extrait aqueux des feuilles de *L. delicatulum* n'avaient aucune activité antimicrobienne .En revanche l'EMe avaient une activité modérée contre *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, avec des zones d'inhibition de 8 ,10 , 8 mm respectivement à une concentration de 1000 ug/ml. Par ailleurs l'EMe des feuilles été inactif sur *S.typhi* et *E.coli* ce qui est en contradiction avec notre résultat.Cela pourrait expliqué par la différence de la méthode utilisé ,du protocole d'extraction ,des différences géographiques et les conditions environnementaux,ou la quantité de l 'extrait déposé sur les disques est plus faible.

8. Etude de la toxicité

C'est un méthode très utile pour l'évaluation d'une manière simple et rapide le potentiel toxique de divers extraits de plantes ou des substances pures (**Gadir, 2012; Naidu et al., 2014**). Après une exposition de 24 heures aux extraits testés, le pourcentage de mortalité des larves a été déterminé.

Dans le présent travail, les extraits méthanoliques ainsi que les extraits aqueux de *L.delicatulum* ont été testés pour leur toxicité à des concentrations allant de 20, 40, 60, 80 et 100 µg/mL contre 10 larves d'*Artemia salina*. Les résultats obtenues sont présentés dans la figure 25 à différentes concentrations sous forme de pourcentages de mortalités. La concentration provoquant une mortalité de 50% des larves (LC₅₀) a été également déterminée et les différentes valeurs sont représentées dans le tableau XIX.

Selon **Meyer et al. (1982)**,les extraits végétaux sont toxiques si leur valeur LC₅₀ est inférieure à 1 000 µg/ml,alors qu'ils sont non toxiques si elle est supérieure à 1 000 µg/ml. De plus, l'activité cytotoxique est considérée faible lorsque la valeur LC₅₀ est comprise entre 1 000 et 500 µg/ml, modérée quand elle est entre 500 et 100 µg/ml et forte quand elle est comprise entre 100 et 0 µg/ml.

Dans la présente étude, l'EMe des racines et des feuilles ont montré des valeurs de LC₅₀ inférieurs à 100 µg/ml (49.75 et 63.45 µg/ml,respectivement), indiquant ainsi la présence des composés cytotoxiques puissants dans la plante responsables de l'activité observée contre les larves d'*Artemia salina*. Le pourcentage croît en fonction de la concentration de l'extrait, et le maximum de mortalité (98.15 %) a été obtenu à partir de 100 µg/ml pour l'EMe des racines et de 89.33% pour

l'EMe des feuilles. Les extraits aqueux des deux parties de la plante ont révélé que la Concentration Létale était supérieur à 500 µg/ml à l'égard des larves d'*Artémia salina*. Il ressort donc qu'ils sont faiblement toxique. Il faut noter qu'aucune mortalité n'a été observée avec le groupe témoin traité avec l'eau de mer.

Les extraits méthanoliques ont montré une activité cytotoxique plus élevée que celle des extraits aqueux ces résultats peut être attribués au quantité de composés cytotoxiques extraites par chaque solvant comme indiqué par **Sultana et al., (2007)**, l'efficacité du solvant pour dissoudre une substance endogène pourrait également être un facteur contributif très important.

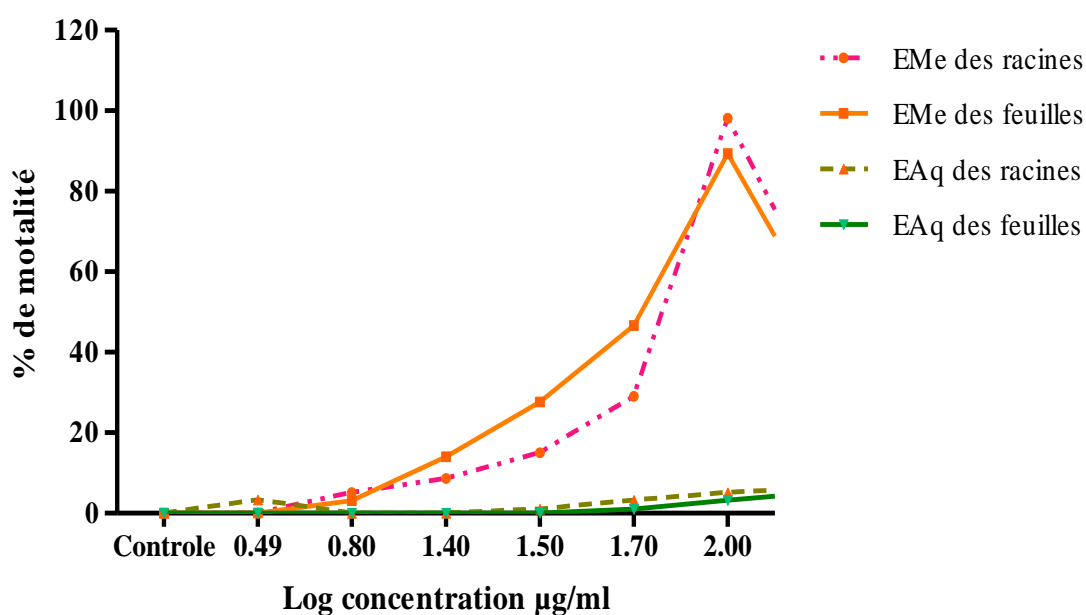


Figure 25 : Toxicité des extraits méthanoliques et aqueux de *L.delicatulum* vis-à-vis des larves d'*Artemia salina*.

Tableau XIX: Valeurs de LC50 des différents extraits méthanoliques et aqueux de *L.delicatulum*.

Extraits	% de mortalité à 100µg/ml	LC ₅₀ (µg/ml)
EMe des racines	98.15	49,75
EMe des feuilles	89.33	63.45
EAq des racines	9.19	>500
EAq des feuilles	7.6	>500
Bichromate de K*	95,40	21,57

*Bichromate de potassium est utilisé comme standard.

Dans certains cas le degré de toxicité est associée au niveau de la bioactivité d'un composé (**Wanyoike et al., 2004**). De ce fait les extraits méthanoliques, présentant une activité antibactérienne importante, montre également un effet mortel remarquable vis-à-vis les larves

d'Artemia. Par contre les extraits aqueux ne présentant aucun effet antibactérien et ne montre aucune toxicité. De ce fait, on peut relever que les solvants utilisés lors de l'extraction ont un effet sélectif pour les substances extraites (**Medini et al.,2014**). En plus de nombreuses études antérieures ont montré que les extraits de plantes qui présentaient une toxicité contre les larves d'Artemia salina. avec une valeur de LC₅₀ inférieure à 100 µg / mL sont classés comme cytotoxiques et peuvent constituer des agents antitumoraux et anticancéreux potentiels (**Elumba et al.,2013 ,Magdalene et al.,2014**). La variabilité des résultats de l'activité cytotoxique des extraits de *L.delicatulum* entre les feuilles et les racines pourrait être liée à la différence au profil chimique entre les deux organes tels que les polyphénols, les alcaloïdes dont la plupart sont de puissants piègeurs de radicaux libres. Les polyphénols sont connus pour leurs activités antitumorales dans divers types de cancer (**Roy et Vijayalaxmi, 2013**). En effet, les saponines détectées précédemment dans ces extraits sont connues comme des agents potentiels antiprolifératifs et antitumoraux ayant des effets cytotoxiques (**Ayaz et al.,2016**).

Conclusion générale et
perspectives

Le présent travail a rapporté pour la première fois le contenu phénolique ainsi que les effets antioxydants, antityrosinase, antiinflammatoires et antimicrobienne de l'halophyte *L. delicatulum*, afin d'évaluer la possibilité d'utiliser cette plante comme source de composés bioactifs aux applications multiples. Le criblage phytochimique des extraits aqueux et méthanoliques a révélé la présence de plusieurs classes de métabolites secondaires à savoir les tanins, les triterpènes, les saponins, les flavonoïdes. Les alcaloïdes sont présents uniquement dans les extraits méthanoliques de la plante.

Des quantités importantes en composés phénoliques, y compris des flavonoïdes et des tanins condensés ont été enregistrées dans les extraits de feuilles et de racines. Les résultats obtenus, montrent l'efficacité des extraits méthanoliques comme antioxydants, exerçant une activité très puissante liée à leur richesse en composés phénoliques, tout en montrant un effet inhibiteur très important de la tyrosinase. Les racines de *L. delicatulum* ont montré un fort effet inhibiteur par rapport aux feuilles, qui peut être attribué à leur forte teneur en composés phénoliques et en tanins condensés. Par ailleurs les extraits aqueux ont été inactifs contre cette enzyme et montrent une activité antioxydante plus ou moins faible. Les extraits sont capables de contrôler la production d'auto-antigène par l'inhibition de la dénaturation des protéines ceci peut être attribuée à la présence de différents composés bioactifs tels que les flavonoïdes et les tanins dans les extraits trouvés lors de criblage phytochimique.

L'activité antibactérienne a montré l'effet des différents extraits méthanoliques contre les souches sensibles. L'extrait méthanolique des racines a été le plus actif par rapport à l'extrait des feuilles. Tandis que les extraits aqueux n'ont démontré aucune activité inhibitrice sur toutes les souches aux doses testées. Le test de cytotoxicité indique la présence des composés cytotoxiques dans les extraits méthanoliques donc ils peuvent constituer des agents antitumoraux et anticancéreux potentiels.

À l'issue des différents résultats obtenus, on peut considérer *Limonium delicatulum* comme une source de molécules bioactives ayant des applications dans les industries cosmétiques, pharmaceutiques et alimentaires. Néanmoins des études *in vivo* doivent être effectuées pour des résultats plus approfondies. De ce fait des études complémentaires peuvent être envisagées à savoir :

- La présente étude est menée avec des extraits présentant une composition chimique variée. Ainsi la séparation des composés et l'étude de leurs activités séparément est nécessaire pour l'identification des composés actifs.
- Détermination des activités anti-oxydantes et anti-tyrosinase sur des cultures cellulaires.
- L'étude *in vivo* des activités anti-inflammatoire, anti-prolifératives et anti-tumorales.

- La détermination de la structure chimique des composés actifs constitue une première étape de développement d'un médicament. L'étude de l'interaction de ces composés avec leur cible permet la sélection des molécules et le développement de molécules plus actives par modification chimique (produit hémisynthétique).
- L'étude du mécanisme d'activité antimicrobienne d'un composé peut être intéressante pour surmonter le problème de la résistance par l'association avec des antibiotiques couramment utilisés.

Références bibliographiques

- Akroum S. (2010). Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de Doctorat : Université Mentouri de Constantine-Algérie,p125.
- Agati G., Brunetti C., Di Ferdinando M., Ferrini F., Pollastri S., Tattini M., (2013). Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 35–45.
- Ait El Cadi M., Makram S., Ansar M., Khabbal Y., Alaoui K., Faouzi M. A., Taoufik, J. (2012). Activité anti-inflammatoire des extraits aqueux et éthanolique de *Zygophyllum gaetulum*. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 70(2), 113–116.
- Al-Duais, M., Müller, L., Böhm, V., & Jetschke, G. (2009). Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. *European Food Research and Technology* 228, 813–821.
- Allen HK., Donato J., Wang HH., Cloud-Hansen k.A., Davies J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology* 8:251–9.
- Al-Majedy Y.K., Kadhun A.A.H., Al-Amiery A.A., and Mohamad A.B. (2017). Coumarins: The Antimicrobial agents. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 8 (1): 62-70.
- Amrani A., Boubekri N., Benaissa O., Zama D., Benayache F., Benayache S. (2017). Protective role of *Limonium bonduelli* extract against non-enzymatic peroxidation in brain and testes induced by iron. *International Journal of Phytomedicine* 9, 72-78.
- Amrania A., Mecheria A., Bensouici CH., Boubekria N, Benaissaa O., Zamaa Dj., Benayachea F., Benayachea S. (2019). Evaluation of antidiabetic, dermatoprotective, neuroprotective and antioxidant activities of *Chrysanthemum fontanesii* flowers and leaves extracts. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20;101209.
- Andersen. M., Markham K. R. (2006). FLAVONOIDS: Chemistry, Biochemistry and Applications. Ed. Taylor & Francis. London. 1197 p.
- Ando H., Kondoh H., Ichihashi M., Hearing V.J. (2007). Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase. *Journal of Investigative Dermatology*, 127, 751-761.
- Apak R., Güçlü K., Özyürek, M. Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 7970–7981.
- Artés F., Castañer, M., Gil, M.I. (1998). Review: enzymatic browning in minimally processed fruit and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 4, 377-389.
- Aruoma O.I. (1998). Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. *Journal of the American oil chemists' society*, 75 (2): 199-212.
- Atawodi S. E. (2005). Antioxidant potential of African plants. *African Journal of Biotechnology*. 4 (2): 128-133.
- Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache, N., Atmani, D. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian photo phosphorylation. *FEBS Lett*, 85: 215– 218.
- Ayaz M., Junaid M., Ullah, F., Sadiq A., Subhan F., Khan M.A., Ahmad S. (2016). Molecularly characterized solvent extracts and saponins from *Polygonum hydropiper* L. show high antiangiogenic, anti-tumor, brine shrimp, and fibroblast NIH/3T3 cell line cytotoxicity. *Frontiers in Pharmacology*., 7, 74.

- Ayoola G.A., H.A.B. Coker, S.A. Adesegun, A.A.Adepoju-Bello, K. Obaweya, E.C. Ezennia and T.O.Atangbayila (2008). Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in South Western Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7: 1019-1024.
- Badria F. A., ElGayyar M. A. (2001). A new type of tyrosinase inhibitors from natural products as potential treatments for hyperpigmentation, 140 (4) 267-271.
- Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C., Pinkas M., Luycky M., Gazin M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzeimittel-Forschung*, 46: 1086-1089.
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food chemistry*, 9: 191-203.
- Bammou, M., Bouhlali, E.D.T. Sellam, K., El-Rhaffari, L., Ibjbjjen, J., Nassiri, L. (2020). Évaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits aqueux des feuilles et des fleurs de *Bituminaria bituminosa* (L.) Stirton. *Phytothérapie*, 1-8.
- Barnes Peter J (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids : molecular mechanisms. *Clinical Science*, 94, 557-572.
- Barton G. M. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of clinical investigation*, 118(2), 413-420.
- Bartosz G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comm Toxicol.*, 9: 5-21.
- Battaini G., Monzani E., Casella L., Santagostini L., Pagliarin R. (2000). Inhibition of the catecholase activity of biomimetic dinuclear copper complexes by kojic acid. *Journal of biological inorganic chemistry*, 5, 262- 268.
- Beddou F. (2015). Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex Vesicarius* L. et *Anvillea radiata* Coss. Thèse de doctorat en biologie cellulaire et biochimie, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, 164p.
- Bellebcir L. (2008). Etude des composés phénoliques en tant que marqueurs de biodiversité chez les céréales. Mémoire de magister en biodiversité et production végétale, Université Mentouri, Constantine, 1119p.
- Bellik Y., Benabdesselam F., Ayad A., Dahmani Z., Boukraa L., Nemmar A., Iguer-Ouada M., (2013). Antioxidant activity of the essential oil and oleoresin of *Zingiber officinale* Roscoe as affected by chemical environment. *International Journal of Food Properties*, 16 (6), 1304–1313.
- Berger M.M. (2006) Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 20,48-5.
- Bergogne E., Dellamonica P. (1995). *Antibiothérapie en pratique Clinique*. Masson (Ed). Paris. 486p.
- Bernard F.X., Sablé S., Cameron B., Provost J., Desnottes J-F., Crouzet J., and Blanche F. (1997). Glycosylated Flavones as Selective Inhibitors of Topoisomerase IV. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41 (5): 992–998.
- Besle J.M., Lamaison J.L., Pradel P., Fraisse D., Viala D., Martin B. (2004). Les flavonoïdes, des fourrages au lait. *Renc. Rech .Ruminants*, 11 :67-70.
- Beuria T.K., Santra M.K., and Panda D. (2005). Sanguinarine Blocks Cytokinesis in Bacteria by Inhibiting FtsZ Assembly and Bundling. *Biochemistry*, 44: 16584-16593.
- Blain, Jouzeau, Netter and Jeandel (2000). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2. Intérêt et perspectives. *Revue de Médecine Interne*, 21, 978-88.

- Bogatcheva E., Hanrahan C., Nikonenko B., de los Santos G., Reddy V., Chen P. (2011). Identification of SQ609 as a lead compound from a library of dipiperidines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21:5353–7.
- Boizot N., Charpontier J. P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénolique des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*, 79-82.
- Bouayed J., Rammal H., Dicko A., Yonos C., Soloumani R. (2007) Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects, *Journal of the Neurological Sciences*, 262, 77–84.
- Bouhlali T., Hmidani A., Bourkhis B., Khouya T., Ramchoun M., Filali Y., Alem CH. (2020). Phenolic profile and anti-inflammatory activity of four Moroccan date (*Phoenix dactylifera* L.) seed varieties. *Heliyon*, 6, e03436.
- Briganti, S. Camera, E. ; Picardo, M. (2003). Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Research*, 16, 101-110.
- Brown J. E., Khodr H., Hider R. C., Rice-Evans C. (1998) Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions. *Biochemistry Journal*, 330 : 1173-1178.
- Bruneton J (1999) (a) . Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 3^{ème} édition, Lavoisier, Paris : 1120.
- Bruneton J. (1999) (b) . Phenolics Shikimate Acétate. In « Pharmacognosy Phytochemistry Medicinal Plants » . Ed.: 2nd Technique & Documentation: 227-459.
- Bruneton J. (2009). Pharmacognosie-Phytochimie, plantes médicinales. 4^{ème} édition. Paris: Edition Tec & Doc. Edition médicales internationales 1292 p.
- Cabanes J., Chazarra S. and García-Carmona F. (1994) Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 46: 982–985.
- Carbon C., Regnier B., Saimot G. (1994). Médicaments anti-infectieux. Flammarion (Ed) Paris. 501p.
- Carpenter K. J. (1981) Individual amino acid levels and bioavailability. In: *Protein Quality in Humans: Assessment and In Vitro Estimation*, 239–160.
- Cattoir V. (2004). Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria. *Pathologie Biologie*, 52, 607–616.
- Cemeli E. Adolf B., Diana A. (2008). Antioxidant and the comet assay, *Mutat. Res.* 681 51–67.
- Cetkovic G., Canadanovic-Brunet J., Djilas S., Savatovic S., Mandic A., Tumbas V., 2008. Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. *Food Chemistry*, 109: 340-347.
- Chai W.M., Huang Q., Lin M.Z., Yang C.O., Huang W.Y., Ying-Xia Wang Y.X., Xu K.L., Feng H.L (2018). Condensed Tannins from Longan Bark as Inhibitor of Tyrosinase: Structure, Activity, and Mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, 908–917.
- Chanal M., Roussanne M.C., Miermont C., Cluzel M., Sirot D. (1980) .Activité anti-bactérienne de la nétilmicine comparée avec d'autres aminosides. 7 - 327-333.
- Charles N. S., Peter A. W. & Derek W. G. (2010). *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge University Press, 2-3.
- Charlier P., Coyette J., Dehareng D., Dive D., Duez C., Dusart J., Fonze É., Fraipont C., Frère J-M., Galleni M., Goffin C., Joris B., Lamotte-Brasseur J., and Nguyen-Distèche M. (1998). Résistance bactérienne aux β-lactamines. *Médecine/Sciences*, 14: 544-55.

- Chaung S.S., Lin C.C., Lin J., Yu K.H., Hsu Y.F., Yen M.H. (2003). The Hepatoprotective Effects of *Limonium sinense* Against Carbon Tetrachloride and β -D-Galactosamine Intoxication in Rats. *Phytotherapy Research* 17, 784–791.
- Chebaibi A., Marouf Z., Rhazi-Filali F., Fahim M., Ed-Dra A. (2011). Evaluation of antimicrobial activity of essential oils from seven Moroccan medicinal plants. *Phytotherapie* 14(6):355-362.
- Chen X.X., Shi Y., Chai W.M., Feng H.L., Zhuang J.X., Chen Q.X. (2014). Condensed Tannins from *Ficus virens* as Tyrosinase Inhibitors: Structure, Inhibitory Activity and Molecular Mechanism. *Plos One* 9(3), 91809- 91809.
- Chippada S. C., Volluri S. S., Bammidi S. R., & Vangalapati M. (2011). In vitro anti-inflammatory activity of methanolic extract of *Centella asiatica* by HRBC membrane stabilisation. *Rasayan Journal of Chemistry* :4(2), 457-460.
- Chira K., Suh J.-H. et Teissède P.-L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6,75-82.
- Chung K-t et Wei C-I. (2001). Are tannins a double edged sword in biology and health?. *Trends in Food Science et Technology*, 9:168-175.
- Coustès T. (2016). Loi d'avenir agricole, réglementation du médicament vétérinaire et lutte contre l'antibiorésistance. Thèse de doctorat : Université de Toulouse. Pp16.
- Cowan M.M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Revue* 12(4):564-582.
- Critchfield J. W., Butera S. T., Folks T. M. (1996). Inhibition of HIV Activation in Latently Infected Cells by Flavonoid Compounds. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 12(1), 39–46.
- Cronquist A. (1988). *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. New York Botanical Garden, Bronx.
- Crozier A., Clifford M. N. et Ashihara, H (2008). *Plant secondary metabolites : Occurrence, structure and role in the human diet*. Edition John Wiley and Sons, p321.
- Crozier A., Clifford M.N. & Ashihara H. (2006). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Ed. Blackwell Publishing Ltd, UK.
- Ćujić N., Šavikin K., Janković T., Pljevljakušić D., Zdunić G., Ibrić S. (2016). Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chemistry* 194, 135–142.
- Curini M., Epifano F., Genovese S., Menghini, A., Altinier G., Tubaro, A., Menghini L. (2006). Fatty acids profile and antiinflammatory activity of *Nonea setosa* R. et S. *Phytotherapy Research*, 20, 422-423.
- Cuvillon P., Viel E. (2002). Anti-inflammatoires non stéroïdiens anti-COX-2. Une nouvelle approche thérapeutique de la douleur aiguë ? *Le Courrier de l'algologie* (1), 19-23.
- Dacosta, Y. (2003). *Les phytonutriments bioactifs*. Ed Yves Dacosta. Paris.
- Daglia M. (2011). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23,1-8.
- Daglia M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23:174–181.
- Das B., Dey, A., Das Talukdar A., Nongalleima K., Choudhury M. D., Deb, L. (2014). Antifertility efficacy of *Drynaria quercifolia* (L.) J. Smith on female Wister albino rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 153(2), 424–429.

- Dasgupta N., De B.(2004).Antioxidant activity of *Piper betle* L. leaf extract in vitro.Food Chemistry 88, 219–224.
- De Bruyne T., Pieters., Deelstra H., Vlietink A.(1999). Condensed vegetable tannins:Biodiversity and biological activities. Biochemical Systematics and Ecology, 27: 445-459.
- De Moffarts B., Kirschvink N., Pincemail J. et Lekeux1 P. (2005). Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. Annales de MedcineVeterinaire.149: 1-9.
- De Paiva S.R., Da Silva Marques S., Figueiredo M.R., Coelho Kaplan M.A. (2003). Plumbaginales A pharmacological Approach. Florestae Ambiente. 10(1), 98-10.
- Deba F., Dang Xuan T., Yasuda M., Tawata S.(2008). Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. Food Control. 19: 346-352.
- Dehak K. (2013). Méthodes d'extraction et de séparation des substances naturelles : Polyphénols. Université Kasdi Merbah.Ouargla, 19 p.
- Deighton, N., Brennan, R., Finn, C., & Davies, H. V. (2000). Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, 1307–1313.
- Delaquis PJ., Stanich K., Girard B., Mazza G. (2002).Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. Int J Food Microbiol 74:101–9.
- Deveci, E., Tel-Çayan, G., Duru, M.E.(2018). Phenolic profile, antioxidant, anticholinesterase, and anti-tyrosinase activities of the various extracts of *Ferula elaeochytris* and *Sideritis stricta*. International Journal of Food Properties 21 (1), 771–783.
- Devillers J., Steiman R., and Seigle-Murandi F. (1989). The usefulness of the agar-well diffusion method for assessing chemical toxicity to bacteria and fungi. Chemosphere, 10/11 (19), 1693-1700.
- Diplock A.T., Charleux J.L., Crozier-Willi G., Kok F.J., Rice-Evans C., Roberfroid M., Stah W., and Viiia-Ribes J. (1998). Functional food science and defence against reactive oxidative species. British Journal of Nutrition, 80 ,77-112.
- Dolores Liedo M., Manuel B.Crespo., Michael F.Fay., Marek W.Chase.(2005). Molecular Phylogenetics of Limonium and Related Genera (Plumbaginaceae): Biogeographical and Systematic Implications.American. Journal of Botany. 92(7),1189-1198.
- Doyle MP. (2006). Antimicrobial resistance: implications for the food system.Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 5:71–137.
- Dunkić V., Bezić N., Vuko E., Cukrov D. (2010). Antiphytoviral Activity of *Satureja montana* L. ssp. variegata (Host) P. W. Ball Essential Oil and Phenol Compounds on CMV and TMV. Molecules, 15(10), 6713–6721.
- Durand D ., Damon M. et, Gobert M. (2013). Le stress oxydant chez les animaux de rente : principes généraux. Cahiers de Nutrition et de Dietitique 48 : 218–224.
- Dykes, L. & Rooney, L. W. (2006). Sorghum and millet phenols and antioxidants. Journal of cereal Sciences 44, 236 - 241.
- Dzidic S., Suskovic J., Kos B. (2008) .Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. Food Technology Biotechnology: 46:11–21.
- Eldeen I.M.S., ElgorashiE.E, and van Staden J. (2005). Antibacterial, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and mutagenic effects of extracts obtained from some trees used in South African traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology:102 : 457–464.
- ElGharras H. (2009). Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. International Journal of Food Science and Technology, 44(12): 2512–2518.

- Elumba Z.S., Teves F.G., Madamba M.R.S.B.(2013). DNA-binding and cytotoxicity of supercritical-CO₂ extracts of *Ganoderma lucidum* collected from the wild plant of Bukidnon province, Philippines. *International Research Journal of Biological Sciences* :2, 62-68.
- El-Waziry A.M. (2007). Nutritive value assessment of ensiling or mixing Acacia and Atriplex using in vitro gas production technique. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* :3(6):605-614.
- Espín J. C. and Wichers H. J. (2001) Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta*: 1544: 289–300
- Essawi T., Srour M.(2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*:70:343-349.
- Ezmirly S.T and Wilson S.R. (1980). Saudi Arabian Medicinal Plants I: *Ruta chalepensis*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 1980, 2(2), 55-57.
- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. and Abdelly C.(2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus L.* organs and their biological activities. *Compte Rendu de Biologie*, 331: 372–379.
- Favier A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales pharmaceutiques françaises* 64: 390-396.
- Foddai M., Kasabri V., Petretto G.L., Azara E., Sias A., Afific F.U., Delogu G., Chessa M., Pintore G. (2014). In vitro Inhibitory Effects of *Limonium contortirameum* and *L. virgatum* Extracts from Sardinia on α -Amylase, α -Glucosidase and Pancreatic Lipase. *Natural Product Communications* 9 (2), 181-184.
- Frag R S., Daw Z Y., Hewdi F M. ,El Baroty G S A.(1989). Antimicrobial activity of some Egyptian spices essential oils. *Journal of Food protection*: 52:665-667.
- Frankel E. N., Meyer A. S. (2000). The problems of using onedimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925–1941.
- Fransworth N.R.(1966) . Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences* :55(3): 225-276.
- Freiburghaus F., Kaminsky R., Nkunya M., Brun R.(1996). Evaluation of African medicinal plants for their in vitro trypanocidal activity. *Journal of Ethnopharmacology*:55:1–11.
- Friedman M. (1996) Food browning and its prevention: an overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* : 44: 631–653
- Friedman M. and Bautista F. F. (1995) Inactivation of polyphenoloxidase by thiols in the absence and presence of potato tissue suspensions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* : 43: 69–76.
- Gadir S.A.(2012). Assessment of bioactivity of some Sudanese medicinal plants using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* :4, 5145-5148.
- Gali L., Bedjou F., Velikov K.P., Ferrari G., Donsi F.(2020). High-pressure homogenization-assisted extraction of bioactive compounds from *Ruta chalepensis*. *Journal of Food Measurement and Characterization* 14, 2800–2809.
- Gali, L., Bedjou, F. (2019). Antioxidant and anticholinesterase effects of the ethanol extract, ethanol extract fractions and total alkaloids from the cultivated *Ruta chalepensis*. *South African Journal of Botany*, 163–169.

- Gancedo N.C., de Medeiros D.C., Milaneze-Gutierrez M.A., Mello J.C.P. (2018). Morpho- anatomical characters of *Limonium brasiliense* leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 28, 513–519.
- Garcia-Borron J. C. ; Solano F.(2002). Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: Beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment. Cell. Research*: 15, 162-173.
- Garrido G. (2004).In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica L* extract (VIMANGS). *Pharmacological Research*, 50(2), 143–149.
- Gee, J.M. et Johnson, I.T. (2001). Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry*. 8: 1-182.
- Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V. M., Azzolini Ana ECS et Fonseca Maria J.V. (2003). Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. 5(2): 111–115.
- Germanas J.P., Wang S., Miner A., Hao W., Ready J.M.(2007). Discovery of small-molecule inhibitors of tyrosinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* : 17, 6871– 6875.
- Ghasemzadeh, A. & Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research* 5 (31), 6697-6703.
- Goossens H., Ferech M., Vander Stichele R., Elseviers M., ESAC Project Group (2005). Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study *Lancet* 365:579–87.
- Goudable J., Favier A.(1997).Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 11: 115-120.
- Govindappa M., & Poojashri M. N. (2011). Antimicrobial, antioxidant and in vitro anti-inflammatory activity of ethanol extract and active phytochemical screening of *Wedelia trilobata (L.) Hitchc.* *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 3(3), 43-51.
- Guettaf S., Abidli N., Kariche, S., Bellebcir L. et Bouriche H. (2016). Phytochemical screening and antioxidant activity of aqueous extract of *Genista Saharæ* (Coss. & Dur.). *Der Pharmacia Lettre* 8 (1):50-60.
- Guil-Guerrero J.L., López-Martínez J.C., Gómez-Mercado F.,Campra-Madrid P. (2006).Gamma-linolenic and stearidonic acids from Moroccan Boraginaceae. *European Journal of Lipid Science and Technology*:108, 43-47.
- Hadi M., 2004. La quercitine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; étude et application thérapeutiques. Thèse Doctoral Pharmaco chimie. Université Louis Pasteur, Paris. 155p.
- Hall A, M , Orlow S, J.(2005). Degradation of tyrosinase induced by phenylthiourea occurs following Golgi maturation. *Pigment Cell Research*:18, 122-129.
- Halliwell B., Whiteman M.(2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean.*British Journal of Pharmacology*, 142: 231-255.
- Hamann J.N., Herzigkeit B., Jurgeleit R., Tucek F (2016). Small-molecule models of tyrosinase : From ligand hydroxylation to catalytic monooxygenation of external substrates. *Coordination Chemistry Reviews*, 334: 1-13.
- Hamdan L. (2010). Rôle des médiateurs lipidiques dans la réaction inflammatoire chez le lapin.
- Harborne J. B., Williams C. A. (2000) advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 55 :481-504.

- Harrar A-E N. (2012). Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Mémoire de Magister enet physiologie expérimentale, Université de Ferhat Abbes, Sétif. p. 95.
- Hayouni E., Abedrabba M., Bouix M., Hamdi M. (2007). The effects of solvent and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quecus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts, *Food Chemistry*: 105: 1126-1134.
- Heim E. k., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 13: 572-584.
- Hellal M. (2007). Phtalazinones et 2,3-benzodiazépinones dérivées de l'azélastine : Synthèses et activités anti-cytokine. THESE Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Louis Pasteur (Strasbourg I). Discipline : Chimie Organique. 324p.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Skaltsounis, A.L., Bailleul, F. (2007). Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium peregrinum*. *Biochemical Systematics and Ecology* : 35: 624-626.
- Henrotin Y., Deby-Dupont G., Reginster J. Y. (2001). Les médiateurs biochimiques de l'inflammation. *Revue médicale de Liege*, 56(6), 433-42.
- Henzen, C. (2003). Traitement aux glucocorticoïdes: risques et effets secondaires. In *Schweiz Med Forum*. 19, 442-6
- Hesse M. (2002). *Alkaloids: Nature's curse or blessing?* Chichester, UK: Wiley-VCH.
- Hoffmann L. (2003). Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Thèse de Doctorat : Université de Louis Pasteur-Strasbourg 1.
- Hopkins, W. G. (2003). *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur, p 280.
- Hossain, M.A., Rahman, S.M.M., 2011. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International* 44, 672–676.
- Hraiech S., Brégeon F., Brunel J-M., Rolain J-M., Lepidi H., Andrieu V. (2012). Antibacterial efficacy of inhaled squalamine in a rat model of chronic *Pseudomonasaeruginosa* pneumonia. *Journal of Antimicrob Chemother*;67:2452–8.
- Hsu B., Coupar M.I., Ng, K. (2006). Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, *Hyphaene thebaica*. *Food Chemistry*, 98, 317–328.
- Hu S.G., Li L., He X.W. (2005). Solid-phase extraction of esculetin from the ash bark of chinese traditional medicine by using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, 1062:31-37.
- Huang M. H., Huang S. S., Wang B. S., Wu C. H., Sheu M. J., Hou W. C., Huang G. J. (2011). Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Cardiospermum halicacabum* and its reference compounds ex vivo and in vivo. *Journal of ethnopharmacology*, 133(2), 743-750.
- Imai K, Nakanishi I, Ohkubo K, Ohno A, Mizuno M, Fukuzumi S, Matsumoto K-I, Fukuhara K (2019). Synthesis and radical-scavenging activity of C-methylated fisetin analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* : 27(8) 1720-1727.
- Iwalewa, E. O., McGaw, L. J., Naidoo, V., & Eloff, J. N. (2007). Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology*, 6 (25).
- Jacoby GA., Munoz-Price LS. (2005). The new beta-lactamases. *New England Journal of Medicine* : 352:380–91.

- Jana S., Deb JK. (2006). Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology* :70:140–50.
- Jones, K. ; Hughes, J. ; Hong, M. ; Jia, Q. (2002) Orndorff, S. Modulation of melanogenesis by aloesin: a competitive inhibitor of tyrosinase. *Pigment Cell Research*:15, 335-340.
- Julian D., Dorothy D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* :74:417–33.
- Kandikattu K., Kumar P.B.R., Priya V.R, Kumar K.S, Singh R.B.R.(2013).Evaluation of anti-inflammatory activity of *canthium parviflorum* by in-vitro method. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology* 1(5), 729-730.
- Kandil F.E., Ahmed K.M., Hussieny H.A., Souliman A.M. (2000). A new flavonoid from *Limonium axillare*. *Archiv der Pharmazie. Pharmaceutical and Medicinal Chemistry*. 333, 275-277.
- Kanatt S.R., Chander R., Sharma A. (2007). Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chemistry*, 100, 451–458.
- Karoune S., Falleh H., Kechebar M.S.A., Halis Y., Mkadmini K., Belhamra M., Rahmoune C., Ksouri R.(2015). Evaluation of antioxidant activities of the edible and medicinal *Acacia albida* organs related to phenolic compounds. *Natural Product Research* : 29 (5), 452–454.
- Ketata A., Neifar A., Mihoubi W., Pigeon P., Gouzi H., Mallet J.M et al.(2017). The inhibition of tyrosinase by some aryl butenes: A desired activity or a side effect to avoid. *Journal of Organometallic Chemistry*, 848: 133-141.
- Khan M. S., Ahmad I. (2012). Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacol.*140(2):416-423.
- Khan M.T.H., Ather A., Thompson K.D. & Gambari R.(2005). Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. *Antiviral Research*: 67(2): 107-119.
- Khanbaba K. and Ree T.R. (2001). Tannins: Classification and Defenition. *Journal of Royal Society of Chemistry*, 18: 641-649.
- Khater F. (2011). Identification et validation fonctionnelle de nouveaux gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse des composés phénoliques. Thèse de Doctorat en Biochimie, Centre international d'études superieures en sciences agronomiques-Montpellier Supagro.p 203.
- Kim A., Nicolau D., Sutherland C.A, Kuti J. (2007). Optimal Dosing of Piperacillin- Tazobactam for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: Prolonged or Continuous Infusion?. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 27 (11): 1490-1497.
- Kim, Y.J., Uyama, H., 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 1707–1723.
- King A and Young G.(1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American dietetic association*, 99: 213-218.
- Klervi L.L. (2005). Connaissance chimiotaxonomique du genre *Turbinaria* et étude des composés de défense de différents espèces de Sargassacées des Iles Salmon (Pacific sud). 210p.
- Koechlin-Ramonatxo C.(2006). Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20: 165-177.
- Kohanski M.A., Dwyer D.J.Collins J.J., (2010). How antibiotics kill bacteria. *Journal of Microbiology*: 8: 423 – 435.
- Koppenol W.H. (2001).The Haber-Weiss cycle, 70 years later. *Redox Report* 6:229–34.

- Ksouri R., Ksouri W. M., Jallali I., Debez A., Magné C., Hiroko I., Abdelly C. (2011). Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Critical reviews in biotechnology*, 32(4), 289-326.
- Ksouri R., Megdiche W., Falleh H., Trabelsi N., Boulaaba M., Smaoui A., Abdelly C. (2008). Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Comptes Rendus Biologies* :331: 865- 873.
- Kubitzki K. (1993). Plumbaginaceae In K. Kubitzki, J.G. Rohwer and V. Bittrich, eds., *The Families and Genera of Vascular Plants*, vol II. Springer-Verlag, 523-530.
- Kubo I. and Kinst-Hori I. (1998) Tyrosinase inhibitors from anise oil. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1268–1271.
- Kukic J., Popovic V., Petrovic S., Mucaji P., C´Iric A., Stojkovic D., Sokovic M (2008). Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. *Journal of Food Chemistry*:107,861-868
- Kumar A., Ilavarasn T., Jayachandran M., Decaraman P., Aravindhan N., Padmanaban and M.R.V. Krishnan. (2009) .Phytochemical investigation on a tropical plant. *Pak. Journal of Nutrition*:8: 83-85.
- Kumari P., Kumari C., Singh P.S., (2017). Phytochemical screening of selected medicinal plants for secondary metabolites. *International Journal of Life Sciences Research* : 3, 1151-1157.
- Kundu J.K. and Surh Y. (2008). Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. *Cancer Letters*, 269(2): 243– 261.
- Lacy A. & O’Kennedy, R. (2004). Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer. *Current Pharmaceutical Design* 10, 3797-3811.
- Le K., Chiu F., Ng K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105, 353-363.
- Leboukh S (2011). Etude comparative entre la cinétique d’oxydation du phénol par la tyrosinase libre et immobilisée dans le gel d’alginate de calcium. Thèse de magister d’université : Sciences et Techniques de l’Environnement. Annaba : Université de Badji Mokhtar. Algérie. 92 p.
- Lee H-S (2002). Tyrosinase inhibitors of *Pulsatilla cernua* root-derived materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* :50, 1400-1403.
- Lehucher-Michel M. P., Lesgards J. F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M. (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. *Press Med.*, 30: 1076-1081.
- Li XZ., Nikaido H. (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* 69:1555–623.
- Li H.B., Wong C.C., Cheng K.W., Chen F. (2008). Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Lebens-Wisz Technologie* : 41, 385–390.
- Macheix J.J., Fleuriet A. & Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux un exemple de métabolites secondaires d’importance économique. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Collection Biologie, Lausanne. pp: 4-5, 192.
- Madhumitha G., Saral A M. (2011). Preliminary phytochemical analysis, antibacterial, antifungal and anticandidal activities of successive extracts of *Crossandra infundibuliformis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 4 (3):192-195.
- Maeda K. and Fukuda M. (1991) In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* : 42: 361–368

- Magdalene M., Del S., Clifford P.B., Charity, M.L.D. (2014) .Cytotoxic effect of Betel vine. piperbettleinn. Leaf extracts using *Artemia salina* leach (brine shrimp lethality assay). *Journal of Multidisciplinary Studies* :3,100-111.
- Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F, Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L, Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber J.T., and Monnet D.L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 3(18), 268-281.
- Manicone A. M., McGuire J. K. (2008). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. In *Seminars in cell & developmental biology*, 19,34-41.
- Marini E., Magi G., Mingoia M., Pugnali A., and Facinelli B. (2015). Antimicrobial and Anti-Virulence Activity of Capsaicin against Erythromycin-Resistant, Cell-Invasive Group A Streptococci. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1-7.
- Marfak A., (2003). Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec Les Radicaux issus des Alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de LIMOGES.p187.
- Marjorie E.E. (2007). Etude de la phytochimie et des activités antibactériennes et antifongiques de cinq plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel des dermatoses au Mali. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de Bamako. p.175.
- Martinez-Cayuela M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, 77: 147-161.
- Martone P., Estevez, J., Lu F., Ruel K., Denny M., Somerville C., Ralph J. (2009). Discovery of Lignin. *Current biology*, 19(2): 169–75.
- Matsubayashi T., Sakaeda T., Kita T., Nara M., Funasaka Y., Ichihashi, M.(2002). Pharmaceutical and clinical assessment of hydroquinone ointment prepared by extemporaneous nonsterile compounding. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* (1), 91-96.
- Mayol K., Cavalié F., & Davoust-Nataf N.(2013).Les médiateurs de l'inflammation. médecine/sciences : inflammation et réparation tendineuse, 21(2), 181-186.
- Mazouz W., Nour El Houda Haouli N.H., Gali L., Vezza T., Bensouici C., Mebrek S., Hamel T., Galvez, J., Djeddi S. (2020). Antioxidant, anti-alzheimer, anti-diabetic, and anti-inflammatory activities of the endemic halophyte *Limonium spathulatum* (Desf.) kuntze on LPS-stimulated RAW264 macrophages. *South African Journal of Botany*, 135, 101-108.
- McGaw L.J , Eloff J.N. (2005). Screening of 16 poisonous plants for antibacterial, anthelmintic and cytotoxic activity in vitro. *South African Journal of Botany*, 71(3 & 4), 302–306.
- Medini F., Fellah H., Ksouri R., Abdelly C. (2014). Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organic extracts of shoots of the plant *Limonium delicatulum*. *Journal of Taibah University for Science*. 8, 216–224.
- Medzhitov R. (2010). Inflammation: new adventures of an old flame. *Cell*, 140(6), 771-776.
- Meyer B.N., Ferrigni N. A. Putnam J.E., Jacobsen L. B. Nichols D. E., and Mclaughlin J. L. (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Journal of Medicinal Plant Research*, 45: 31-34.
- Middleton E., Kandaswami C., Thioharidies T. C.(2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer.*Pharmacological reviews*. 52: 673-751.

- Mosher A. M., Pathak M. A. and Fitzpatrick T. B., Eisen A. Z., Wolff K., Freedberg I. M. and Austern K. F. (1983): Mc-Graw-Hill, New York In: *Dermatology in General Medicine*, pp. 205–225.
- Mouffouk S., Mouffouk CH, Bensouici CH., Habaa H.(2020). *In vitro* cytotoxic effect, hemolytic and antioxidant activities of the Algerian species *Nonea vesicaria* Rchb. *Current Bioactive Compounds* 16(8).
- Mouffouk, C.; Mouffouk, S.; Dekkiche, S.; Hambaba, L.; Mouffouk, S. (2019).Antioxidant and antibacterial activities of the species *Silene inflata* Sm. *PSM Biological Research* :4, 74-86.
- Munteanu A.-C., & Uivarosi V. (2021). Ruthenium Complexes in the Fight against Pathogenic Microorganisms. *An Extensive Review. Pharmaceutics*, 13(6), 874.
- Najafi S.(2013). Phytochemical screening and antibacterial activity of leaf extract of *Ziziphus mauritiana* Lam. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*:4, 3274-3276.
- Narasimha Rao K and Venkatachalam S. R. (2000). Inhibition of Dihydrofolate Reductase and Cell Growth Activity by the Phenanthroindolizidine Alkaloids Pergularinine and Tylophorinidine: the In Vitro Cytotoxicity of These Plant Alkaloids and their Potential as Antimicrobial and Anticancer Agents. *Toxicology in Vitro* 14: 53-59.
- Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R., Krishina, D.R. (2001).Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33: 2–16.
- Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420,46-52
- Nauciel C. (2000). *Bactériologie medicale*. Masson (Ed). Paris, 275.
- Nauciel C., and Vildé J.L.(2009). *Bactériologie Médicale*. 2ème édition MASSON.
- Nerya O., Vaya J., Musa R., Izrael S.,Ben-Arie R.,Tamir S. (2003).Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,51, 1201–1207.
- Nicolas J., Florence C., Jean Th.(2001). *Immunologie clinique et allergologie*. Aspirine et AINS : intolérance et allergie. *John Libbey Eurotext*,55-58.
- Okombi S. (2005). Recherche et étude de molécules à activité antityrosinase et leur utilisation comme agents dépigmentants en dermocosmétique. Thèse de Doctorat, Université Joseph Fourier, Grenoble.
- Orliaguet, G., Gall, O., Benabess-Lambert, F., (2013). Steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs: An update. *Le Praticien en anesthésie réanimation* 17, 228-237.
- Ostrowski K., Rohde T., Asp S., Schjerling P.,Pedersen B. K. (1999). Pro-and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *The Journal of physiology*, 515(1), 287-291.
- Oussalah M., Caillet S.,Saucier., Lacroix M. (2007).Inhibitory effects of selected plant essential oils te groth of four pathogenec bacteria : E. coli O157:H7, Salmonella Typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. *Elsevier* ,8:414–420.
- Oyaizu, M.(1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition* 44, 307–315.

- Özyürek, M., Güngör, N., Baki, S., Güçlü, K., Apak, R. (2012). Development of a Silver Nanoparticle-Based Method for the Antioxidant Capacity Measurement of Polyphenols. *Analytical Chemistry* 84, 18, 8052-8059.
- Paganga G., Miller N., Rice-Evans C. A. (1999) The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. *Free Radical Research*: 30 : 62-153.
- Parekh J., Chanda SV. (2007). In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. *Turkish journal of biology*, 31:53-58.
- Parhi A., Kelley C., Kaul M., Pilch DS., LaVoie EJ. (2012). Antibacterial activity of substituted 5-methylbenzo[c]phenanthridinium derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* :22:7080-3.
- Paris M. & Hurabielle M. (1981). *Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome 1: généralités, monographies*. Ed. Masson, Paris.
- Peláez F. (2006). The historical delivery of antibiotics from microbial natural products-Can history repeat?. *Biochemical Pharmacology*, 71: 981-990.
- Pietta P.G., (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*., 63: 1035-1042.
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K. et Defraigne J.O. (2002). Physiological action of antioxidant defenses. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 16 : 233-239.
- Pisutthanan, S., Plianbangchang, P., Pisutthanan, N., Ruanruay, S., Muanrit, O., 2004. Brine shrimp lethality activity of Thai medicinal plants in the family Meliaceae. *Naresuan University Journal* : 12, 13-18.
- Prescott L., Harley J., Klein D. (2003). *Microbiologie*. De boeck (Ed). Bruxelles. 1135p.
- Quezel P., Santa S. (1963). *Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques Tome I et II*. Edition du centre national de la recherche scientifique, 125-129.
- Quincampoix J.C and Mainardi J.L. (2001). Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Réanimation*, 10: 267-75.
- Rahim A. A.; Rocca E.; Steinmetz J.; Kassim M.J.; Ibrahim M.S. and Osman H. (2008). Antioxidant activities of mangrove *Rhizophora apiculata* bark extracts. *Food Chemistry*, 107 : 200-207.
- Ramalingam R., Madhavi B.B., Nath A.R., Duganath N., Sri E.U., Banji D. (2010). *In vitro* anti-denaturation and antibacterial activities of *Zizyphus oenoplia*. *Der Pharmacia Lettre* 2 (1), 87-93.
- Rankin, J. A. (2004). Biological Mediators of Acute Inflammation. *AACN Clinical Issues: Advanced Practice in Acute and Critical Care*, 15(1), 3-17.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231-1237.
- Rescigno, A. ; Sollai, F. ; Pisu, B. ; Rinaldi, A. ; Sanjust, E. (2002). Tyrosinase inhibition: general and applied aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 17 (4), 207-218.
- Rezaire A. (2012). *Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien Oenocarpus batavia (patawa)*. Thèse de Doctorat en phytochimie, Université des Antilles et de la Guyane, École doctorale pluridisciplinaire : Santé, Environnement et Sociétés dans les Amériques. p.49.
- Rhen T., & Cidlowski J. A. (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids new mechanisms for old drugs. *New England Journal of Medicine*, 353(16), 1711-1723.

- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G.(1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Science 2(4), 152-159.
- Richter G. (1993). Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie. Ed.: Française, ISBN: 2-88074-231-5, pp: 317-339.
- Risser, A., Donovan, D., Heintzman, J., & Page, T. (2009). NSAID prescribing precautions. American family physician, 80(12), 1371-1378.
- Rizk, A.M. (1982). Constituents of Plants Growing in Qatar. Fitoterapia, 52, 35-42.
- Rodrigues M.J., Neves V., Martins A., Rauter A.P., Neng R.N., Nogueira J.M.F., Varela J., Barreira L., Custódio L. (2016). In vitro antioxidant and anti-inflammatory properties of *Limonium algarvense* flowers' infusions and decoctions: A comparison with green tea (*Camellia sinensis*). Food Chemistry 200, 322–329.
- Rodrigues M.J., Soszynski A., Martins A., Rauter A.P., Neng N.R., Nogueira J.M.F., Varela J., Barreira L., Custódio L. (2015). Unravelling the antioxidant potential and the phenolic composition of different anatomical organs of the marine halophyte *Limonium algarvense*. Industrial Crops and Products 77, 315–322.
- Rodríguez-López J. N., Tudela J., Varón R. and García-Cánovas F. (1991) Kinetic study on the effect of pH on the melanin biosynthesis pathway. Biochimica Biophysica Acta : 1076: 379–386.
- Roussel A.M. et Ferry M. (2002). Stress oxydant et vieillissement Oxidative stress. Nutrition and aging Nutrition clinique et metabolisme 16: 285–291.
- Roy U. B., & Vijayalaxmi K. K. (2013). Evaluation of cytotoxic activity of Piper betle Linn. using murine and human cell lines in vitro. International Journal of Scientific & Engineering Research, 4 (9), 221-233.
- Ruiz-Riaguas A., Zengin G., Sinan K I., Salazar-Mendías C., Llorent-Martínez E.J. (2020). Phenolic Profile, Antioxidant Activity, and Enzyme Inhibitory Properties of *Limonium delicatulum* (Girard) Kuntze and *Limonium quesadense* Erben. Journal of Chemistry, 2020, 1-10.
- Sabudak T., Demirkiran O., Ozturk M., Topçu G.(2013). Phenolic compounds from *Trifolium echinatum* Bieb. and investigation of their tyrosinase inhibitory and antioxidant activities. Phytochemistry 96, 305–311.
- Saci F., Bachir bey M., Louaileche H., Gali L., Bensouici C. (2019). Changes in anticholinesterase, antioxidant activities and related bioactive compounds of carob pulp (*Ceratonia siliqua* L.) during ripening stages. Journal of Food Measurement and Characterization 14 (2), 937-945.
- Salganik Rudolf I., M.D. et Ph.D. (2001). The Benefits and Hazards of Antioxidants: Controlling Apoptosis and Other Protective Mechanisms in Cancer Patients and the Human Population. Journal of the American College of Nutrition 5, 464–472.
- Sangeetha M, Kousalya M, Lavanya R, Cherukuru S, Chamundeeswari D, Uma Maheswara R. (2011). In-vitro Anti-inflammatory and Anti-arthritic Activity of Leaves of Cleodendron Inerme. RJPBCS Volume 2 (1): 822-827.
- Sanogo R., Diallo D., Diarra S., Ekoumon C., Bougoudougou F. (2006). Activité antibactérienne et antalgique des deux recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite au Mali. Mali Medical, 1 :18-24.
- Sawadogo, W., Lompo, M., Guissou, I., & Nacoulma, O. (2008). Dosage des triterpènes et stéroïdes de *Dicliptera verticillata* et évaluation de leur activité anti-inflammatoire topique. Médecine d'Afrique Noire, 55, 223-229.

- Scalbert, A., Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*: 130, 2073-2085.
- Schallreuter K. U. and Wood J. W. (1990) A possible mechanism of action for azelaic acid in the human epidermis. *Archives of Dermatological Research* :282: 168–171.
- Schrag M., Mueller C., Zabel M., Crofton A, Kirsch W.M., Ghribi O., Squitti R., and Perry G. (2013). Oxidative stress in blood in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A meta-analysis. *Neurobiology of Disease*, 59: 100–110.
- Seo B., Yun J., Lee S., Kim M., Hwang K., Kim J., Min K. R., Kim Y., Moon D. (1999). Barbarin as a new tyrosinase inhibitor from *Barbarea orthocerus*. *Planta Med.* 1999, 65, 683-686.
- Sereme A., Millogo-Rasolodimby J., Guinko S. et Nacro M. (2010). Anatomie et Concentration des tanins des plantes tannifères du Burkina. *Journal des Sciences* 10: 24-32.
- Serigne O., Alioune D F., Rokhaya G., Amadou D., Khady D., Ndeye D., Bara N., Yérim M D. (2015). Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* (Verbenacea). *International Journal of Biological and Chemical Sciences* : 9(3): 1263-1269.
- Serteyn D., Mouithys-Mickalad A., Franck T., Grulke S., Lamy M., Deby C. et Deby-Dupont G. (2002). La nature chimique et la réactivité de l'oxygène. *Annales de Médecine Veterinaire* 146.
- Sevanian A., Nordenbrand K., Kim E., Ernest L., Hochstein P. (1990). Microsomal lipid peroxidation: The role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. *Free Radical Biology and Medicine* : 8,145-152.
- Seyoum A., Asres K., El-Fiky F.K.(2006). Structure-radical scavenging activity relationships of Flavonoids. *Phytochemistry*, 67, 2058-2070.
- Shahidi F. (1997). *Natural antioxidants, chemistry, health effects and applications*. IL, USA: AOCS Press Champaign.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. et Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*: 1-26.
- Sher A. (2009). Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. *Gomal Journal of Medical Sciences* 7 (1) : 72-78.
- Shi H., Noguchi N., Niki E.(2001). Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. *Methods in Enzymology* 335, 157-166.
- Shimamura T., Wei-Hua Zhao W-H., and Hu Z-Q. (2007). Mechanism of Action and Potential for Use of Tea Catechin as an Anti-infective Agent. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*,6: 57-62.
- Sibilia, J. (2007). Comment définir et classer les maladies inflammatoires ? *Revue du rhumatisme*, 74(8), 714-725.
- Silva E. M., Souza J. N. S., Rogez H., Rees J. F., & Larondella Y. (2006). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, 101(3), 1012–1018.
- Silver L.L. (2011). Challenges of Antibacterial Discovery. *Clinical Microbiology Reviews*. 24 (1): 91-107.
- Singh B.A., Sharma R.(2016). Anti-inflammatory and antimicrobial effects of flavonoids from *Heliotropium ellipticum* exudate. *Current Bioactive Compounds*:12, 123-131.

- Singh C.B., Ningombam S., Nahakpam L., Laitonjam W.S. (2013). Antioxidant activities of the rhizomes of different Zingiberaceae plants of north-east India. *Asian Journal of Biological and Life sciences* :2, 19–22.
- Sivaraj R., Balakrishnan A., Thenmozhi M., Venkatesh R. (2011). Antimicrobial activity of aegle marmelos, *Ruta graveolens*, *Opuntia dellini*, *Euphorbia royleana* and *Europhorbia antiqorum*. *Journal of pharmacy research*, 4(5):1507-1508.
- Sokol-Letowska A., Oszmianski J., Wojdylo A. (2007). Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn pine and skullcap. *Food chemistry*, 103: 853-859.
- Souid A., Bellani L., Gabriele M., Pucci L., Smaoui A., Abdelly C., Ben Hamed K., Longo V. (2019). Phytochemical and Biological Activities in *Limonium* Species Collected in Different Biotopes of Tunisia. *Chem. Biodiversity*, 16, e1900216
- Springman AC., Lacher DW., Milton GWN., Milton N., Whittam T.S., Dele Davies H. (2009). Selection, recombination, and virulence gene diversity among group B streptococcal genotypes. *Journal of Bacteriology*: 191:5419–27.
- Spritz, R., Ho, L., Furumura, M., Hearing, V. J. (1997). Mutational analysis of copper binding by human tyrosinase. *Journal of Investigative Dermatology* 109, 207-212.
- Sultana B., Anwar F., Przybylski R. (2007). Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. *Food Chemistry*, 104(3), 1106-1114.
- Swapana N. Lokendrajit N. Warjeet S. Laitonjam C. Singh B. (2013). Antioxidant activities of the rhizomes of different Zingiberaceae plants of north-east India, *Asian J. Biol. Life Sci.* 2 19–22.
- Swingleton P., Sainsbury D. (2006). *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex. England. pp. 39.
- Tang X.H., Yan L.F., Gao J., Yang X.L., Xu Y.X., Ge H.Y., Yang H.D. (2012). Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from the root of *Limonium sinense* Kuntze. *International Journal of Biological Macromolecules* 51, 1134–1139.
- Tapas, A. R., Sakarkar, D. M. & Kakde, R. B. (2008). Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7 (3), 1089-1099.
- Tenover FC (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Medicine*: 119:62–70.
- Thati B., Noble A., Rowan R., Creaven S.B., Walsh M., Egan d., Kavanagh K. (2007). Mechanism of action of coumarin and silver coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Toxicology in vitro*, 21: 801-808.
- Topçu, G., Ay, A., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*: 103, 816–822.
- V Stankov, S. (2012). Definition of inflammation, causes of inflammation and possible anti-inflammatory strategies. *The open inflammation journal*, 5(1).
- ValKo M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M., Telser J. (2007). Free radical and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Biocell.*, 39: 44-84.
- Valko M., Morris H. et Cronin M.T.D. (2005). Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry* 12: 1161-1208.
- ValKo M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006). Free radical, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* : 160: 1-40.

- Vansant G.(2004).Radicaux libres et antioxydant : principe de base symposium. < Antioxydant et alimentation >. Institut Danone.
- Veireling W., Brand N., Gaedeke F., Sensch K.H., Scheneider E. and Scholz M.(2003). Investigation of the pharmaceutical and pharmacological equivalence of different hawthorn extracts. *Phytomedicine*, 10: 8-16.
- Veldhuizen E.,Tjeerdsma-Van Bokhoven C.,Zweijtzer S A., Haagsman H P.(2006).Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* :54:1874-1879.
- Walsh C. (2003). *Antibiotics: actions, origins, resistance*. ASM Press. Washington. p. 117.
- Wang J. and Mazza G.(2002).Effects of Anthocyanidins and Other Phenolic Compounds on the Production of Tumor Necrosis Factor α in LPS/IFN- γ -Activated RAW 264.7 Macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 50: 4183-4189.
- Wanyoike G.N., Chhabra S.C., Lang'at-Thoruwa C.C., and Omar S.A. (2004). Brine shrimp toxicity and antiplasmodial activity of five Kenyan medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 90: 129–133.
- Wei, Q., Ji, X.Y., Long, X.S., Li, Q.R., Yin, H.(2015).Chemical Constituents from leaves of “Chuju” *Chrysanthemum morifolium* and their antioxidant activities *in vitro*. *Journal of Chinese Medicinal Materials* 38(2), 305–310.
- Weill, B., Batteux, F. & Dhainaut, J. (2003). *Immunopathologie et réactions inflammatoires*. Eds, De Boeck Université (Paris), 12-23.
- Williams, L., O'Connar, A., Latore, L., Dennis, O., Ringer, S., Whittaker, J.A., Conrad, J., Vogler, B., Rosner, H., Kraus W. (2008) . The *in vitro* Anti-denaturation Effects Induced by Natural Products and Non-steroidal Compounds in Heat Treated (Immunogenic) Bovine Serum Albumin is Proposed as a Screening Assay for the Detection of Anti-inflammatory Compounds, without the use of Animals, in the Early Stages of the Drug Discovery Process. *West Indian Medical Journal* 57 (4), 327-331.
- Wollgast J., & Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* 33, 423 – 447.
- Wong S.P., Leong L.P., William Koh J.H. (2006).Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*. 99: 775-783.
- Wright G.D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57: 1451– 1470.
- Yefrida H.S, Alif A, Efdi M, Aziz H. (2018). Modification of Phenanthroline Method to determine Antioxidant Content in Tropical Fruits Methanolic Extract. *Research Journal of Chemistry and Environment*: 22 (4) : 28-35.
- Zengin G., Menghini L., Di Sotto A., Mancinelli R., Sisto F., Carradori S., Cesa S., Frascchetti C., Filippi A., Angiolella L., Locatelli M., Mannina L., Ingallina C., Puca V., D'AntonioM., Grande, R .(2018).Chromatographic analyses, *in vitro* biological activities, and cytotoxicity of *Cannabis sativa* L. essential oil: a multidisciplinary study. *Molecules* 23(12),: 1-26.
- Zerargui F. (2015). *Activité antioxydante des extraits de racines Tamus communis L. et caractérisation des substances bioactives*. Thèse de Doctorat en Biochimie, Université Ferhat Abbas, Sétif 1. p.169.
- Zhao H.,Eling D. J., Medrano E. E., Boissy R. E. (1996). Retroviral infection with human tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) cDNA upregulated tyrosinase activity and melanin synthesis in a TRP-1- deficient melanoma cell line.L. *Journal of Investigative Dermatology*, 106, 744-752.

Zhu, W.; Gao, J.(2008).The use of botanical extracts as topical skin-lightening agents for the improvement of skin pigmentation disorders.Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings ,13, 20-24.