

## LISTE DES ABBREVIATIONS

<b>A</b>	Absorbance
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>AGE</b>	<i>Advanced Glycation End</i>
<b>ANOVA</b>	<i>ANalysis Of VAriance</i>
<b>AP1</b>	<i>Activator Protein 1</i>
<b>APG</b>	Groupe de Phylogénie des Angiospermes (Angiosperm Phylogeny Group)
<b>BHA</b>	Tert-Butyl Hydroxy-Anisole
<b>BHQ</b>	Tert-Butyl Hydro-Quinone
<b>BHT</b>	Tert-Butyl Hydroxyl-Toluène
<b>CAM</b>	Médecine traditionnelle Complémentaire et Alternative
<b>CCl4</b>	Tétrachlorure de Carbone
<b>CD1</b>	Cluster de différenciation
<b>CID</b>	Dissociation induite par collision
<b>CMI</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>COX-2</b>	CycloOxygenase-2
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	Ion cuivrique
<b>CuZnSOD</b>	CuZn-Superoxyde Dismutase
<b>DAD</b>	Détecteur UV à Barrette de Diodes ( <i>Diode Array Detector</i> )
<b>DMEM</b>	Milieu de culture modifié de Dulbecco ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
<b>DMSO</b>	Diméthylsulphoxide
<b>DPPH</b>	2,2-DiPhenyl-1-PicrylHydrazyl
<b>E.R.A</b>	Espèces Réactives d'Azote
<b>E.R.O</b>	Espèces Réactives Oxygénées
<b>EDTA</b>	Ethylène Diamine TétraAcétique
<b>Ep</b>	Epaulement
<b>ESI</b>	Ionisation par électronébulisation ( <i>ElectroSpray Ionisation</i> )
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	Ion ferreux
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	Ion ferrique
<b>FeCl<sub>2</sub></b>	Chlorure de fer
<b>FeSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O</b>	Sulfate ferreux heptahydraté
<b>FLO<sup>•</sup></b>	Flavonoxyle
<b>FLOH</b>	Flavonoïdes
<b>FRAP</b>	Pouvoir Antioxydant Réducteur du Fer ferrique ( <i>Ferric Reducing Antioxydant Power</i> )
<b>GR</b>	Glutathion Réductase
<b>GSH</b>	Glutathion réduit
<b>GSH-Px</b>	Glutathion Peroxydase
<b>GSSG</b>	Glutathion Oxydé
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>HAT</b>	<i>Hydrogen-Atom Transfer</i>
<b>HBSS</b>	Solution Saline de Hank
<b>HCOOH</b>	Acide méthanoïque
<b>Hela</b>	adénocarcinome cervicale
<b>HepG2</b>	Carcinome de Hépatocellulaires
<b>HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup></b>	Chromatographie Liquide à Haute Performance Couplée à la Détection à la barrette de Diodes et à la Spectrométrie de Masse par Ionisation par Électrospray
<b>HRF</b>	<i>Heterocyclic Ring Fission</i>
<b>IC50</b>	Concentration Inhibitrice pour 50% de l'activité
<b>INK4</b>	Inhibiteur de cdk4
<b>iNOS</b>	Oxyde nitrique synthase
<b>INRF</b>	Institut national de recherche forestière
<b>INT</b>	IodoNitroTetrazolium chloride
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal Kinase
<b>K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]</b>	Ferricyanure de Potassium
<b>KIP</b>	<i>Kinase Inhibitor Protein</i>
<b>LC-MS</b>	Chromatographie en phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse
<b>LDL</b>	Lipoprotéine de Basse Densité
<b>m/z</b>	Rapport masse/charge
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
<b>MCF7</b>	Adénocarcinome de sein

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>MDA</b>	MalonDiAldéhyde
<b>MH</b>	Milieu Mueller Hinton
<b>M-H</b>	Ions Pseudo-Moléculaires en Mode Négatif
<b>n</b>	Nombre de réplcats
<b>NADP(H)</b>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
<b>NCI-H460</b>	<i>Non-small cell lung cancer</i>
<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxygène singulet
<b>O<sub>3</sub></b>	Ozone
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxynitrite
<b>ONOOH</b>	Acide peroxytrinitrique
<b>P38</b>	Voie de régulation de l'équilibre de l'autophagie et de l'apoptose,
<b>PBS</b>	Tampon Phosphate Salin
<b>PDA</b>	Barrette de Photodiodes ( <i>Photodiodes array</i> )
<b>PHGPx</b>	Glutathion hydroperoxyde phospholipidique peroxydase
<b>PLP2</b>	<i>Porcine Liver Cell Lines</i>
<b>Prxs</b>	Peroxyredoxines
<b>Q-TOF</b>	<i>Quadrupole Time-Of-Flight</i>
<b>RDA</b>	Réaction Rétro-Diels-Alder
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>RO</b>	Alcoxyles
<b>ROO</b>	Peroxyles
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
<b>RSV</b>	Virus Respiratoire Syncytial
<b>SBF</b>	Serum Bovine Fetale
<b>SET</b>	<i>Single-Electron Transfer</i>
<b>SOD</b>	SuperOxyde Dismutase
<b>SRB</b>	SulfoRhodamine B
<b>TNF</b>	Facteur de nécrose tumorale
<b>TBA</b>	Acide thiobarbiturique
<b>TBARS</b>	Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique
<b>TCA</b>	Acide trichloracétique
<b>TGI</b>	<i>Topway Global</i>
<b>TPTZ</b>	Tripyridyltriazine
<b>tr</b>	Temps de Rétention
<b>Tris</b>	Trishydroxyméthylaminométhane, ou 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol
<b>Trolox</b>	Acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique
<b>TSB</b>	<i>Tryptic Soy Broth</i>
<b>ua</b>	unités arbitraires
<b>UFC</b>	Unité Formant des Colonies
<b>U/mL</b>	Unité par millilitre
<b>UV-vis</b>	spectrophotomètre Ultraviolet-Visible
<b>VHB</b>	Virus de l'hépatite B
<b>VIH-1</b>	Virus de l'Immunodéficience Humaine type 1
<b>XO</b>	Xanthine Oxydase

## LISTE DES FIGURES

		Page
<b>Figure</b>	<b>1.</b> <i>Myrtus nivelii</i>	<b>8</b>
<b>Figure</b>	<b>2.</b> <i>Osyris quadripartita</i>	<b>8</b>
<b>Figure</b>	<b>3.</b> <i>Tetraclinis articulata</i>	<b>8</b>
<b>Figure</b>	<b>4.</b> Classes des polyphénols	<b>15</b>
<b>Figure</b>	<b>5.</b> Représentation des réductions successives de la molécule de dioxygène formant les différentes espèces réactives oxygénées (E.R.O )	<b>26</b>
<b>Figure</b>	<b>6.</b> Balance entre les antioxydants et les oxydants	<b>28</b>
<b>Figure</b>	<b>7.</b> Schéma montrant l'action du système de défense des antioxydants lors de la production des E.R.O par réactions enzymatiques	<b>30</b>
<b>Figure</b>	<b>8.</b> Structure de la quercétine montrant les principaux sites contribuant à l'activité de piégeage des radicaux libres par les flavonoïdes	<b>34</b>
<b>Figure</b>	<b>9.</b> Mécanisme de piégeage d'un radical par les flavonoïdes	<b>34</b>
<b>Figure</b>	<b>10.</b> Phases d'initiation, de propagation et de terminaison de la peroxydation lipidique	<b>36</b>
<b>Figure</b>	<b>11.</b> Neutralisation d'un lipide peroxyde par la quercétine	<b>36</b>
<b>Figure</b>	<b>12.</b> Neutralisation d'un lipide peroxyde par l' $\alpha$ -tocophérol et la régénération de ce dernier par la quercétine	<b>36</b>
<b>Figure</b>	<b>13.</b> Sites de liaisons des métaux aux flavonoïdes	<b>37</b>
<b>Figure</b>	<b>14.</b> Procédure de partage liquide-liquide	<b>47</b>
<b>Figure</b>	<b>15.</b> Description du mécanisme réactionnel entre le radical 2-2 Diphényl-1-picrylhydrozyl et un antioxydant (AH).	<b>52</b>
<b>Figure</b>	<b>16.</b> Description du mécanisme réactionnel intervenant entre le complexe ferricyanure ferrique Fe(III) et un antioxydant (AH)	<b>54</b>
<b>Figure</b>	<b>17.</b> Cinétique de blanchissement du $\beta$ -carotène à 490 nm en absence et en présence d'antioxydant	<b>55</b>
<b>Figure</b>	<b>18.</b> Structures de TBA et MDA et leurs réactions en milieux aqueux d'après Dahle <i>et al.</i> (1962)	<b>57</b>
<b>Figure</b>	<b>19.</b> Réactions chimiques impliquées dans la mesure de $\text{NO}_2^-$ en utilisant le système réactif de Griess	<b>58</b>
<b>Figure</b>	<b>20.</b> Domaine d'absorption des flavonoïdes dans le domaine UV-Visible	<b>71</b>
<b>Figure</b>	<b>21.</b> Profil chromatographique HPLC-DAD des composés phénoliques de la fraction d'acétate d'éthyle (a), fraction butanolique (b), extrait aqueux de <i>M. nivelii</i> enregistré à 280 et à 370 nm	<b>75</b>
<b>Figure</b>	<b>22.</b> Structures chimiques de différents composés phénoliques identifiés chez <i>M. nivelii</i>	<b>76</b>
<b>Figure</b>	<b>23.</b> Spectre de masse et fragmentation de l'ion digalloyl-HHDP-glucose identifié dans les extraits de <i>M. nivelli</i>	<b>77</b>
<b>Figure</b>	<b>24.</b> Profil chromatographique HPLC-DAD des composés phénoliques de la fraction d'acétate d'éthyle (a), butanolique (b), extrait aqueux (c) d' <i>O. quadripartita</i> enregistré à 280 et à 370 nm	<b>85</b>
<b>Figure</b>	<b>25.</b> Structures chimiques de différents composés phénoliques identifiés chez <i>O. quadripartita</i>	<b>86</b>
<b>Figure</b>	<b>26.</b> Spectre de masse et fragmentation de l'ion quercétine-3-O-rutinoside identifié dans les extraits d' <i>O. quadripartita</i> (ionisation du mode négatif )	<b>87</b>
<b>Figure</b>	<b>27.</b> Profil chromatographique HPLC-DAD des composés phénoliques de la fraction d'acétate d'éthyle (a), butanolique (b), extrait aqueux (c) de <i>T. articulata</i> enregistrée à 280 et à 370 nm	<b>95</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 28.</b>	Structures chimiques de différents composés phénoliques identifiés chez <i>T. articulata</i> .	<b>96</b>
<b>Figure 29.</b>	Spectre de masse et fragmentation de l'ion myricétine-3- <i>O</i> -rhamnoside identifié dans les extraits de <i>T. articulata</i>	<b>97</b>
<b>Figure 30.</b>	Teneurs en polyphénols totaux de l'extrait brut de <i>M. nivelii</i> et de ses fractions	<b>100</b>
<b>Figure 31.</b>	Teneurs en polyphénols totaux de l'extrait brut d' <i>O. quadripartita</i> et de ses fractions	<b>101</b>
<b>Figure 32.</b>	Teneurs en polyphénols totaux de l'extrait brut de <i>T. articulata</i> et de ses fractions	<b>102</b>
<b>Figure 33.</b>	Potentiel antioxydant des extraits de <i>M. nivelii</i>	<b>104</b>
<b>Figure 34.</b>	Potentiel antioxydant des extraits d' <i>O. quadripartita</i>	<b>106</b>
<b>Figure 35.</b>	Potentiel antioxydant des extraits de <i>T. articulata</i>	<b>107</b>
<b>Figure 36.</b>	Courbe d'étalonnage de l'inhibition de la production de NO par la dexaméthasone	<b>109</b>
<b>Figure 37.</b>	Inhibition de la production NO, induite par LPS par les extraits de <i>M. Nivelii</i>	<b>110</b>
<b>Figure 38.</b>	Inhibition de la production NO, induite par LPS par les extraits d' <i>O. quadripartita</i>	<b>111</b>
<b>Figure 39.</b>	Inhibition de la production NO, induite par LPS par les extraits de <i>T. articulata</i>	<b>112</b>
<b>Figure 40.</b>	Courbes d'étalonnage de l'inhibition des cellules lignées par l'ellipticine (a: contre Hela; b: HepG2; c: contre MCF-7; d: contre NCI-H60)	<b>114</b>
<b>Figure 41.</b>	Propriétés cytotoxiques des feuilles de <i>M. nivelii</i> vis à vis des lignées cellulaires humaines	<b>115</b>
<b>Figure 42.</b>	Propriétés cytotoxiques des feuilles d' <i>O. quadripartita</i> vis à vis des lignées cellulaires humaines	<b>116</b>
<b>Figure 43.</b>	Propriétés cytotoxiques des feuilles de <i>T. articulata</i> vis à vis des lignées cellulaires humaines	<b>117</b>
<b>Figure 44.</b>	Activité antibactérienne de <i>M. nivelii</i> vis-à-vis de dix souches bactériennes par la méthode de micro-dilution	<b>120</b>
<b>Figure 45.</b>	Activité antibactérienne d' <i>O. quadripartita</i> vis-à-vis de dix souches bactériennes par la méthode de micro-dilution	<b>121</b>
<b>Figure 46.</b>	Activité antibactérienne de <i>T. articulata</i> vis-à-vis de dix souches bactériennes par la méthode de micro-dilution	<b>123</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau</b>	<b>1.</b>	Classification botanique des espèces végétales étudiées	<b>8</b>
<b>Tableau</b>	<b>2.</b>	Principales classes des composés phénoliques non flavonoïdiques et leurs structures	<b>16</b>
<b>Tableau</b>	<b>3.</b>	Principales classes des flavonoïdes et leurs structures	<b>19</b>
<b>Tableau</b>	<b>4.</b>	Quelques activités biologiques de certains flavonoïdes et leurs mécanismes d'actions.	<b>22</b>
<b>Tableau</b>	<b>5.</b>	Espèces réactives oxygénées et azotées	<b>27</b>
<b>Tableau</b>	<b>6.</b>	Systèmes de défense antioxydants humains comprenant des antioxydants endogènes (enzymatiques et non enzymatiques) et exogènes	<b>31</b>
<b>Tableau</b>	<b>7.</b>	Solvants, réactifs, standards commerciaux et matériels divers utilisés	<b>44</b>
<b>Tableau</b>	<b>8.</b>	Conditions chromatographiques des composés phénoliques	<b>50</b>
<b>Tableau</b>	<b>9.</b>	Lignées de cellules humaines utilisées	<b>61</b>
<b>Tableau</b>	<b>10.</b>	Souches bactériennes utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne	<b>65</b>
<b>Tableau</b>	<b>11.</b>	Rendements d'extraction (%) selon les plantes et leurs fractions	<b>70</b>
<b>Tableau</b>	<b>12.</b>	Identification et quantification des composés phénoliques dans les feuilles de <i>M. nivelii</i>	<b>78</b>
<b>Tableau</b>	<b>13.</b>	Identification et quantification des composés phénoliques dans les feuilles d' <i>O. quadripartita</i>	<b>88</b>
<b>Tableau</b>	<b>14.</b>	Identification et quantification des composés phénoliques dans les feuilles de <i>T. articulata</i>	<b>98</b>
<b>Tableau</b>	<b>15.</b>	Activité antioxydants de différents extraits de trois plantes mesurée par quatre tests différents	<b>108</b>
<b>Tableau</b>	<b>16.</b>	Activité inhibitrice de la formation de NO	<b>113</b>
<b>Tableau</b>	<b>17.</b>	Propriétés cytotoxiques dans des lignées de cellules tumorales humaines et des cellules primaires de foie non tumorales	<b>118</b>
<b>Tableau</b>	<b>18.</b>	Activité antibactérienne des extraits des plantes vis-à-vis de dix souches bactériennes	<b>124</b>

# TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>I</b>
<b>RÉSUMÉ</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>IV</b>
<b>ملخص</b>	<b>V</b>
<b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES</b>	<b>VI</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>VIII</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>X</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>XII</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b>	<b>02</b>
<b>PARTIE 1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I. Plantes médicinales</b>	<b>06</b>
I.1. Plantes étudiées et classification botanique	07
I.1.1. <i>Myrtus nivelii</i> Batt & Trab. (Myrtacées)	08
I.1.1.1. Description botanique et habitat	08
I.1.1.2. Distribution géographique	09
I.1.1.3. Utilisations médicinales	09
I.1.1.4. Propriétés pharmaceutiques	09
I.1.1.5. Composition chimique	10
I.1.2. <i>Osyris quadripartita</i> Salzm. ex Decne (Santalaceae)	10
I.1.2.1. Description botanique et habitats	10
I.1.2.2. Répartition géographique	10
I.1.2.3. Utilisation traditionnelle et propriétés pharmaceutiques	10
I.1.2.4. Phytochimie	11
I.1.3. <i>Tetraclinis articulata</i> (Vahl.) Masters (Cupressaceae)	11
I.1.3.1. Description botanique et habitats	11
I.1.3.2. Répartition géographique	12
I.1.3.3. Utilisations traditionnelles	12
I.1.3.4. Propriétés pharmaceutiques	13
I.1.3.5. Phytochimie	13
I.2. Métabolites secondaires	13
<b>II. Antioxydants et radicaux libres</b>	<b>25</b>
II.1. Définition d'un radical libre	25
II.2. Défense de l'organisme contre les agressions radicalaires	25
II.3. Définition des antioxydants	27
II.4. Systèmes de défense antioxydants et mécanisme d'action	29
II.5. Système de défense exogène «antioxydants naturels»	30
II.6. Polyphénols comme antioxydant	32
II.7. Flavonoïdes comme antioxydants	32
II.7.1. Piégeage des radicaux libres	34
II.7.2. Inhibition de la peroxydation lipidique	34
II.7.3. Chélation des ions métalliques	37
II.7.4. Inhibition des enzymes	37
<b>III. Autre activités biologiques</b>	<b>38</b>
III.1. Activité anti-inflammatoire	38
III.1.1. Inflammation et agents inflammatoires	38
III.1.2. Agents anti-inflammatoires et mécanismes d'actions	39
III.2. Activité cytotoxique (anti-tumorale)	40
III.2.1. Cancer	40
III.2.2. Substances cytotoxiques et mécanisme d'actions	40
III.3. Activité antibactérienne	41

## TABLE DES MATIÈRES

III.3.1. Bactéries pathogènes	41
III.3.2. Agents antibactériens, classification et mécanismes d'action	42
<b>PARTIE II. MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	
I. Équipement, solvants, réactifs et standards utilisés	44
II. Matériel végétal: choix et identification des espèces étudiées	45
III. Composés bioactifs et la bio-activité des extraits des plantes	45
III.1. Préparation des extraits des plantes	45
III.1.1. Préparation de l'extrait aqueux par extraction sous reflux	46
III.1.2. Extraction de partage liquide-liquide	46
III.1.3. Détermination du rendement	47
III.2. Composés phénoliques	48
III.2.1. Principe	48
III.2.2. Méthodologie	48
III.3. Détermination des activités biologiques	50
III.3.1. Détermination de l'activité antioxydante	51
III.3.1.1. Préparation des extraits et détermination d'IC50	51
III.3.1.2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)	52
III.3.1.2.1. Principe de test DPPH	52
III.3.1.2.2. Méthodologie	53
III.3.1.3. Méthode de pouvoir antioxydant de réduction de fer (FRAP)	53
III.3.1.3.1. Principe	53
III.3.1.3.2. Méthodologie	54
III.3.1.4. Test de blanchissement du beta-carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique	55
III.3.1.4.1. Principe.	55
III.3.1.4.2. Méthodologie	55
III.3.1.5. Test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS)	56
III.3.1.5.1. Principe	56
III.3.1.5.2. Méthodologie	57
III.3.2. Activité anti-inflammatoire	57
III.3.2.1. Principe	57
III.3.2.2. Méthodologie	58
III.3.2.3. Détermination d'oxyde nitrique	59
III.3.3. Détermination de l'activité anti-tumorale	60
III.3.3.1. Principe	60
III.3.3.2. Méthodologie (Lignées de cellules cancéreuses et culture cellulaire)	61
III.3.4. Activité antibactérienne	64
III.3.4.1. Principe	64
III.3.4.2. Méthodologie	65
IV. Étude statistique	67
<b>PARTIE III. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS</b>	
I. Choix de la méthode d'extraction et le rendement en composés phénoliques	69
II. Étude de Profil phénoliques des extraits étudiés	70
II.1. Identification des composés phénoliques	70
II.1.1. <i>M. nivelii</i>	72
II.1.2. <i>O. quadripartita</i>	81
II.1.3. <i>T. articulata</i>	92
II.2. Quantification des composés phénoliques	99
II.2.1. <i>M. nivelii</i>	99
II.2.2. <i>O. quadripartita</i>	100

## TABLE DES MATIÈRES

II.2.3. <i>T. articulata</i>	101
III. Activité antioxyante	102
III.1. <i>M. nivellii</i>	102
III.2. <i>O. quadripartita</i>	104
III.3. <i>T. articulata</i>	106
IV. Activité Anti-inflammatoire	109
IV.1. <i>M. nivellii</i>	109
IV.2. <i>O. quadripartita</i>	110
IV.3. <i>T. articulata</i>	111
V. Activité cytotoxique	113
V.1. <i>M. nivellii</i>	114
V.2. <i>O. quadripartita</i>	115
V.3. <i>T. articulata</i>	116
VI. Activité antibactérienne	118
VI.1. <i>M. nivellii</i>	119
VI.2. <i>O. quadripartita</i>	120
VI.3. <i>T. articulata</i>	121
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>125</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>129</b>

# INTRODUCTION

---

## GÉNÉRALE

L'utilisation des plantes médicinales dans ces dernières décennies est devenue une source de traitement pour diverses pathologies. Selon l'organisation mondiale de la santé, 80% de la population dans certains pays d'Afrique ont recours aux plantes médicinales (la phytothérapie) (OMS, 2002). De nos jours, plusieurs études ont été effectuées et sont en cours pour non seulement la recherche de nouveaux principes actifs et la compréhension de leurs modes d'action mais aussi pour connaître leurs propriétés biologiques afin de les utiliser comme un traitement de plusieurs maladies tels que les cancers, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires et le VIH/SIDA, ce qui constitue un challenge important pour les scientifiques. Les plantes peuvent produire un grand nombre de métabolites secondaires (Fraga, 2007), parmi lesquels les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques (Bruneton, 1995; Halliwell, 2006). Ces dernières molécules, principalement les flavonoïdes, les acides phénoliques, les lignanes, les tanins et les stilbènes sont très fréquentes dans les différentes parties végétales et largement exploitées et utilisées dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques (Bruneton, 1995; Halliwell, 2000; Merzouki *et al.*, 2000), mais ils sont également présents dans les herbes médicinales (Pacífico *et al.*, 2015).

Les polyphénols sont largement étudiés dans le domaine médicamenteux, où ils sont connus pour leurs activités biologiques, telles que les activités antioxydantes (Halliwell, 2008), anti-inflammatoires (Guo *et al.*, 2014) et antifongiques (Martins *et al.*, 2015). Ils ont également des effets positifs sur l'obésité (Wang, Moustaid-Moussa *et al.*, 2014), le diabète (Soto *et al.*, 2003) et le cancer (Carocho et Ferreira, 2013a). Les flavonoïdes, en particulier, dans leur activité antioxydante, jouent un rôle d'inhibiteurs forts contre le stress oxydatif, ils contribuent ainsi au piégeage des espèces réactives d'oxygène (ROS) (Carocho et Ferreira, 2013b), en empêchant les effets d'oxydation par l'activation du système de défense antioxydant endogène (Martins *et al.*, 2016).

Les polyphénols ont aussi un effet antimutagène par une forte inhibition de l'oxydation d'ADN (Lodovici *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2007; Azqueta et Collins, 2016). Par conséquent, la capacité anti-tumorale de ces substances est liée à l'induction de l'apoptose, à la suppression de l'activité tyrosine kinase, à l'anti-prolifération, à l'anti-métastase et aux effets anti-angiogénèses (Moein, 2015). En outre, ces composés (les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins) isolés de différentes sources de plantes sont capables d'inhiber le processus d'inflammation *in vivo* et *in vitro*. Ils inhibent diverses bactéries pathogènes, et possèdent

également des activités antifongiques (**Kanadaswami *et al.*, 2005; Barros *et al.*, 2010; Serafini *et al.*, 2010; Cushnie et Lamb, 2011; Carocho et Ferreira, 2013b; Martins *et al.*, 2015**). Ces activités biologiques peuvent également avoir des effets bénéfiques sur la santé.

Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour étudier les autres activités biologiques des composés antioxydants individuels de ces plantes, des effets synergiques potentiels entre les composants antioxydants, les mécanismes moléculaires impliqués dans leurs bio-activités et leurs effets toxiques possibles. Les substances naturelles, d'origine végétale, demeurent toujours un domaine essentiel comme source naturelle pour identifier de nouveaux métabolites secondaires aux activités peu ou pas explorées et qui entrent dans le développement et la fabrication de nouveaux médicaments.

Afin de rechercher de nouvelles molécules potentiellement antioxydantes, nous avons entrepris, dans le cadre de cette thèse, d'identifier des composés phénoliques ayant des activités antioxydantes, antibactériennes, anti-inflammatoires et qui peuvent induire aussi la cytotoxicité des cellules tumorales à partir des extraits polaires des plantes de trois grandes familles, largement répandues en Algérie et qui ont fait l'objet de recherche majoritairement dans le domaine de leurs huiles essentielles.

Plus précisément, l'objectif de cette étude est d'étudier les effets antioxydants *in vitro* des extraits aqueux et ses fractions organiques d'*Osyris quadripartita*, *Myrtus nivelii* et *Tetraclinis articulata*. En Algérie, ces plantes sont très utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement de diverses maladies.

Les propriétés antioxydantes des extraits de plantes ne peuvent être évaluées par une seule méthode, en raison de la nature complexe des produits phytochimiques. C'est pourquoi, deux méthodes ou plus devraient toujours être utilisées pour évaluer les effets antioxydants des plantes et, par conséquent, de nombreux essais complémentaires ont été appliqués dans notre étude pour tester les activités biologiques en plus de l'activité antioxydante (cytotoxiques, anti-inflammatoires et antibactériennes).

Le premier chapitre de cette thèse est consacré à l'étude bibliographique de ces trois espèces à savoir: myrte, *osyris* et thuya de Berbérie. On y a inséré une description botanique de chacune de ces plantes et une présentation détaillée de la phytochimie rapportée dans la littérature scientifique. L'utilisation en médecine traditionnelle ainsi que leurs propriétés thérapeutiques y sont aussi décrites. Ce chapitre présente également des définitions pour les composés phénoliques, leur classification, leurs structures chimiques et leurs propriétés

biologiques ainsi qu'une étude bibliographique des antioxydants, anti-inflammatoires, antibactériennes et anti-tumorales.

Le deuxième chapitre de ce manuscrit est consacré à la description du matériel utilisé et des techniques réalisées dans ce travail indiquant une description détaillée des techniques employées à ce jour pour l'extraction ainsi que la détection des substances des extraits par l'analyse chromatographique liquide à haute performance couplée à un détecteur ultra-violet et à un spectromètre de masse (HPLC-UV-MS), ce qui permet une séparation à l'échelle semi-préparative, une identification et à une quantification en ligne des molécules séparées ainsi qu'une présentation des différents tests pour l'estimation de diverses activités biologiques.

Le troisième chapitre présente les résultats obtenus par spectrométrie de masse des molécules majoritaires de l'extrait aqueux et des fractions organiques, ainsi que ceux obtenus sur des systèmes *in vitro* (propriétés antioxydante, anti-inflammatoire, anti-tumorale et antibactérienne).

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

### **Hypothèse de la thèse.**

L'hypothèse est que les extraits de végétaux sélectionnés, *Myrtus nivellii*, *Osyris quadripartita* et *Tetraclinis articulata* sont une source naturelle à la fois de molécules antioxydantes très efficaces et de molécules antimicrobiennes, anti-tumorales et anti-inflammatoires, lesquelles conviennent aussi comme additifs alimentaires naturels.

### **Les objectifs de l'étude.**

Les objectifs de l'étude sont les suivants:

-déterminer la capacité anti-radicalaire des extraits de plantes et évaluer leurs effets anti-inflammatoires, anti-tumoraux et antibactériens *in vitro*.

-caractériser le profil des composés phénoliques des extraits de plantes en utilisant la technique de la chromatographie liquide-spectrométrie de masse (LC-MS) , tout en étudiant sa relation avec l'activité antioxydante.

Partie I.

---

## SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

## I. Les plantes médicinales

Le terme d'une plante médicinale (PM) désigne une plante ou une partie d'une plante possédant des substances appelées principes actifs, pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques sans effets nocifs en respectant les doses recommandées (**Didier *et al.*, 2011**).

Ces principes actifs peuvent être des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles c'est-à-dire possédant des effets qui se rapportent à la santé, ou ont été prouvés utiles comme médicaments selon les normes occidentales, ou qui contiennent des constituants qui sont utilisés comme médicaments (**Máthé, 2015; Bureau, 2016**).

Dans le monde, l'intérêt pour la médecine traditionnelle s'accroît constamment (**Didier *et al.*, 2011**). En Afrique, la pratique de cette médecine traditionnelle nécessite toujours des améliorations considérables comparativement à la médecine traditionnelle de l'Inde ou à celle de la Chine. En raison de motifs économiques, le traitement par des PMs est de plus en plus important pour 80% de la population africaine (**Sofowora, 2000**). Parmi leurs principes actifs naturels les plus courants, on peut nommer les polyphénols (**Bahri *et al.*, 2017**), les terpénoïdes (**Hennebelle *et al.*, 2007; Dhar *et al.*, 2017**), les stéroïdes, les alcaloïdes (**Seabrooks et Hu, 2017**), les vitamines (A, C, E et K) (**Shikov *et al.*, 2014; Turhan et Bör, 2016**), les caroténoïdes (**Cueto *et al.*, 2017**), les tanins (**Huang *et al.*, 2017**), les saponines (**Singh et Kaur, 2018**), les pigments (**Kumara *et al.*, 2017**) et les minéraux (**Velander *et al.*, 2017**) qui possèdent diverses activités biologiques. Plus de 200 000 espèces végétales sur 350 000 recensées de nos jours sur l'ensemble de notre planète vivent dans les pays tropicaux d'Afrique (**Dhami et Mishra, 2015**), 80 000 espèces végétales sont utilisées dans la pratique de médecine traditionnelle partout dans le monde (**Singh et Zhao, 2017**). Parmi les utilisateurs potentiels de ces plantes, la médecine et la pharmacopée traditionnelles viennent en tête. Les PM ont été utilisées sous diverses formes depuis l'aube de l'humanité. Elles ont maintenu leur rôle traditionnel curatif même dans les sociétés modernes (**Tripathy *et al.*, 2015**). Pour l'utilisation dans l'industrie, elles sont consommées de manière intensive en tant que compléments alimentaires (additifs alimentaires) et même dans l'élevage, où les additifs alimentaires sont utilisés pour remplacer les produits synthétiques (**Bureau, 2016; Jokar *et al.*, 2017**). Il est important de noter que les PM et leurs ingrédients chimiques peuvent servir de matériaux de départ et/ou de modèle pour la recherche pharmaceutique et la production de médicaments (**Heywood, 2011**). Les domaines d'utilisation actuels constituent des moteurs puissants de l'exploitation de ces ressources naturelles. Les PM sont devenues des produits

industriels avec de nouveaux concepts comme la phytothérapie (**Dhar et al., 2017**), les usages médicaux vétérinaires (**Shang et al., 2012; Chapman et al., 2017**), l'aromathérapie (**Ali et al., 2015; Roosta et al., 2017**), les nutraceutiques (**Bureau, 2016**), la cosmétique (**Tareau et al., 2017**) et les utilisations du bien-être animal en élargissent la portée de l'utilisation (**Máthé, 2015**).

Dans les pays industrialisés, les adaptations de la médecine traditionnelle sont appelées "complémentaire" ou "alternative" (CAM) et sont utilisées jusqu'à 65% de la population. Cette CAM a maintenu sa popularité et sa propagation est rapide dans les pays industrialisés (**Barnes et al., 2004; Barnes et al., 2008; OMS, 2013**). Dans le cadre d'une approche fondée sur des données scientifiques, l'utilisation des PM à des fins de traitement et de prévention des maladies est appelée la phytothérapie (rationnelle). Cette approche contraste avec la pratique de l'herboristerie médicale traditionnelle qui utilise des herbes médicinales et principalement sur la base de leur utilisations empiriques et traditionnelles (**Barnes et al., 2008**). La phytothérapie (à base de PM) implique l'utilisation de matériaux végétaux séchés (fleur, feuille, tige, racine) ou d'extraits de parties végétales (décoction, infusion, macération, distillat, huile essentielle) à doses thérapeutiques pour traiter les symptômes exposés (**Wiesner et Knöss, 2017**). À cet égard, elle est similaire à la médecine conventionnelle (**Barnes et al., 2008; Chabosseau et Derbré, 2016**). En Algérie, il existe de nombreuses plantes médicinales décrites pour le traitement de nombreuses maladies. La phytothérapie est considérée comme une partie intégrante de la culture algérienne et joue un rôle central et indispensable dans les soins de santé publics actuels (**Bouzabata, 2016**). Les régions désertiques et montagneuses de l'Algérie sont couvertes de plus de 626 espèces de PM et aromatiques qui sont connues pour leurs utilisations comme PM ou pesticides botaniques (**Feliachi, 2006; Bessah et Benyoussef, 2015**).

Les espèces étudiées dans le cadre de ce travail font parties de trois grandes familles différentes et sont très utilisées en médecine traditionnelle. De plus, selon nos connaissances et à la suite d'une recherche bibliographique il n'y a aucune étude liée à la composition phénolique de ces espèces et très peu des travaux concernant leurs activités biologiques.

### I.1. Plantes étudiées et classification botanique

Afin de classer la famille des *Myrtaceae* et celle des *Osyraceae* nous nous sommes basés sur la classification botanique des angiospermes appelée Angiosperms Phylogeny Group III datant 2009 (APG III) (**Bremer, 2009**), qui est une modification de la classification APG II de

2003, alors que *Tetraclinis articulata* est classé selon Spichiger *et al.* (2002) (**Tableau 1**).

**Tableau 1.** Classification botanique des espèces végétales étudiées

Taxonomie	<i>M. nivelii</i>	<i>O. quadripartita</i>	<i>T. articulata</i>
Règne	Plantae (végétal)		
Embranchement	Spermatophytes (phanérogames)		
Sous-embranchement	Angiospermes		Gymnospermes
Classe	Eu-dicotylédones		Pinophyta (Coniferophyta)
Sous-classe	Rosidées		Pinopsida
Super-ordre	Eurosidées II ou Malvidées		Pinidae
Ordre	Myrtales	Santalales	Pinales
Famille	Myrtaceae	Santalaceae	Cupressaceae
Genre	<i>Myrtus</i>	<i>Osyris</i>	<i>Tetraclinis</i>
Espèce	<i>Myrtus nivelii</i> Batt & Trab.	<i>Osyris quadripartita</i> Salzm. ex Decne	<i>Tetraclinis articulata</i> (Vahl.) Master
Synonyme		<i>Osyris lanceolata</i> Hochst	<i>Callitris quadrivalis</i>
Nom commun			
- arabe	Tafetest, rihan el Sahra	Madjdad	Aar-aar
- français	Myrte du Sahara	Bois de santal africain	Thuya d'Afrique du Nord, thuya de Berbérie, thuya d'Algérie.
- anglais	Saharan myrtle	African sandalwood	Sandarac gum, barbary thuja
			

**Figure 1.** *Myrtus nivelii*

**Figure 2.** *Osyris quadripartita*

**Figure 3.** *Tetraclinis articulata*

### I.1.1. *Myrtus nivelii* Batt & Trab. (Myrtacées)

#### I.1.1.1. Description botanique et habitat

En Algérie, il existe deux espèces caractéristiques de Myrte:

-*Myrtus communis*, l'espèce la plus connue et commune de la région méditerranéenne, est plus abondante dans le nord de l'Algérie.

-*Myrtus nivelii* se trouve dans le désert, dans le sud de l'Algérie, beaucoup moins exploitée.

Le nom commun de cette espèce est le myrte du sahara, Rihan Esahraa en arabe et Tafeldest ou Tafaltasset en Tamahaq «Targui», c'est un grand arbrisseau qui peut atteindre jusqu'à 150 cm de hauteur et à feuilles persistantes. Elles sont linéaires, opposées, lancéolées 6-8 fois plus longues que larges, sessiles avec une nervure qui donnent une agréable odeur, dégageant les huiles essentielles. Les fleurs sont isolées à l'aisselle des feuilles. L'ovaire est infère en cône renversé surmonté de cinq dents courtes, de cinq pétales blancs et de

nombreuses étamines et deux styles. Les fruits en baies sont globuleux bleus noirs de 1 cm de diamètre.

Il n'existe aucune période précise de floraison car elle est en fleurs à différentes périodes de l'année (**Figure 1**) (**Ozenda, 1958; Quezel et Santa, 1963; Polunin et Huxley, 1971; Sahki et Sahki, 2004**).

#### **I.1.1.2. Distribution géographique**

La plante est endémique des montagnes (en altitude au-dessus de 1500 à 2000 m) du Sahara central, où elle est assez répandue dans le Hoggar, le Tassili de n'Ajjer en Algérie (**Polunin et Huxley, 1971; Sahki et Sahki, 2004**) ainsi que les montagnes du Tibesti (massif de Tibesti, Borkou) Tchadien. Cette plante se trouve dans les valls «Oueds» au-dessus de 1000 m sur un sol gravier et dans des sites rocheux (**Sahki et Sahki, 2004**). Selon le critère de l'IUCN, cette espèce est classée dans la catégorie «EN» et située comme espèce en voie de disparition (**Hammiche et Maiza, 2006**).

#### **I.1.1.3. Utilisations médicinales**

Dans la médecine traditionnelle cette plante est très connue au sud algérien pour ses propriétés thérapeutiques. Les feuilles prélevées durant toute l'année sont préparées comme décoction et prises par voie orale pour les problèmes hépatiques, contre les troubles gastro-intestinaux, diarrhée, fièvre, diabète, infections respiratoires, rhumatismes, allergies (**Hammiche et Maiza, 2006; Ramdane et al., 2015**). En utilisation externe, les feuilles écrasées ajoutées à l'huile ou au beurre fondu sont utilisées comme pommade (cataplasme) qui est recommandé dans le traitement de la dermatose et pour les soins des cheveux (**Hammiche et Maiza, 2006**). Dans la région de Tassili, l'utilisation habituelle du myrte est une décoction d'une poignée de feuilles mélangées au lait de chèvre et chauffées au charbon de bois. L'infusion des feuilles est également employée contre la blennorrhée (**Sahki et Sahki, 2004**). Les baies de genre *Myrtus* sont utilisées comme remède pour les aphtes de la sphère bucco-dentaire (**Touaibia et al., 2014**).

#### **I.1.1.4. Propriétés pharmaceutiques**

Plusieurs études ont montré leurs vertus pharmaceutiques. Ainsi, les huiles essentielles de *M. nivelii* démontrent une bonne activité antifongique contre toutes les souches étudiées comme *Cryptococcus neoformans* qui est le facteur majeur des méningites et les méningo-encéphalites. Cette huile présente également une inhibition contre les dermatophytes. L'activité d'inhibition de cytotoxicité dans une lignée cellulaire des cellules de kératinocytes

(HaCaT) (la cytotoxicité de la peau) est également prouvée par Bouzabata, (2013). L'activité antioxydante de l'extrait aqueux de *Myrtus nivelii* étudiée par Rached *et al.*, 2010 et Touaibia Chaouch, (2014), ainsi l'activité antimicrobienne contre plusieurs souches bactériennes responsables de plusieurs maladies et l'activité anti-inflammatoire testée *in vivo* sur des souris de l'extrait méthanolique ont été illustrées (Touaibia et Chaouch, 2015; 2017).

#### **I.1.1.5. Composition chimique**

Ces bio-activités sont corrélées avec la présence de composés polyphénoliques, comme les flavonoïdes dans l'extrait aqueux des feuilles et les tanins dans l'extrait de méthanol (Rached *et al.*, 2010; Touaibia et Chaouchi, 2014; 2015). Les huiles essentielles des parties aériennes étudiées par Bouzabata *et al.* (2013) ont montré la présence de monoterpènes tel que 1,8-Cineole et limonène qui sont des produits majeurs et d'autres différents monoterpènes oxygénés représentés par géranyl acétate,  $\alpha$ -terpinéol; linalyl acétate,  $\alpha$ -terpinyl acétate et deux nouveaux composés naturels qui possèdent une structure cyclopentène qui sont probablement des substances marqueurs de l'espèce.

#### **I.1.2. *Osyris quadripartita* Salzm. ex Decne (Santalaceae)**

##### **I.1.2.1. Description botanique et habitats**

Cette espèce est un arbuste dioïque héli-parasitique de 2-5 m, à feuilles lancéolées aigues, (0.5-4×0.5-2 cm). Les fruits murs sont produits tout au long de l'année, avec une hausse importante en hiver et mineure au printemps. Ce sont des drupes rouges globuleuses de 6-8 mm (Figure 2) (Quezel et Santa, 1963; Singh *et al.*, 2005). La période de floraison dure presque six mois pour les femelles et presque toute l'année pour les mâles.

##### **I.1.2.2. Répartition géographique**

Cette plante se localise en Méditerranée, dans les régions tropicales, chaudes et arides, s'étendant généralement du sud de l'Europe (Portugal et Espagne «des îles Canaries»), nord-ouest et sud du l'Afrique, Australie, par l'intermédiaire de l'Arabie Saudi, du sous-continent indien, de la Chine, du Myanmar, Thaïlande et Laos (Quezel and Santa, 1963; Fern *et al.*, 2016).

##### **I.1.2.3. Utilisation traditionnelle et propriétés pharmaceutiques**

Les racines de l'*O. quadripartita* sont utilisées dans le traitement du cancer. L'infusion de feuilles a des propriétés émétiques (Chhabra *et al.*, 1991; Kunwar et Adhikari, 2005). Généralement, le genre *Osyris* est largement utilisé dans la médecine traditionnelle comme

agents anti-diarrhées, anti-paludismes et antifongiques et pour traiter les maladies du rein et le cancer (Chhabra *et al.*, 1991; Girma *et al.*, 2015; Masevhe *et al.*, 2015).

Les activités antibactériennes, antifongiques, antioxydantes et antipaludiques ont été précédemment décrites (Taddese *et al.*, 2003, Geyid *et al.*, 2005, Rached *et al.*, 2010). La propriété anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique de cette espèce a été démontrée en réduisant efficacement la perméabilité capillaire accrue induite chez les rats par divers médiateurs chimiques (Gómez *et al.*, 1995).

#### I.1.2.4. Phytochimie

Il existe très peu de littérature sur la composition phytochimique dans cette espèce. Néanmoins, Yeboah *et al.* (2010) et Yeboah et Majinda (2013) ont signalé la présence des sesquiterpènes dihydroagarofuranes et des triterpènes. Rached *et al.* (2010) ont mis en évidence la présence des flavonoïdes. D'autres espèces d'*Osyris* ont fait l'objet d'une enquête concernant leur caractérisation chimique, soulignant la présence de flavonoïdes glycosylés (kaempférol-3-*O*-rutinoside) dans *O. alba* et sesquiterpènes dans *O. tenuifolia*. D'autres études phytochimiques sur le genre *Osyris* ont montré la présence des dérivés d'hexyle et d'hexényle, des acides phénoliques, des flavonoïdes, des alcaloïdes de pyrrolizidine et de quinolizidine, des hydrocarbures à longue chaîne et des acides gras, des triterpènes, des sesquiterpènes dihydro- $\beta$ -agarofuran, des phényl propanoïdes phénoliques et des lignanes (Gómez *et al.*, 1995; Al-Jaber *et al.*, 2010; Shyaula *et al.*, 2011).

#### I.1.3. *Tetraclinis articulata* (Vahl.) Masters (Cupressaceae)

##### I.1.3.1. Description botanique et habitats

*T. articulata* (Vahl.) Masters, seule espèce qui représente la tribu de Tetraclinées. C'est un arbre ou arbuste persistant qui peut atteindre 15 m de haut et un mètre de diamètre, à la couronne large et à l'écorce brun grisâtre. Les feuilles imbriquées sur 4 rangs sont squamiformes. Les feuilles des jeunes sujets sont des aiguilles bleutées de 1-2cm de longueur, une paire de feuilles larges alterne avec une paire de feuilles étroites. L'extrémité des feuilles est en forme d'écaille triangulaire et luisante. Les cônes fructifères quadrangulaires de diamètre de 10 à 12 mm sont solitaires et terminaux, bruns, avec 4 écailles ligneuses, triangulaires, avec des graines ailées. Les rameaux sont dressés et minces. Les petites branches sont plates, vertes, articulées selon la disposition des feuilles. Elles sont minces, flexibles, cassantes aux articulations formées entre les feuilles. Les fleurs mâles sont groupées



en chatons à l'extrémité des rameaux courts; les fleurs femelles sont groupées sur des rameaux latéraux. Le fruit, sensiblement globuleux, est constitué de quatre écailles ligneuses en forme de cœur, de 1 à 2cm de diamètre. La graine est petite, avec des poches de résine et deux ailes latérales. Le tronc est droit, l'écorce gris clair, plus sombre avec l'âge et fendillée longitudinalement. Le système racinaire est développé et puissant. Le feuillage permanent fleurit en automne et la graine est mature au printemps de l'année suivante. La dissémination se fait de septembre à octobre (**Seigue, 1985**). Cette espèce est peu exigeante, mais paraît cependant préférer les calcaires, les argiles, les sables meubles et les rochers siliceux. Elle aime l'exposition chaude sur les basses montagnes, du niveau de la mer à 1800 m (**Figure 3**)(**Quezel et Santa, 1963; Polunin et Huxley, 1971; Seigue, 1985**).

### **I.1.3.2. Répartition géographique**

C'est une espèce communément connue sous le nom de gomme de genévrier, de gomme de sandarac ou de thuya. C'est un arbre ou un arbuste endémique des régions montagneuses de l'hémisphère nord de l'Afrique du Nord qui se trouve au Maroc, en Algérie et en Tunisie, se trouvant également dans d'autres parties d'Europe comme Malte (Italie) et près de Carthagène (Espagne). C'est une espèce de lumière, bien adaptée à son milieu, elle couvre de grandes superficies parfois et elle pousse tantôt à l'état pur (les plus importants peuplements se trouvant en Oranie), tantôt en mélange avec le chêne-vert, le chêne-liège, le genévrier de Phénicie, le pin d'Alep et l'arganier (**Quezel et Santa, 1963; Polunin et Huxley, 1971**).

### **I.1.3.3. Utilisations traditionnelles**

Le Thuya de Berberie est réputé dans la médecine traditionnelle dans les populations locales maghrébines. Les différentes parties de l'arbre, principalement les feuilles et les rameaux, sont utilisées dans le traitement des infections intestinales et respiratoires (**Bellakhdar et al., 1991**) et aussi comme hypoglycémiantes et hypotensives (**Ziyyat et al., 1997; Bnouham et al., 2002**). Toutes les parties des plantes sont utilisées pour les maladies de la peau, y compris le prurit, les parasitoses, les mycoses, les piqûres d'insectes et la pathologie de la sphère bucco-dentaire (maux de dents, prévention des épidémies) (**Bellakhdar, 1997; Bourkhiss et al., 2007**). Les feuilles en décoction sont utilisées contre la fièvre (**Lahsissene, 2009**). La poudre de feuilles est utilisée, en usage externe, sur les blessures et sur la plaie ombilicale du nouveau-né, comme cicatrisant. La résine est utilisée pour colmater les dents cariées ou perforées. Un morceau de sandaraque humecté d'eau de rose est passé sur les paupières, contre l'inflammation des yeux (**Bellakhdar, 1997**). Traditionnellement, elle est

utilisée comme insecticide (**Aouinty et al., 2006**). On extrait du thuya une résine «la gomme sandaraque» qui est utilisée pour la fabrication de vernis. Autrefois, les Egyptiens l'employaient pour embaumer les momies (**Seigue, 1985**).

#### **I.1.3.4. Propriétés pharmaceutiques**

Elle est douée des activités anthelminthique, antipyrétique, antipaludéenne, antiseptique, anti-infectieuse, laxative et purgative. Ainsi que des propriétés antimicrobiennes, antifongiques (**Bourkhiss et al., 2007; Ben Ghnaya et al., 2016**), anti-tumorales et anti-inflammatoires (**Buhagiar et al., 1999; Djouahri et al., 2014**) ont été signalées par l'utilisation de ses huiles essentielles. Le potentiel le plus important a été représenté par son activité antioxydante (**Rached et al., 2010**).

#### **I.1.3.5. Phytochimie**

Leurs propriétés sont directement liées aux composés phytochimiques présents, tels que les huiles essentielles de feuilles (obtenues par extraction hydro-distillation) et les phénols des extraits éthanolique et hexanique (**Herzi et al., 2013a; El Jemli et al., 2016**). Sa composition chimique montre la présence de composés polyphénoliques, en particulier les flavonoïdes (**Rached et al., 2010; El Jemli et al., 2016**) et les tanins (**Seigue, 1985; Bourkhiss et al., 2007**). **Barrero et al., (2003)** ont révélé la présence d'autres composés obtenus à partir des feuilles comme les pimaranes (diterpénoïdes).

### **I.2. Métabolites secondaires**

A côté des métabolites primaires classiques (glucides, protéides, lipides et acides nucléiques), il existe d'autres métabolites dits secondaires qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie et l'agroalimentaire (**Macheix et al., 2005**). Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en faible quantité par les plantes. Les produits du métabolisme secondaire sont en très grand nombre, plus de 200.000 structures définies (**Hartmann, 2007; Zhuang et al., 2015**) et sont d'une variété structurale extraordinaire. Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique. Ils sont divisés principalement en trois grandes familles: les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes (**Lutge et al., 2002; Marouf et Reynaud, 2007**). Ils ont de nombreuses applications pharmaceutiques. Ils composent un groupe de composés naturels qu'il convient d'explorer

pour des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anticancéreuses (Epifano *et al.*, 2007). Ils sont principalement obtenus par extraction des plantes (Matsumura *et al.*, 2013).

L'usage et le développement des techniques spectrales tels que la résonance magnétique nucléaire (RMN) à une ou à plusieurs dimensions, la spectroscopie de masse (SM), la spectroscopie UV-Visible et la chromatographie liquide haute performance (HPLC) permettent de déterminer et de quantifier un plus grand nombre de structures des métabolites secondaires (Kajdžanoska *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2011; Ferreres *et al.*, 2014). Le groupe des métabolites qui nous intéresse sont les composés phénoliques.

### **-Composés phénoliques**

#### **✓ Définition**

Les polyphénols (8000 structures phénoliques connues) représentent un groupe des métabolites secondaire complexes, exclusivement synthétisés dans le règne végétal, caractérisés par la présence au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que éther, ester, hétéroside etc. (Cuevas-Valenzuela *et al.*, 2016) (Figure 4):

-les flavonoïdes qui contiennent les flavones, flavanols, flavonols chalcones, dihydrochalcones, anthocyanidines et les tanins condensés).

-les composés non flavonoïdiques tels que les acides phénoliques de type benzoïque ou cinnamique et les tanins hydrolysables (gallo ou ellagitanins), les lignanes et les stilbènes (Collin et Crouzet, 2011). Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racines, tiges, feuilles, fleurs, fruits (Boizot et Charpentier., 2006).

Les différents rôles attribués se retrouvent:

-dans les différents aspects de la vie de la plante (Collin et Crouzet, 2011);

-dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites) (Collin et Crouzet, 2011);

-dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relation avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV), soit directement dans la nature soit lors de la conservation après la récolte de certains végétaux (Collin et Crouzet, 2011);

- dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules) et des produits qui en dérivent par transformation;
- dans les variations de certaines caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons fermentées) pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produit fini (Collin et Crouzet, 2011);
- dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies en raison de leurs interactions possibles avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes, cardioprotectrices, anti-inflammatoires, anti-athérogénique, anti-tumorales (anti-mutagénique et anti-carcinogénique) antimicrobiennes, antiallergiques, antivirales, antimicrobiennes, immunomodulateurs et oestrogéniques (Bruneton, 2009; Collin et Crouzet, 2011; Cuevas-Valenzuela *et al.*, 2016; Zhang and Tsao, 2016).

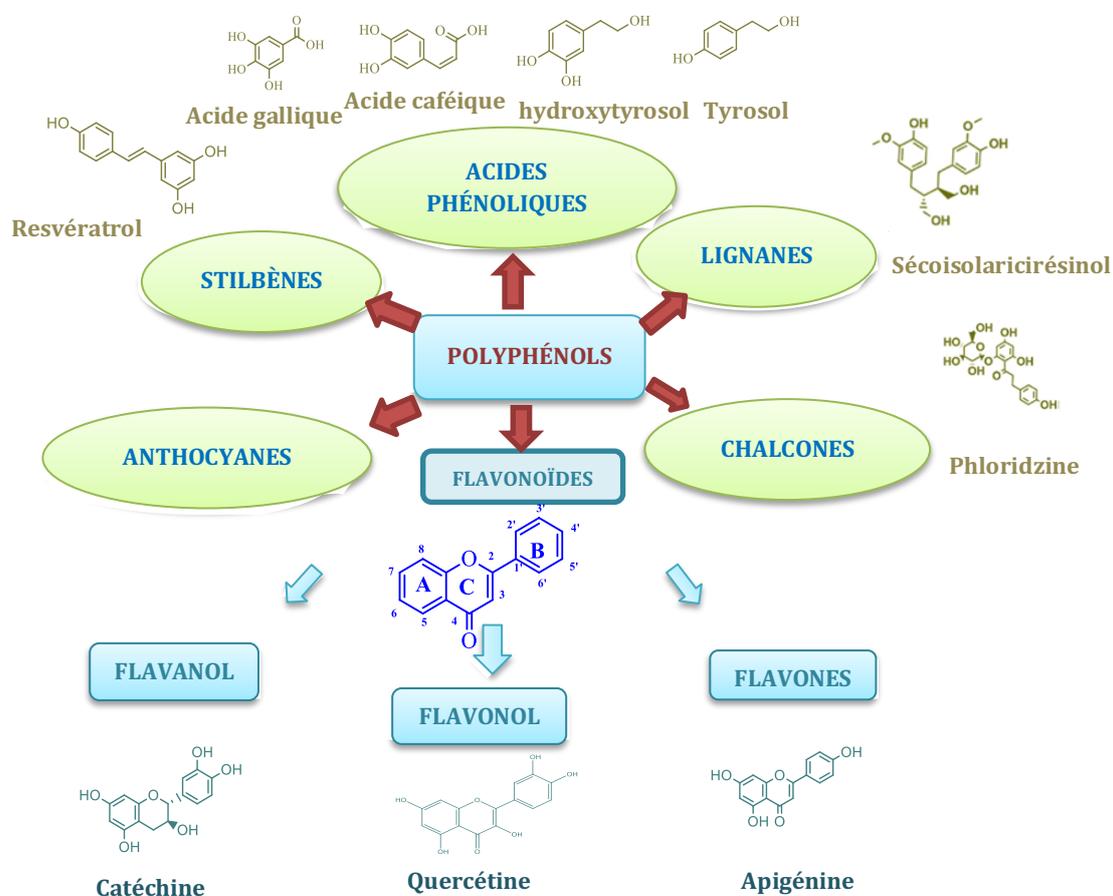
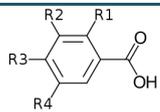
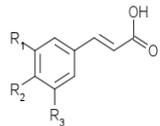
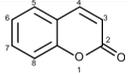
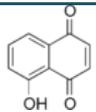
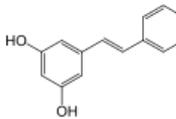


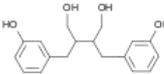
Figure 4. Classes des polyphénols (Losada-Barreiro et Bravo-Díaz, 2017)

✓ **Classification****-Composés non flavonoïdiques**

Les composés non flavonoïdes regroupent les acides phénoliques (les dérivés de l'acide benzoïque et l'acide hydroxycinnamique) ainsi que d'autres dérivés tels que les stilbènes dont le plus connu est le resvératrol et les tanins hydrolysables (gallo ou ellagitanins) (Collin et Crouzet, 2011). En se basant sur la structure carbonée de base, on peut citer les principales classes de composés phénoliques non flavonoïdiques suivantes (Tableau 2).

**Tableau 2.** Principales classes des composés phénoliques non flavonoïdiques et leurs structures (Cuevas-Valenzuela *et al.*, 2016).

Sous classe	Structure	Exemple (substitution)	Origine
<b>Phénols simples</b> (phénols alcoolique) (C <sub>6</sub> )		-Hydroquinone	-Raisin, Ericacea, Rosaceae
<b>Acides phénolique</b> (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> )			
<b>-Acide hydroxybenzoïque</b>		-Acide parahydroxybenzoïque (3: OH)	-Fruits et légumes, huile essentielles
		-Acide protocatéchique (2,3: OH),	- Raisins
		-Acide vanillique (2,3: OCH <sub>3</sub> , OH)	-Raisins
		-Acide gallique (2,3,4: OH)	-Raisins, sauge officinale, datte, soja, germes
<b>-Acide hydroxycinnamique</b>		-Acide paracoumarique (2: OH),	-Raisins, olives noirs, thym, sauge
		-Acide caféïque (1,2: OH)	-Raisins, sauge, datte, thym, pomme de terre
<b>Coumarines</b> (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> )		-Hydroxycoumarines: ombelliférone	-Apiaceae
		-Furanocoumarines: angélicine	(carottes, le persil, l'angélique)
		-Pyranocoumarines: decursinole	
<b>Naphtoquinones</b> (C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub> )		-Juglone	-Juglandaceae, noyer noir, Fabaceae
<b>Stilbénoides et anthraquinones</b> (C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> )		-Trans-resvératrol	-Raisin

<b>Xantones</b> (C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> )		
<b>Lignanes</b> (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		-Entérodiole -Graine de lin
<b>Tanins hydrolysables</b>	-Tanins galliques ou gallo-tanins; -Tanins ellagiques ou ellagi-tanins	-Acacia, thé, rosacées, les éricacées, les sterculiacées, les légumineuses, aussi (écorces)
<b>Lignines</b> (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>		Bois et fruits à noyaux
<b>-Flavonoïdes</b>		

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo-y-pyranne, isolées d'une large gamme de plantes vasculaires, avec plus de 6000 composés connus. Leur structure de base est celle d'un diphenyl propane à 15 atomes de carbone (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) (**Santos-Buelga et Scalbert, 2000**) généralement constitués de deux noyaux benzènes et un hétérocycle pyrane oxygéné (**Cuevas-Valenzuela et al., 2016**). Au sein des flavonoïdes, on retrouve les flavones et les flavonols de couleur crème ou jaune clair, les flavanes (flavanols) dont les produits de condensation sont à l'origine d'un groupe important de tanins et les isoflavones qui jouent un rôle dans la santé humaine (**Bruneton, 2009**), les (prényl) chalcones et les dihydrochalcones ainsi que les anthocyanines ou anthocyanidines, des pigments rouges ou bleus (**Hollman et katan, 1997; Ghedira, 2005**).

De façon générale, les flavonoïdes se trouvent soit à l'état libre, dans ce cas ils sont dits aglycones, soit sous forme de C- ou O-glycosides et dans ce cas ce sont des hétérosides. Ils sont liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose, l'arabinose, ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères (**Tableau 3**) (**Khoddami et al., 2013; Xiao, 2015**).

La structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation permettent de distinguer les différentes classes de flavonoïdes. Le cas extrême d'oxydation de l'hétérocycle central correspond aux anthocyanidines. Exceptionnellement, le noyau central de la molécule peut ne pas être totalement cyclisé (chez les chalcones et molécules voisines) ou se présenter sous forme d'un cycle ne présentant que cinq sommets (cas des aurones, de couleur généralement

jaune vif). À l'intérieur de chacune des classes, les variations autour du squelette chimique de base en C15 portent principalement sur trois points:

-le degré d'hydroxylation du cycle B qui est mono-hydroxylé chez le kaempférol ou la pélargonidine, di-hydroxylé chez la quercétine ou la cyanidine, tri-hydroxylé chez la myricétine ou la delphinidine.

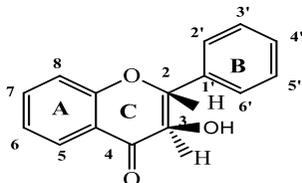
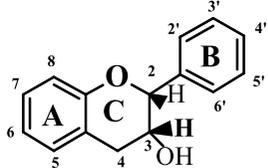
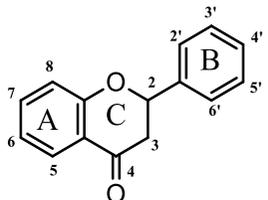
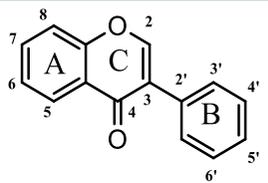
-le niveau de méthylation (groupement O-CH<sub>3</sub>) à la place des seules fonctions phénoliques), la méthylation diminue l'hydrosolubilité des molécules.

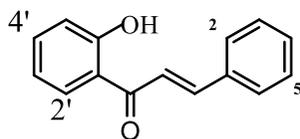
-le niveau de glycosylation des flavonoïdes des végétaux qui sont presque tous liés aux sucres (**Ghedira, 2005**).

Il est indéniable que les flavonoïdes naturels en particulier leurs glycosides présentent un grand intérêt général en raison de leur bio-activités diversifiées récapitulées dans le tableau 4. Ces effets pourraient avoir des applications thérapeutiques ou dans le domaine alimentaire (**Xiao *et al.*, 2016**).

Tableau 3. Principales classes des flavonoïdes et leurs structures (Cuevas-Valenzuela *et al.*, 2016)

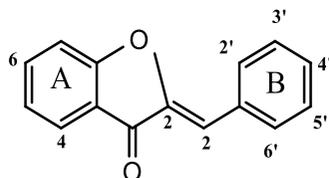
Flavonoïdes	Structure	Exemple (substitution)	Origine
Structure de base (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>			-Fruits, -Légumes, -Fleurs, -Plantes médicinales
Flavones		-Apigénine: 5,7,4' tri OH  -Lutéoline: 5, 7, 3',4'tetraOH  -Rutine: 5,7,3',4' tetra OH (Rutoside)  -Baicaline	-Persil, céleri, <i>Abrus mollis</i> , fenugrec ( <i>Trigonella Foenum-graecum</i> ), graines germées, lupin égyptien (graines), dates.  -Agrumes, peau de la tomate, fruit de poivre, <i>palmier dattier</i> , <i>Vernonia colorata</i> , <i>Digitalis lanata</i> Eheh.  -Sarrasin, <i>Eucalyptus macrorrhyncha</i> , <i>Fagopyrum esculentum</i> , <i>Stellaria media</i> , <i>Sophora japonica</i>  - <i>Scutellaria baicalensis</i>
flavonols		-Quercétine: 5,7,3,4'tetra OH  -Kaempférol: 5,7,4' triOH	-Oignon ( <i>Allium cepa</i> ), laitue, brocoli, tomates, thé, baies, huile d'olives, peau de pomme, <i>Crataegus cuneata</i> , <i>Ginkgo biloba</i> , <i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Morus alba</i> , <i>Olea europea</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Thea sinensis</i> , <i>Vaccinium macrocarpon</i> , <i>Vitis vinifera</i> , <i>Pueraria thumbergiana</i>  -Poireaux, brocolis, radicchio(trévisé) <i>Cichorea endivia</i> , <i>Ginkgo biloba</i> , <i>Raphanus sativus</i> , <i>Thea sinensis</i> , <i>Vitis vinifera</i> ,

		<i>Cichorea endivia</i> , <i>Ginkgo biloba</i> , <i>Raphanus sativus</i> , <i>Thea sinensis</i> , <i>Vitis vinifera</i>
		-Raisins aux canneberges, <i>Thea sinensis</i> , <i>Vaccinium macrocarpon</i> , <i>Vitis vinifera</i> , <i>Myrtus</i>
<b>Dihydroflavonols</b>		-Taxifoline: 5,7,3',4' tetraOH - Fisétine: 7,3',4' triOH
<b>flavonols</b>		-(+)-Catéchine: 5,7,3',4' tetraOH, (-)epicatéchine: 5,7,3',4', (+)-gallocatéchine: 5,7,3',4',5' pentaOH, epigallocatéchine: 5,7,3',4' pentaOH tetraOH 3galoyl
<b>Flavanones</b>		-Naringénine: 5,7,4' triOH, taxifoline: 5,7,4',5' tetraOH
<b>Isoflavones</b>		-Génicéteine: 5, 7, 4' tri OH  -Daidzéine: 7,4'-diOH
		Fruits des Astéracées
		Pomme, <i>Thea sinensis</i> , <i>Vitis vinifera</i>
		Fruits du genre <i>Citrus</i> ( <i>sp. aurantium</i> , <i>limon</i> , etc.)
		-Soja « <i>Soya hispida</i> ,», <i>Stellaria media</i> , <i>Pueraria lobata</i> , <i>Sophora japonica</i>
		-Pois, Soja « <i>Soya hispida</i> ,»

**Chalcones**

-Butéine:  
3,4,2',4',tetrahydroxychalcone;  
davidigénine: 4,2',4' triOH; rengasine:  
4-*O*-méthylauréusidine

-*Rhus*

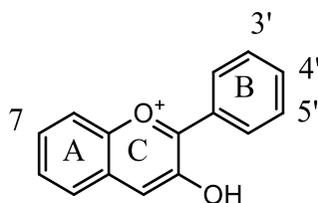
**Aurones**

-Auronol: 4,6,4'-trihydroxyaurone

-Fèves, duramen de *Rhus*

-Maritimétine: 6,7,3',4' tetraOH

-Duramen rouge de l'espèce *Berchemia zeyheri*

**Anthocyanidines**

-Cyanidine:(3,5,7,3',4'-pentaOH)

-Pomme rouge, cerise, framboise, fraise,  
racines de patates douces pourpres,  
*Averrhoa carambola* L.

-Apigéninidine: (5,7,4'-triOH)

-Chou rouge et racines de patates douces  
pourpres

-Lutéolinidine: (5,7,3', 4'-tetraOH)

-Racines de patates douces pourpres

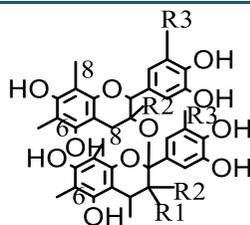
-Pélagonidine:(3,5,7,4'-tetraOH)

-Pélagonium rouge

-Malvédine

-Mauve, myrtilles rouge, pourpre et bleu  
contiennent les différents anthocyanidines

**Tanins condensés**  
(polymères de flavan3ol)  
(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)<sub>n</sub>



-Procyanidine

-Raisin

**Tableau 4.** Quelques activités biologiques de certains flavonoïdes et leurs mécanismes d'actions.

Potentiels	Type des flavonoïdes	Mécanisme d'action	Références bibliographiques
<b>Activité antioxydante et anti-âge (antivieillessement)</b>	Orientine, vitexine, 2"-O- $\beta$ -galactopyranosylvitexine, quercétine-3-rutinoside, quercétine, kaempférol, myricétine, galangine, taxifoline, dihydrokaempférol, lutéoline, lutéoline-4-glucoside, Apigénine, chrysine, eriodictyol, hespérétine, naringénine, naringénine 7-rutinoside, catéchine, épicatechine, épigallocatechine, épicatechine gallate, épigallocatechine gallate, cyanidine, cyanidine-3-rutinoside, pélagonidine, génistéine, biochanine A, daidzéine, formononétine, génistéine-7-glucoside	-Améliorer les activités des enzymes antioxydantes: Superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GSH-Px); -suppression des espèces réactives oxygénées par inhibition des enzymes responsables de la formation des E.R.O ou par la chélation des éléments des traces des métaux; -protection et contrôle de système de défense antioxydant.	<b>Pietta (2000); El-Alfy et al. (2011); Jiang et al. (2012); Choi et al. (2014a); Halliwell et Gutteridge (2015); Zhang et Tsao (2016)</b>
<b>L'activité d'amélioration du mémoire</b>	Spinisine	Amélioration de l'altération cognitive induite par un blocage cholinergique	<b>Jung et al. (2014)</b>
<b>Activité antidiabétique</b>	Vitexine, isovitexine, swertisine, flavocomméline, Orientine, isoorientine, apigénine-C-glycosides	-Inhiber de l' $\alpha$ -glucosidase; -réduire la formation d'une glycation avancée end-Produits (AGE); -diminuer des niveaux de glucose dans le sérum; -induire une augmentation significative de la sécrétion d'insuline; -stimuler le stockage de glycogène.	<b>Peng et al. (2008); Shibano et al. (2008); Li et al. (2009); Cazarolli et al. (2012); Choo et al. (2012); Chen, Li et al. (2013); da Silva Morrone et al. (2013); Choi et al. (2014a,b)</b>
<b>Activité anti-inflammatoire</b>	-Orientine, isoorientine, kaempférol-6-C-glucoside, quercétine-6-C-glucoside, lutéoline-8-C-glucoside	-Réduction de l'expression des enzymes proinflammatoires (COX-2, iNOS) et la production de NO; -protection de la vascularisation;	<b>Kwon et al. (2004); Odontuya et al. (2005); Aquila et al. (2009); Venkatesha et al. (2011); Wu et al. (2012); Zhang et al. (2013); Francisco et al. (2014); Wang,</b>

		-intégrité de la barrière en inhibant l'hyperperméabilité; -adhésion et la migration des leucocytes.	<b>Chen et al. (2014); Zhang et Tsao (2016)</b>
<b>Activité antimicrobienne</b>	Isoorientine, orientine, isovitexine, vitexine; rutine, apigénine, rhamnazine, rhamnocitrine, galangine, pinoembrine, poncirine; genkwanine, sophoraflavanone G et ses dérivés, naringine et naringénine, epigallocatechine gallate et ses dérivés, lutéoline, lutéoline-7-glucoside, quercétine, 3-O-methylquercétine et les divers quercétine glycosides, quercétagine-7-arabinosyl-galactoside, kaempférol et ses dérivés, 2,4,2-trihydroxy-5-methylchalcone, 2,4,2-trihydroxychalcone	-Propriétés d'inhibition de la croissance contre les bactéries gram positif et gram négatives ainsi que les champignons par:  -inhibition de la synthèse des macromolécules: les acides nucléiques ADN et ARN; les lipides et des protéines et les enzymes comme ADN gyrase, ATPase et inhiber l'activité de décatençage dépendant de la topoisomérase IV;  -inhibition la fonction de la membrane cytoplasmique causée par la réduction de la fluidité du membrane.	<b>Tsuchiya et Inuma (2000); Plaper et al. (2003); Bylka et al. (2003); Martini et al. (2004); Cushnie et Lamb (2005); Hu et al. (2008); Cushnie et Lamb (2011); Li et al. (2013); Brango-Vanegas et al. (2014)</b>
<b>Activité antivirale</b>	Swertisine, isoorientine, isovitexine, swertiajaponin, baicaline, robustaflavone, hinokiflavone, catéchine, quercétagine, quercétine-3-O-(2''-galloyl)- $\alpha$ -L-arabinopyranoside, myricétine	-Activité antivirale contre le virus respiratoire syncytial (RSV);  -activité anti-influenza-A et B, anti-hépatite B (anti-VHB), anti-VIH virus de l'immunodéficience humaine par: l'inhibition de l'entrée du VIH-1 dans les cellules exprimant le CD4 et  et l'antagonisme de la transcriptase inverse du VIH-1, inhibition la transcription virale, inhiber le VIH-1 intégrase, inhibition de l'ADN polymerases et leur interaction avec l'enzyme VIH-1.	<b>Kim, Woo et al. (1998); Kim, Jeon et al. (2001); Ma et al. (2001); Cushnie et Lamb (2005); Cai et al. (2006); Wang et al. (2012); Cao et al. (2013)</b>
<b>Activité hépatoprotective</b>	-Kaempférol-8-C- $\beta$ -galactoside, schaftoside, molinpentine-2''-O-rhamnoside, vicénine-2, lucnine-2, isovitexine-2''-O-rhamnoside, 11-O-galloylbergenine saponarme, cerarvensine-2''-O-rhamnoside, vitexine-2''-O-rhamnoside, isoorientine-2''-O-rhamnoside, bergénine,	-Effets hépatoprotecteurs contre les dommages histopathologiques et histochimiques;  -effet préventif sur la D-galactosamine;  -induite des lésions hépatiques;  -activité hépatoprotective contre CCl4 et la	<b>Kim, Chin et al., (2004); Wada et al., (2000); Chen, Zhang et al., (2013); Hawas et al., (2013); El Toumy et al., (2012); Obmann et al. (2012)</b>

	orientine-2"- <i>O</i> -rhamnoside	cytotoxicité induite par la galactosamine; -inhibition contre le TNF induit la mort cellulaire dans les hépatocytes de souris.	
<b>Activité antiplaquettaire</b>	-Apigénine-6,8-di- <i>C</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranoside, diosmétine-6,8-di- <i>C</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranoside, apigénine-8- <i>C</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranoside, apigénine-8- <i>C</i> -[ $\alpha$ - <i>L</i> -arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranoside, apigénine-6- <i>C</i> -[ $\alpha$ - <i>L</i> -arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranoside, isovitexine	-Inhibition contre l'adénosine diphosphate (ADP) et l'épinéphrine induite par l'agrégation plaquettaire	<b>Lin <i>et al.</i> (1997); Piccinelli <i>et al.</i> (2008)</b>
<b>Activité anti-tumorale</b>	-Aciculatine, 4"- $\alpha$ -rhamnopyranosyl-2"- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -galactopyranosylvitexine, lutéoline-8- <i>C</i> - $\beta$ -fucopyranoside, isoorientine, alternanthine B	-Effets inhibiteurs sur le nitrique oxyde synthase (iNOS) et cyclooxygenase-2 (COX-2); -induisant la mort cellulaire dans les cellules cancéreuses humaines; -cytotoxicité contre les cellules KB; -suppression de la voie de la signalisation MAPK et d'accès et réglementation nucléaire AP-1 et NF- $\kappa$ B dans les cellules cancéreuses du sein; -inhibant la prolifération et induisant l'apoptose des cellules cancéreuses; -règlement les voies de NF-kappaB et c-Jun N-terminal kinase (JNK) / p38; -activité contre les cellules lignées HeLa et L929.	<b>Carte <i>et al.</i> (1991); Lai <i>et al.</i> (2011; 2012); Zhu <i>et al.</i> (2012); Park <i>et al.</i> (2013); Yuan <i>et al.</i> (2012; 2013; 2014); Ambasta <i>et al.</i> (2015)</b>

## II. Antioxydants et radicaux libres

Les antioxydants sont des molécules d'avenir permettant une prévention efficace contre plusieurs maladies dont les maladies cardiovasculaires, le cancer, etc. Ces molécules donnent un espoir à la recherche médicale et scientifique (Jadot, 1994; Sarangarajan *et al.*, 2017). L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies. Mais l'oxygène peut être considéré également comme une source d'agression (Abdollahi *et al.*, 2004; Pham-Huy *et al.*, 2008).

### II.1. Définition d'un radical libre

Un radical libre se définit comme tout atome, groupe d'atomes ou molécules possédant un électron non apparié (célibataire) sur leur orbitale externe. Il s'agit d'espèces chimiques très réactives qui cherchent dans leur environnement un électron pour s'apparier (c'est-à-dire pour former une liaison chimique) (Ahmadinejad *et al.*, 2017), leur durée de vie est très courte variable selon les radicaux et les réactions induites se font généralement en chaînes conduisant à des lésions cellulaires importantes (Kumar, 2011; Pizzino *et al.*, 2017).

### II.2. Défense de l'organisme contre les agressions radicalaires

Au niveau du corps humain, il existe une formation continue des radicaux libres (R.L.) au cours de différents processus métaboliques: la chaîne oxydative mitochondriale, la synthèse des prostaglandines, la phagocytose (Pizzino *et al.*, 2017). Les R.L. ne sont pas toujours des produits agressifs, ils sont produits pendant le métabolisme cellulaire et lors de leur activités fonctionnelles, jouant ainsi le rôle de messenger pour la cellule dans la signalisation cellulaire, l'apoptose, l'expression des gènes, le transport ionique et la défense contre les infections (Halliwell, 2003; Devasagayam *et al.*, 2004; Sen *et al.*, 2010). Les R.L. dérivés des molécules d'oxygène, d'azote et de soufre dans le système biologique sont très actifs pour réagir avec d'autres molécules en raison de leurs électrons non appariés (Pizzino *et al.*, 2017).

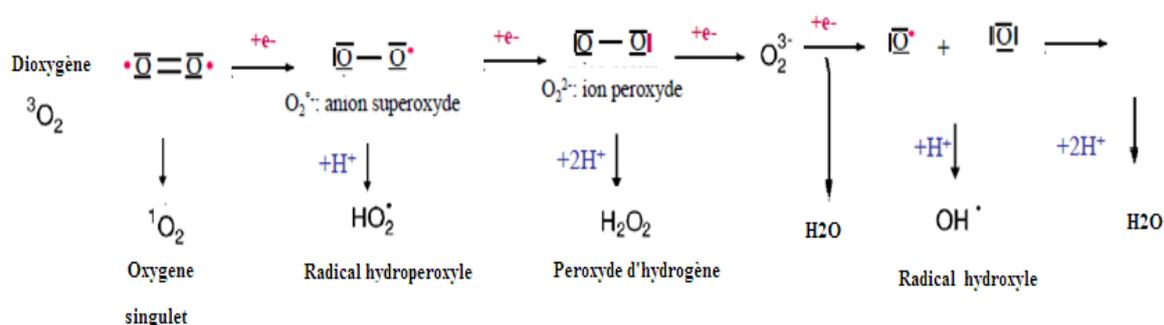
Ces radicaux sont une partie importante des groupes de molécules appelées espèces réactives (E.R.), ils peuvent être (Figure 5; Tableau 5) (Devasagayam *et al.*, 2004; Munné-Bosch et Pintó-Marijuan, 2017):

- des espèces réactives de l'oxygène (R.O.S.: *Reactive Oxygen Species*).
- des réactives de l'azote (R.N.S.: *Reactive Nitrogen Species*).
- d'autres non radicalaires oxygénés ou azotiques tels que: peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), l'ion hypochlorite (ClO<sup>-</sup>), peroxydinitrite (ONOO<sup>-</sup>)

➤ des radicaux alcoyles (RO) et peroxyes (ROO°) formés durant l'auto-oxydation des acides gras insaturés, ces espèces sont présentées dans le tableau 5. Ces radicaux sont très toxiques pour l'organisme directement ou indirectement par l'intermédiaire d'autres molécules. Ces dernières, sous l'influence des radicaux libres, subissent des phénomènes de réduction ou d'oxydation (**Bouayed et Bohn, 2010; Poprac et al., 2017**). Cependant, les diverses biomolécules sont des cibles majeurs de l'action de ces espèces (E.R.) telles que les acides nucléiques «ADN et ARN», les chaînes latérales d'acides aminés dans les protéines et les doubles liaisons des acides gras insaturés, provoquent facilement des dommages oxydatifs à ces molécules, et même la diminution de la performance de système immunitaire ce qui entraîne un risque accru de diverses maladies comme des pathologies cardiovasculaires, de cancer (**Saeidnia et Abdollahi, 2013**), d'autisme (**Afonso et al., 2007**) et en générale un vieillissement de la cellule (**Césarini, 2004; Kumar, 2011; Torres-Cuevas et al., 2017**).

Les E.R. dans les systèmes biologiques sont généralement des espèces instables et oxydantes de courte durée avec une demi vie en milli, micro ou nanosecondes, et qui sont produites en faible concentration pour les voies de signalisation physiologique (**Poprac et al., 2017**) et en plus grande concentration (stress oxydatif) pour détruire les virus et les bactéries chez les leucocytes pendant l'infection (réponse inflammatoire) (**Devasagayam et al., 2004**).

L'exposition prolongée au stress oxydatif est considérée comme un événement initiateur dans le développement de maladies dégénératives (**Apel et Hirt, 2004; Torres-Cuevas et al., 2017**). Pour inhiber la toxicité des espèces réactives, l'organisme possède des systèmes de défense intracellulaires, dont le siège peut être cytoplasmique ou membranaire (**Apel et Hirt, 2004; Devasagayam et al., 2004**).



**Figure 5.** Représentation des réductions successives de la molécule de dioxygène formant les différentes espèces réactives oxygénées (E.R.O) d'après Apel et Hirt (2004)

**Tableau 5.** Espèces réactives oxygénées et azotées (Devasagayam *et al.*, 2004)

Espèces réactives	Symbole	Demi-vie en seconde	Localisation/ intérêt biologiques
<b>Espèces réactives oxygénées</b>			
Anion superoxyde	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	10 <sup>-6</sup> s	Généré dans les mitochondries, dans le système cardiovasculaire et autres et donne naissance au OH <sup>°</sup>
Radical hydroxyle	OH <sup>°</sup>	10 <sup>-9</sup> s	Très réactif, généré lors de la surcharge en fer (réactions de Fenton)
Hydroperoxyde	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Stable	Les mitochondries et le réticulum endoplasmique sont d'importants sites producteurs de peroxyde d'hydrogène. Plusieurs enzymes sont responsables de cette production. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> peut aussi apparaître spontanément, lors de la recombinaison de deux anions superoxyde
Radical Peroxyle	ROO <sup>°</sup>	s	Réactif, formé à partir de lipides, protéines, ADN et sucres, etc., pendant les dommages oxydatifs
Hydroperoxyde organique	ROOH	Stable	Réagit avec les métaux de transition
Oxygène Singluet	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	10-6 s	Très réactif, formé pendant la photosensibilisation et lors des réactions chimiques
Ozone	O <sub>3</sub>	s	Présent comme un polluant atmosphérique, peut réagir avec différentes molécules, donnant <sup>1</sup> O <sub>2</sub>
<b>Espèces réactives azotiques</b>			
Monoxyde d'azote	NO <sup>°</sup>	s	Neurotransmetteur et régulateur de la pression sanguine, peut produire des oxydants puissants.
Dioxyde d'azote	NO <sub>2</sub>	s	Formé pendant une pollution atmosphérique par dioxyde
Peroxynitrite	ONOO <sup>-</sup>	10 <sup>-3</sup> s	Hautement réactif, formé de NO et superoxyde
Acide peroxy-nitrique	ONOOH	Stable	Protoné à partir de peroxy-nitrite

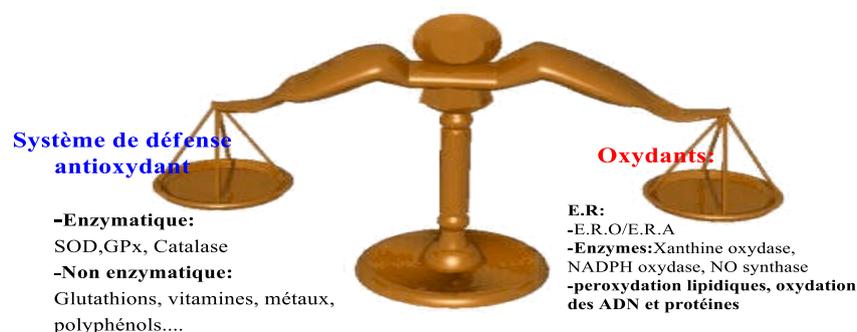
### II.3. Définition des antioxydants

De nombreuses stratégies de défense ont été développées par les cellules. Elles reposent sur l'action de composés appelés antioxydants (Valko *et al.*, 2007).

Selon Halliwell (1992; 2007), un antioxydant est défini comme toute substance chimique qui présente, à des faibles concentrations par rapport à un substrat oxydable, la capacité de ralentir ou inhiber de manière significative son oxydation (au niveau des macromolécules telles que les lipides, les acides nucléiques et les protéines) et le transformer en un composé plus stable ou d'éliminer les dommages oxydatifs à une molécule cible.

Ces molécules ont la capacité de stopper les réactions directement ou indirectement en réduisant les radicaux libres ce qui entraîne l'arrêt de leurs actions (Halliwell, 2007). Ce terme d'antioxydant est principalement utilisé pour deux groupes différents de substances: les

produits chimiques industriels qui sont ajoutés et utilisés comme additifs pour prévenir l'oxydation et les produits chimiques naturels qui ont des effets bénéfiques sur la santé (Pokorny *et al.*, 2001; Kirschweng *et al.*, 2017). Certains de ces derniers sont endogènes ou cellulaires (tissu corporel) (Ighodaro et Akinloye, 2017); c'est à dire synthétisés par la cellule qui sont principalement des molécules réductrices enzymatiques telles que la catalase, la superoxyde dismutase et certaines peroxydases ou non enzymatiques comme le glutathion et l'acide urique. D'autres molécules sont apportés par l'alimentation ou exogènes, c'est le cas de la vitamine C, vitamine E et les composés phénoliques (Tableau 6). Une déficience ou une absence de ces composés antioxydants entraîne un stress oxydant (Lü *et al.*, 2010; Russo *et al.*, 2017). Les antioxydants peuvent diminuer les dommages oxydatifs directement en réagissant avec les radicaux libres ou indirectement en inhibant l'activité ou l'expression d'enzymes génératrices de radicaux libres ou l'amélioration de l'activité ou de l'expression d'enzymes antioxydantes intracellulaires (Lü *et al.*, 2010; Munné-Bosch et Pintó-Marijuan, 2017). Chez tout individu dans les tissus sains, la génération des E.R. est contrôlée par la présence d'un système de défense antioxydant qui est capable de faire face et détruire les radicaux produits en excès. On dit que la balance antioxydants/proxydants est en équilibre (Figure 6) (Adjimani et Asare, 2015). Ainsi, le stress oxydatif significativement est un déséquilibre causé par à une production excessive de E.R. et/ou une diminution du taux d'antioxydants (insuffisance d'apports des micronutriments antioxydants, inactivation enzymatiques) dans l'organisme et contribue à la pathogenèse d'inflammatoire, cardiovasculaire, cancer, diabète, des maladies neuro-dégénératives (Alzheimer, Parkinson), la cataracte et le vieillissement (Beaudeau et Vasson, 2005; Valko *et al.*, 2007).

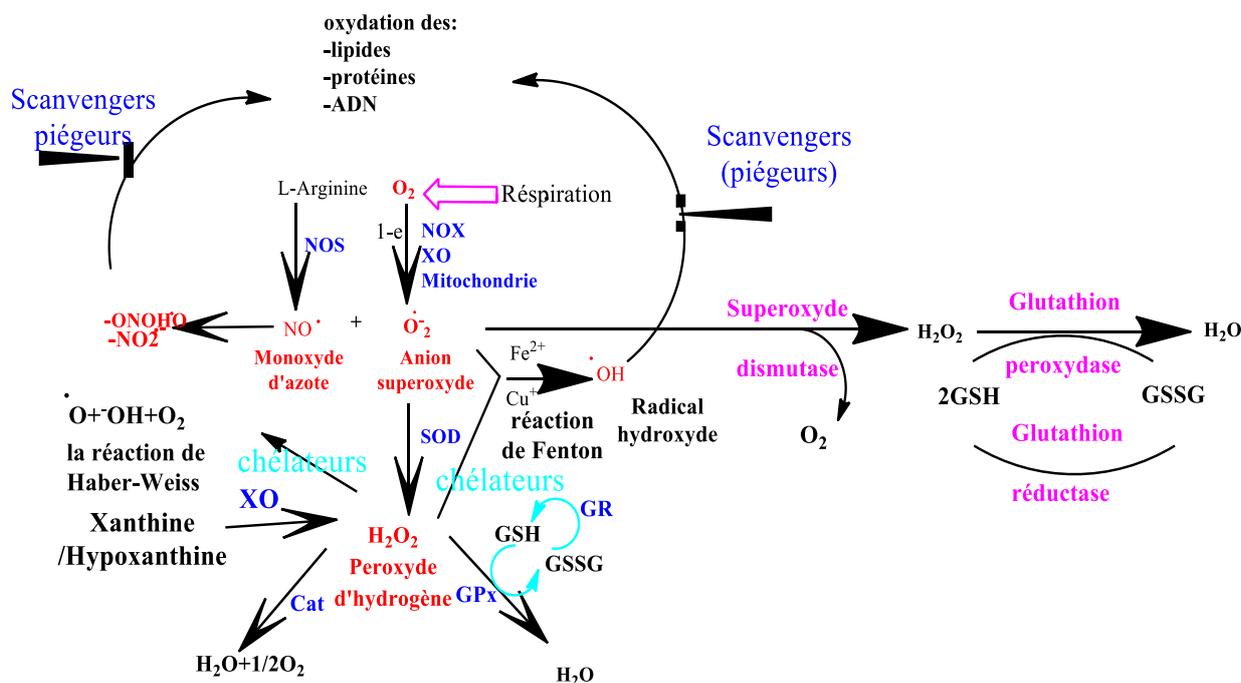


**Figure 6.** Balance entre les antioxydants et les oxydants (un déséquilibre= un stress oxydatif).

#### II.4. Systèmes de défense antioxydants et mécanisme d'action

Les recherches scientifiques ont été concentrées sur l'identification des extraits de plantes à utiliser comme suppléments antioxydants alimentaires (**Halliwell et al., 1995; Modaressi et al., 2013**). De nombreuses substances naturelles réduisent le stress oxydatif par piégeage et quenching des radicaux libres, élimination des peroxydes lipidiques, chélation des métaux de transition et inhibition de l'activité des enzymes génératrices de radicaux (**Tableau 5**) (**Cillard et Cillard, 2006; Flora, 2009**). Ils contiennent une grande variété des composés antioxydants, tels que les composés phénoliques (phénol, polyphénols et flavonoïdes), caroténoïdes, stéroïdes et composés thioliques. Ces antioxydants peuvent aider à protéger les dommages cellulaires causés par le stress oxydatif et aussi réduire le risque des maladies chroniques générées (**Halliwell et al., 1995; Cillard et Cillard, 2006**). Il a été constaté que les composés phénoliques naturels stimulent le système antioxydant intracellulaire pour résister les lésions induites par les oxydants. La plupart de ces antioxydants naturels proviennent de fruits, légumes, épices, champignons comestibles, grains et plantes médicinales (**Jadot, 1994**). la vitamine C, la vitamine E, l'acide urique et le glutathion jouent un rôle important en tant que des antioxydants cellulaires (**Lü et al., 2010**). Les antioxydants synthétiques ont été largement utilisés dans l'industrie alimentaire pour retarder l'oxydation des lipides, ce sont des molécules très puissantes pour inhiber la peroxydation lipidique (**Halliwell et al., 1995; Si et al., 2018**). Cependant, une telle utilisation des antioxydants de synthèse ne sont pas préférés pour la pharmacologie en raisons de ses préoccupations toxicologiques (**Wang et al., 2016 a,b; Chand et al., 2017**). Les antioxydants peuvent diminuer le niveau cellulaire des radicaux libres soit en inhibant les activités ou les expressions de enzymes génératrices de radicaux libres telles que NAD(P)H oxydase et xanthine oxydase (XO) ou en améliorant les activités et les expressions d'enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPX), ces enzymes antioxydantes produites dans le corps fournissent une défense importante contre les radicaux libres (**Lü et al., 2010**). Les cellules animales contenant l'enzyme SOD peut convertir deux molécules de superoxyde ( $O_2^{\cdot}$ ) en un peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et un oxygène. En outre, les organismes utilisent CAT et / ou GPX pour éliminer  $H_2O_2$  avant la réaction de Fenton peut créer un  $OH^{\cdot}$  (**Pokorny et al., 2001; Meng et al., 2017**) (**Figure 7**). En général dans le cas d'une production physiologique de radicaux libres, l'organisme dispose de système efficace de protection qui lui permet de lutter contre ces espèces radicalaires (**Flora, 2009; Lü et al., 2010**). Ces systèmes de défenses sont

constitués d'un dispositif endogène de nature enzymatique et non enzymatique et un système de défense exogène non enzymatique (**Tableau 6**) (**Rahman, 2007; Pham-Huy *et al.*, 2008; Bouayed et Bohn 2010**).



**Figure 7.** Schéma montrant l'action du système de défense des antioxydants endogènes lors de la production des E.R.O par des réactions enzymatiques. (NOS: oxyde nitrique synthase / NOX: NADPH oxydase / XO: xanthine oxydase / SOD: superoxyde dismutase / Cat: catalase / GPx: glutathion peroxydase / GR: glutathion réductase)

## II.5. Système de défense exogène «antioxydants naturels»

Les antioxydants naturels sont largement utilisés dans le monde et sont privilégiés par rapport aux antioxydants synthétiques. Ce sont des antioxydants sacrificiels et piégeurs qui sont une deuxième ligne de défense en empêchant principalement la propagation des réactions en chaînes qui interviennent indirectement et sont préférentiellement oxydés par des espèces réactives pour conserver les biomolécules les plus importantes (**Chao-Chin *et al.*, 2008; Magalhães *et al.*, 2008**). Il faut citer l'ascorbate (vitamine C) qui agit au niveau cytoplasmique, le tocophérol (vitamine E), les caroténoïdes qui agissent essentiellement au niveau membranaire et les polyphénols (**Tableau 6**) (**Zampelas et Micha, 2015; Kirschweg *et al.*, 2017**).

**Tableau 6.** Systèmes de défense antioxydants humains comprenant des antioxydants endogènes (enzymatiques et non enzymatiques) et exogènes (**Pokorny *et al.*, 2001**).

Système de défense antioxydant	
Antioxydants endogènes	Antioxydants exogènes
<b>Antioxydants enzymatiques</b>	<b>Principaux antioxydants alimentaires issus de fruits, de légumes, de céréales et des plantes médicinales</b>
<p>-Superoxyde dismutase (SOD): détoxifiante enzymatique d'un anion superoxyde (<math>O_2^{\cdot-}</math>)</p> <p>-Catalase (CAT) et glutathion peroxydase (GPx): enzymes impliquées dans La désintoxication des peroxydes (CAT contre <math>H_2O_2</math> et GPx contre <math>H_2O_2</math> Et ROOH)</p> <p>-Glutathion réductase: enzyme impliquée dans la régénération du glutathion</p> <p>-Thioredoxine réductase: enzyme impliquée dans la protection contre les protéines d'oxydation</p> <p>-Glucose-6-phosphate déshydrogénase: enzyme impliquée dans la régénération de NADPH</p> <p>-Ascorbate peroxidase (APX, EC 1.1.11.1): APX utilise deux molécules d'ascorbate pour réduire l'<math>H_2O_2</math> à l'eau avec une génération concomitante de deux molécules de MDHA</p> <p>-La peroxydase de guaiacol (GPX, 1.11.1.7), une protéine contenant de l'hème, oxyde les donneurs d'électrons aromatiques tels que le gaïacol et le pyrogallol au détriment de <math>H_2O_2</math>.</p>	<p>-Vitamines: vitamine C, vitamine E</p> <p>-Minéraux de traces: zinc, sélénium, cuivre</p> <p>-Caroténoïdes: <math>\beta</math>-carotène, Lycopène, lutéine, zéaxanthine</p> <p>-Polyphénols non flavonoïdiques:</p> <p>-Les acides phénoliques: acides chlorogènes, acide gallicique, acide cafeique, etc.,</p> <p>-Lignans (secoisolariciresinol)</p> <p>-Stilbènes (Résveratrol)</p> <p>-Flavonoïdes:</p> <p>-Flavonols: quercétine *, kaempférol *, myricétine *</p> <p>-Flavanols: proanthocyanidines et catéchines</p> <p>-Anthocyanidines: cyanidine * et pelagonidine *</p> <p>-Isoflavones: génistéine *, daidzéine * et glycite*</p> <p>-Flavanones: naringénine *, eriodictyol * et hesperetine *</p> <p>-Flavones: lutéoline * et apigénine *</p> <p>-chalcone et aurones</p> <p>-Saponines, stéroïdes: Cortisone, œstradiol et estriol</p>
<b>Antioxydants non enzymatiques (principaux agents réducteurs intracellulaires)</b>	
<p>-Glutathion (GSH), acide urique, NADPH, coenzyme Q, albumine, Bilirubine</p> <p>-Hormones: Melatonine, Œstrogène,</p> <p>-Lipides: Ubiquinol-10, N-acétylcystéine, acide lipoïque</p>	

\* et leurs glucosides.

## II.6. Polyphénols comme antioxydants

Ce sont des antioxydants naturels puissants impliqués dans la défense contre les dommages oxydatifs au niveau de la cellule et réduisent le risque de diverses maladies en raison de leur capacité à éliminer les radicaux libres, à restaurer les antioxydants enzymatiques car ils possèdent des structures chimiques idéales (**Losada-Barreiro et Bravo-Díaz, 2017**). L'activité antioxydante des polyphénols est plus puissante que celle des tocophérols et de l'acide ascorbique (**Ozsoy *et al.*, 2008**).

Plusieurs études ont montré qu'il existe une relation entre la structure et l'activité antioxydante. Les actions protectrices des polyphénols peuvent se traduire par:

- neutraliser les radicaux libres étant un donneur d'électron ou atome d'hydrogène à une large gamme des espèces réactifs d'oxygène y compris  $O^{\bullet-}_2$ ,  $OH^{\bullet}$ , radicale peroxyde  $LO_2$ , Acide hypochloreux (HOCl) et acide peroxy-nitrique (ONOOH).

- chélater des ions métalliques responsables de la production des E.R.O;

- inhiber des enzymes responsables de la production des E.R.O (exemple: xanthine oxydase et cyclooxygenase).

- inhiber la peroxydation lipidique par l'inhibition de la phase de propagation dans les réactions en chaînes (**Magalhães *et al.*, 2008; Bouayed et Bohn, 2012; Watson, 2014; Zhang et Tsao, 2016**).

## II.7. Flavonoïdes comme antioxydants

Les flavonoïdes sont des substances phénoliques. Des nombreuses études ont suggéré que les flavonoïdes présentent des propriétés biologiques, y compris les actions anti-allergènes, antiviraux, anti-inflammatoires et vaso-dilatantes. Cependant, l'intérêt principal a été consacré à l'activité antioxydante des flavonoïdes, en raison de leur capacité à réduire la formation de radicaux libres et à les éliminer les radicaux libres (**Carocho et Ferreira, 2013b; Cushnie et Lamb, 2011; Catarino *et al.*, 2016**).

La capacité des flavonoïdes à agir comme antioxydants *in vitro* a fait l'objet de plusieurs études au cours des dernières années et la corrélation importante structure-activité de l'activité antioxydante a été établie. L'efficacité antioxydante des flavonoïdes *in vivo* est moins documentée, vraisemblablement en raison de la connaissance limitée de leur absorption chez l'homme (**Terao, 2009**).

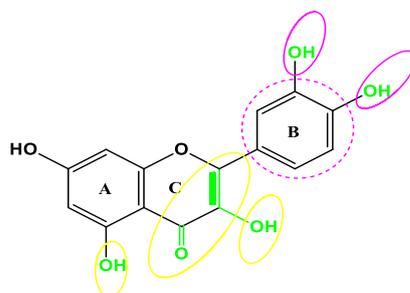
Les flavonoïdes ingérés sont considérablement dégradés en divers acides phénoliques, dont certains possèdent encore une capacité de piégeage des radicaux. Les flavonoïdes absorbés et leurs métabolites peuvent présenter une activité antioxydante *in vivo*, ce qui est démontré expérimentalement par l'augmentation du statut antioxydant plasmatique, l'effet protecteur sur la vitamine E, des membranes érythrocytaires et les lipoprotéines de faible densité, et la préservation des acides gras polyinsaturés à membrane érythrocytaire (**Pietta, 2000**). Selon Halliwell et Gutteridge, (2015), plusieurs mécanismes d'action antioxydant existent dont la suppression indirecte de la formation d'espèces réactives de l'oxygène:

- soit par l'inhibition des enzymes responsables de la production des E.R.O;
- la chélation des ions métalliques responsables de la production des E.R.O;
- le piégeage direct des radicaux libres par transfert d'un électron ou d'un hydrogène;
- l'inhibition de la peroxydation lipidique;
- la régulation ou la protection du système de défense antioxydant.

Généralement l'activité antioxydante des flavonoïdes dépend de (**Nenadis *et al.*, 2004; Terao, 2009**):

- la structure ortho-dihydroxy sur le cycle B;
- la présence de la double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo;
- la présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3;
- le nombre et la position des groupes hydroxylés,
- la glycosylation ou non des flavonoïdes.

La quercétine possède les trois premiers critères et généralement elle donne la plus forte activité que les autres flavonoïdes (**Ozgen *et al.*, 2016**) (**Figure 8**).



**Figure 8.** Structure de la quercétine montrant les principaux sites contribuant à l'activité de piégeage des radicaux libres par les flavonoïdes

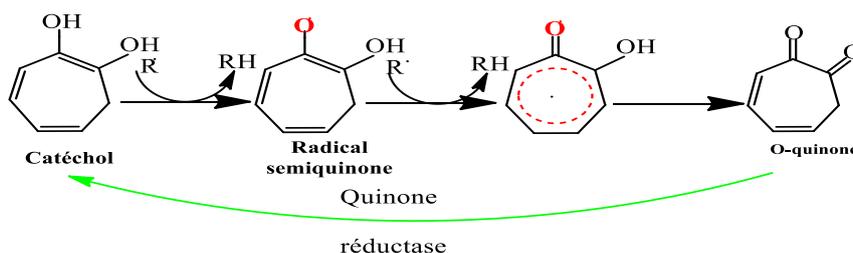
### II.7.1. Piégeage des radicaux libres

Les flavonoïdes avec leur structure sont capables de réduire les radicaux libres tel que l'anion superoxyde, les radicaux: hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ), alkoxy et peroxy, par le transfert d'hydrogène, selon la réaction suivante:



Où  $\text{R}^\bullet$ : représente le radical et  $\text{FL-O}^\bullet$ : un radical flavonoxyl qui peut réagir avec un autre radical et donner un composé stable (**Figure 9**)

De nombreuses études ont montré qu'il existe des relations entre la structure chimique des flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux libres (**Pietta, 2000**).



**Figure 9.** Mécanisme de piégeage d'un radical par les flavonoïdes (**Terao, 2009**)

### II.7.2. Inhibition de la peroxydation lipidique

Le stress oxydant a été impliqué dans les différentes situations pathologiques à cause de la superproduction des E.R.O qui oxydent et endommagent les macromolécules tels que l'ADN, les protéines, les lipides et les membranes cellulaires. Les E.R.O sont responsables de l'altération des acides gras insaturés, l'attaque sur cette molécule en présence de l'oxygène entraîne une oxydation en chaîne et s'appelle la peroxydation lipidique qui se décompose en trois étapes: l'initiation, la propagation et la terminaison (**Figure 10**);

✓ la première phase est l'initiation qui est due à l'attaque d'une espèce radicalaire (radicaux hydroxyles, alkoxy, peroxy, l'oxygène singulet ou le peroxydinitrite) suffisamment

réactive pour arracher un hydrogène du groupement méthylène bis-allylique situé en  $\alpha$  d'une double liaison (hydrogène le plus labile) d'un acide gras polyinsaturé (LH) pour former un radical pentadiényl ( $L^{\bullet}$ );

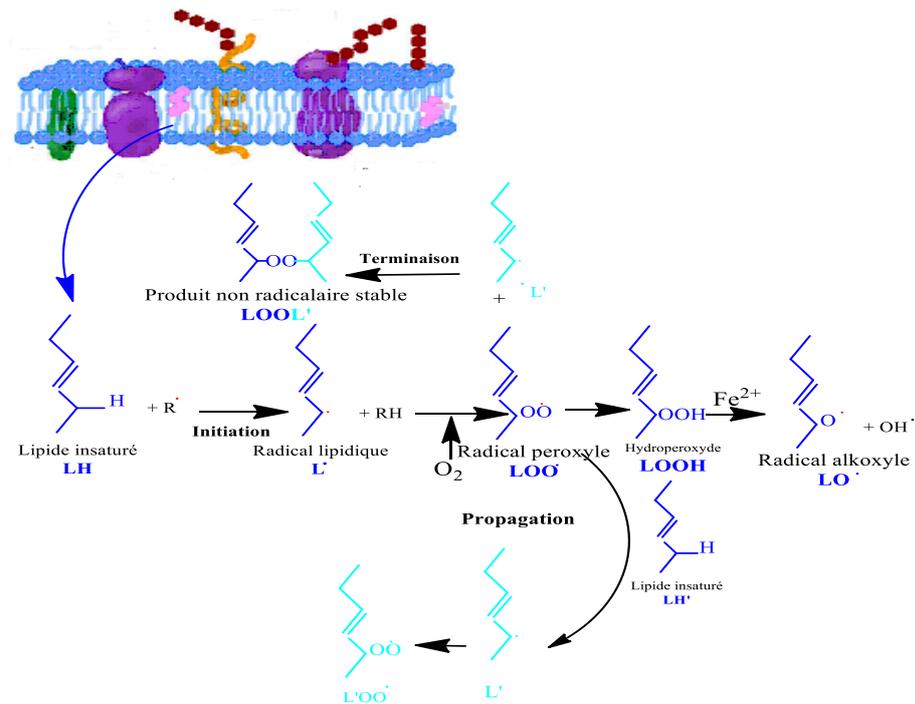
✓ puis au cours de la propagation, ce radical se stabilise par réarrangement intramoléculaire en formant un diène conjugué capable de réagir facilement avec l'oxygène pour donner un radical peroxyde,  $LOO^{\bullet}$  qui peut à son tour réagir avec une autre molécule d'acide gras adjacente (LH), formant sous l'action des métaux ( $Fe^{2+}$  ou  $Cu^{+}$ ), un hydroperoxyde lipidique ( $LOOH$ ) et un autre radical lipidique (des radicaux alcoxyles ( $LO^{\bullet}$ ) et hydroxyles ( $HO^{\bullet}$ ) créant ainsi une réaction en chaîne (propagation);

✓ enfin, la terminaison achève le processus en formant une molécule lipidique non radicalaire ( $LOOL'$ ) telle que la dimérisation (combinaison) entre deux radicaux peroxydes (**Michel *et al.*, 2008**).

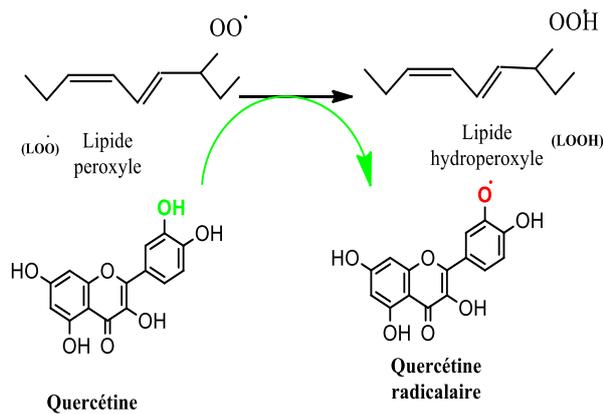
Les flavonoïdes peuvent intervenir dans tous les processus de la peroxydation lipidique par (**Bors *et al.*, 1992**):

✓ Piégeage direct des radicaux alcoxyles et peroxydes ou interruption du processus de propagation et arrêt de l'oxydation en chaîne (**Figure 11**).

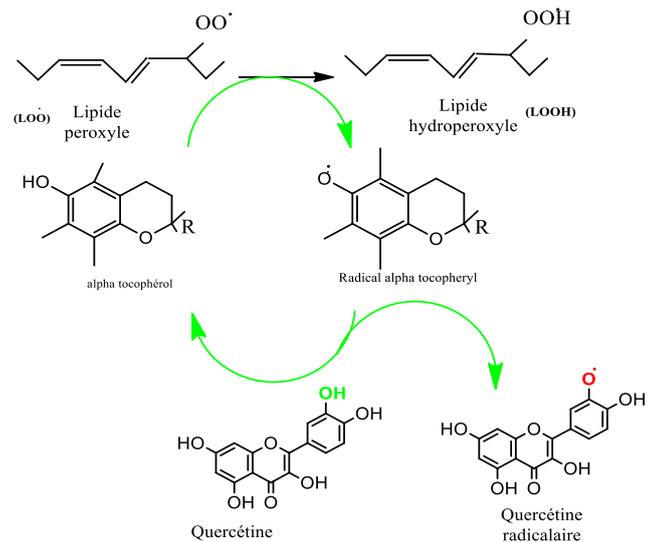
✓ Ou de manière indirecte par la régénération de  $\alpha$ -tocophérols pendant la réduction de radical  $\alpha$ -tocophéryl connu pour son rôle dans la protection oxydative des membranes lipidiques. Elle arrête la réaction radicalaire en chaîne en transformant les radicaux en espèces non radicalaires et en devenant elle-même un nouveau radical faiblement réactif appelé  $\alpha$ -tocophéryle (**Figure 12**). Les flavonoïdes interviennent à ce niveau en cédant un atome d'hydrogène et son électron à la vitamine E qui pourra participer de nouveau à la neutralisation des E.R.O.



**Figure 10.** Phases d'initiation, de propagation et de terminaison de la peroxydation lipidique. R<sup>•</sup>: radical initiateur (ERO); LH: acide gras polyinsaturé; L<sup>•</sup>: radical lipidique; LOO<sup>•</sup>: radical peroxyde; LOOH: hydroperoxyde; LO<sup>•</sup>: radical alkoxyde; •OH: radical hydroxyle; O<sub>2</sub>: oxygène; LOOL: produit stable.



**Figure 11.** Neutralisation d'un lipide peroxyde par la quercétine



**Figure 12.** Neutralisation d'un lipide peroxyde par l' $\alpha$ -tocophérol et la régénération de ce dernier par la quercétine

### II.7.3. Chélation des ions métalliques

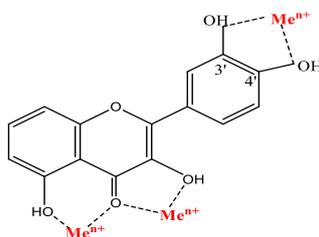
Un certain nombre de flavonoïdes chélate efficacement les métaux, qui jouent un rôle important dans le métabolisme de l'oxygène. Le fer ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et le cuivre ( $\text{Cu}^+$ ) libres ont un potentiel amplificateur pour la formation des espèces réactives d'oxygène, à titre d'exemple; lors d'une réaction de fenton: la réduction de peroxyde d'hydrogène provoque la formation du radical hydroxyle et des complexes métalliques stables (**Pokorny *et al.*,2001; Zhang et Tsao, 2016**).



Néanmoins, il faut se rappeler que ces ions métalliques sont essentiels pour de nombreuses fonctions physiologiques: des constituants des hémoprotéines et cofacteurs de différents enzymes, y compris celles impliquées dans la défense antioxydante (fer pour catalase, et Cu,Zn-superoxyde dismutase). La capacité des flavonoïdes de chélation c'est-à-dire l'inhibition de la réaction de Fenton est liée à leur structure chimique (**Rice-Evans *et al.*, 1996; Heim *et al.*, 2002**). Les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques sont (**Figure 13**):

- le noyau de catéchol sur le cycle B (pyrocatéchol ou 1,2-dihydroxybenzène) qui considère comme étant un principal contributeur à la chélation des métaux,
- les groupements 3-hydroxyle et le 4-oxo dans le cycle hétérocyclique,
- Les groupements 4-oxo, 5-hydroxyle entre le cycle hétérocyclique et le cycle A.

Les flavonoïdes sont considérés comme des bons chélateurs de ces ions métalliques (**Brown, 1998; Fernandez *et al.*, 2002**).



**Figure 13.** Sites de liaisons des métaux aux flavonoïdes

### II.7.4. Inhibition des enzymes

Les flavonoïdes inhibent les enzymes responsables de la production d'anion superoxyde; telle que la xanthine oxydase et la protéine kinase C. Les flavonoïdes sont capable d'inhiber la cyclooxygénase, la lipoxygénase, la monooxygénase microsomale, la glutathione S-transferase,

la succinoxidase mitochondriale, et la NADH oxydase. Toutes ces enzymes sont impliquées dans la production des espèces des E.R.O (Pokorny *et al.*, 2001).

### III. Autres activités biologiques

#### III.1. Activité anti-inflammatoire

##### III.1.1. Inflammation et les agents inflammatoires

L'inflammation est considérée comme une réponse physiologique pour éliminer les blessures ou les stimuli nocifs tels que les pathogènes, les cellules endommagées ou les irritations. C'est l'élément central de nombreuses pathophysiologies comme l'athérosclérose, l'obésité, le syndrome métabolique, le diabète (Leonoudakis *et al.*, 2017) et même de plusieurs types de cancers (Ci *et al.*, 2017). Lorsque les cellules sont exposées à des stimulants immunitaires, les cellules pro-inflammatoires, telles que les macrophages, les monocytes ou d'autres cellules hôtes, commencent à produire des cytokines et d'autres médiateurs, qui initient le processus d'inflammation.

Parmi les divers médiateurs inflammatoires, il existe les plus communs (TNF- $\alpha$ ), facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1), type inductible cyclo-oxygénase-1 (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL- (COX-2), la prostaglandine E2 (PGE2), la 5-lipoxygénase (5-LOX) et l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) qui conduit à la production d'espèces réactives de l'azote tel que l'oxyde nitrique (NO) (Tak et Firestein, 2001). La surproduction de ces médiateurs inflammatoires conduit à différents types de dommages cellulaires (Zhao *et al.*, 2017).

Les macrophages sont la première ligne de défense contre les agents pathogènes envahissants. Ce sont de grandes cellules spécialisées qui digèrent les débris cellulaires, les microbes et les cellules cancéreuses dans le processus est appelé phagocytose. Elles jouent des rôles importants dans les mécanismes de défense (Dar'ya *et al.*, 2018).

La production de ces médiateurs dans les cellules inflammatoires augmente l'exposition aux stimulants immunitaires, y compris l'endotoxine lipopolysaccharidique bactérienne (LPS) ou les protéines virales (Cruz *et al.*, 2017). Ce composé bactérien initie plusieurs signaux de voies de transduction qui sont au cœur de la pathogenèse de l'inflammation (Taofiq *et al.*, 2016).

### III.1.2. Agents anti-inflammatoires et mécanismes d'action

Les objectifs thérapeutiques globaux dans le traitement de l'inflammation sont le soulagement de la douleur qui est souvent le système de présentation et la principale plainte continue du patient; et ralentir ou, en théorie, arrêter le processus de détérioration des tissus. (Hanáková *et al.*, 2017). Parmi les principaux agents anti-inflammatoires, on peut classer:

-les anti-inflammatoires stéroïdiens «glucocorticoïdes» qui sont des dérivés synthétiques de la cortisone et des anti-inflammatoires puissants doués également de propriétés immunomodulatrices et antiallergiques (Taofiq *et al.*, 2016);

-et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) qui sont habituellement les médicaments les plus communément administrés pour réduire l'inflammation dans le corps (Doat *et al.*, 2017). De nombreuses études ont toutefois montré que l'administration à long terme d'AINS peuvent avoir des effets secondaires importants sur le tractus gastro-intestinal avec de nombreux effets nocifs tels que des lésions muqueuses, des saignements, des ulcères peptiques et une perforation intestinale (Firestein et McInnes, 2017). Elles sont également associées à une incidence relativement élevée d'effets indésirables rénaux, syndrome néphrotique, d'hypertension artérielle, de nécrose tubulaire aiguë et de toxicité cardiovasculaire (Antman, 2017; Grosser *et al.*, 2017). Il est donc urgent de trouver des traitements médicamenteux plus sûrs et plus efficaces. À cet égard, les plantes médicinales et les remèdes à base de plantes ont été utilisés en médecine complémentaire et alternative (CAM) pour le traitement de l'inflammation et des troubles associés aux inflammations (Javadi et Sahebkar 2017). Les substances naturelles sont de bonnes ressources pour le développement de composés thérapeutiques à potentiel anti-inflammatoire sans ou avec des effets toxiques plus faibles (Catarino *et al.*, 2016). Plusieurs composés bioactifs provenant de plantes (Malik *et al.*, 2017), de rhizomes (Shin *et al.*, 2015), des champignons (Taofiq *et al.*, 2016) et d'algues marines (Fernando *et al.*, 2016) ont été isolés et leurs effets anti-inflammatoires étudiés par divers mécanismes. Les anti-inflammatoires naturels tels que les polyphénols agissent en inhibant les enzymes cyclo-oxygénases intracellulaires qui ont deux isoformes (COX-1 et COX-2), oxyde nitrique synthase (iNOS) et les lipoxygénases (LOX), et par conséquent diminuer leurs sous-produits respectifs NO, prostaglandines et leucotriènes (Catarino *et al.*, 2016). Les cyclo-oxygénases sont des enzymes impliquées dans le processus d'inflammation, elles catalysent l'étape limitant la vitesse dans la biosynthèse de prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes de l'acide arachidonique (Taofiq *et al.*, 2015; Malik *et al.*, 2017). Le meilleur modèle pour tester le potentiel anti-inflammatoire des

substances naturelles est les macrophages (**Tao et al., 2016**), qui sont de grandes cellules spécialisées qui englobent et digèrent les débris cellulaires, les microbes ou les cellules cancéreuses dans un processus appelé phagocytose. Ils jouent un rôle important dans les mécanismes de défense non spécifiques et aident à initier d'autres mécanismes de défense. Au-delà de la stimulation du système immunitaire, les macrophages jouent un rôle crucial dans la réponse inflammatoire par la libération d'une variété de facteurs, tels que NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, en réponse à une activation d'un stimulus, à titre d'exemple, lipopolysaccharide (LPS) utilisé couramment comme modèles *in vitro* dans des études liées à l'inflammation (**Cheng et al., 2017**).

### **III.2. Activité cytotoxique (anti-tumorale)**

#### **III.2.1. Cancer**

Le cancer est un terme général utilisé pour décrire un grand groupe de troubles caractérisés par une croissance incontrôlée de cellules anormales (**Kaur et al., 2009**). Ces cellules ont la capacité d'échapper à la surveillance par le système immunitaire, de se multiplier indéfiniment, d'envahir les tissus avoisinants et de se propager vers des sites distants du corps formant des métastases (**Fantini et al., 2015**).

#### **III.2.2. Substances cytotoxiques et mécanisme d'action**

De nombreux scientifiques concentrent leurs études sur la recherche de nouvelles stratégies pour la prévention du cancer. Une stratégie avec un potentiel prometteur est la "chimiothérapie" qui a été définie par Sporn en 1976 comme l'utilisation d'agents naturels, synthétiques ou biologiques pour supprimer ou prévenir soit les phases initiales de la cancérogenèse, soit la progression des cellules pré-malignes vers les maladies invasives (**Batra et Sharma, 2013**). Plusieurs études épidémiologiques suggèrent que la consommation régulière de fruits, de légumes les tisanes des plantes médicinales réduit de manière significative le risque de différents cancers. Les effets bénéfiques de ce type de régime sont en partie attribuables à leur teneur en composés phénoliques, qui ont montré des propriétés anti-tumorales prometteuses dans des diverses études *in vitro*, *in vivo* et même cliniques (**Yang et al., 2001**). Une substance anti-tumorale tend à lutter contre la tumeur, particulièrement elle vise sa destruction ou sa réduction. Les mécanismes de l'activité anti-tumorale sont suggérés par la régulation des voies NF-kappaB et c-Jun N-terminale kinase (JNK)/p38.

Il a également été prouvé que l'aciculatine induit la mort cellulaire dans les cellules cancéreuses humaines et les xénogreffes de souris HCT116 en raison de l'arrêt G1 suivi de

l'apoptose (Basli *et al.*, 2017). Bien que les plantes médicinales, les fruits et les légumes utilisés dans l'alimentation humaine soient reconnus comme ayant des effets anti-tumoraux, les composés phénoliques particulièrement les flavonoïdes présents dans les plantes sont des exemples de composés cytotoxiques, qui agissent par divers mécanismes, y compris l'inhibition de l'activation métabolique de divers pro-cancérigènes (Moein, 2015). Ces métabolites peuvent être facilement absorbés par les cellules et avoir des effets à la fois protecteurs et délétères. Ils peuvent bloquer l'initiation de la cancérogenèse par l'inactivation de molécules génotoxiques exogènes ou endogènes, y compris les espèces réactives de l'oxygène (Fantini *et al.*, 2015). Un autre mécanisme consiste à l'inhibition de l'activité et la synthèse d'enzymes métabolisant les carcinogènes, ils inactivent alors les enzymes de phase I (cytochrome P450) et détoxifient et éliminent du corps les molécules pro-carcinogènes par l'induction des enzymes de métabolisme de phase II (par exemple, GST, quinone réductase, et UDP-GT) (Raghu *et al.*, 2012), ils inactivent également l'expression des gènes régulés par NF- $\kappa$ B conduisant à une augmentation de l'apoptose cela aide à expliquer les effets chimio-préventifs des flavonoïdes contre la cancérogenèse (Moein, 2015; Basli *et al.*, 2017). Ainsi, l'utilisation d'extraits naturels en thérapeutique dépend en premier lieu de leur toxicité et de tous les effets synergiques et antagonistes entre les différents composés en eux. Bien qu'ils aient des avantages très prometteurs, de nombreux extraits ne sont plus étudiés en raison de leur haute toxicité (Álvarez Castro *et al.*, 2003; Moein, 2015).

### III.3. Activité antibactérienne

#### III.3.1. Bactéries pathogènes

Ce sont des bactéries qui sont responsables des maladies; les bactéries du genre *Staphylococcus*, *Pseudomonas* et *Enterococcus* sont les causes les plus fréquentes d'infections hospitalières des plaies cutanées tels que les ulcères, les escarres ou les brûlures qui entraînent de nombreux problèmes de cicatrisation (Grollier *et al.*, 2004; Le Floch *et al.*, 2015). Récemment, plus de 90% des *staphylocoques*, des *pneumocoques* et des *entérocoques* isolés d'infections graves ont été résistants aux antibiotiques (Jayaweera et Kumbukgolla, 2017), ainsi la demande de produits antibactériens continue d'augmenter. Le développement de la résistance bactérienne vis-à-vis les antibiotiques disponibles actuellement a nécessité de rechercher de nouveaux agents antibactériens (Fair et Tor, 2014). Ces substances antibactériennes sont à l'origine naturelle et on pense que leurs influences sur l'environnement sont peu nombreuses et peuvent être utilisées comme agents de lutte biologique (Fankam *et al.*, 2017).

### III.3.2. Agents antibactériens, classification et mécanismes d'action

Dans une tentative de combattre les diverses formes de maladies qui ont continué à affliger les humains depuis des temps immémoriaux jusqu'à ce jour, différents types d'antibactériens ont été développés pour combattre les pathogènes responsables de ces maladies. Les antibactériens détruisent ou inhibent la croissance des microorganismes (**Zeng et al., 2017**), ils pourraient être:

-des antibiotiques qui sont utilisés dans le traitement des infections bactériennes et peuvent être obtenus à partir de sources naturelles ou synthétiques (**Li, Xin et al., 2017**). Aujourd'hui, les antibiotiques sont cruciaux non seulement pour le traitement des infections bactériennes, mais aussi pour la couverture prophylactique des patients à haut risque, par ex. ceux en soins intensifs, les greffes d'organes, la chimiothérapie anticancéreuse et les soins prénataux (**Qiao et al., 2018**). Cependant, ces gains sont maintenant sérieusement compromis par l'émergence et la propagation rapides de microbes résistants aux antimicrobiens (**MacGowan et Macnaughton, 2017**);

-des peptides antibactériens produits par des organismes complexes ainsi que certaines bactéries (**Duquesne et al., 2007**);

-des substances naturelles à base des plantes médicinales, qui semblent être au centre de la médecine traditionnelle aujourd'hui. La résistance croissante à l'antibiotique représente le principal facteur justifiant le besoin de trouver et/ou de développer nouveaux agents antimicrobiens (**Cushnie et al., 2011**).

Ainsi, certaines études ont axé sur les agents antimicrobiens dérivés de plantes (polyphénols et les huiles essentielles), qui ont été utilisés pendant longtemps en médecine traditionnelle pour surmonter les infections (**Bouyahya et al., 2017**). Des recherches antérieures sur les polyphénols principalement les flavonoïdes montrent leur activité bactéricide directe de trois manières différentes: dommages de la membrane plasmique bactérienne par la diminution de la fluidité membranaire, effet inhibiteur sur le métabolisme énergétique bactérien et inhibition de la synthèse des acides nucléiques (**Djahra et al., 2012; Zacchino et al., 2017**).

PARTIE II.

---

MATÉRIEL ET MÉTHODES

## I. Équipement, solvants, réactifs et standards utilisés

Au cours de cette étude, divers solvants, réactifs, standards commerciaux ainsi que différentes techniques analytiques exigeant divers dispositifs ont été employés. Tous les produits chimiques et réactifs utilisés sont soulignés dans le tableau 7.

**Tableau 7.** Solvants, réactifs, standards commerciaux et matériels divers utilisés

Produits et matériel utilisés	
Solvants organiques	Acétate d'éthyle (99.8%; Fisher Scientific), Acétonitrile (MerckKgaA-Darmstadt), Butanol (99%; Lab-Scan), Chloroforme, Ethanol, Méthanol.
Acides et bases	Acide acétique, Acide formique (Prolabo-VWR International), TCA: Acide trichloracétique (Panreac-Barcelone), Formiate d'ammonium, Hydroxyde de sodium (NaOH), Hydroxyde de potassium (KOH).
Standards commerciaux utilisés	Acide gallique, Apigénine-C-glucoside, Acide protocatéchine, (+)-Catéchine, Acide <i>p</i> -coumarique, (-)-Epicatéchine, Kaempférol-3- <i>O</i> -rutinoside, Myricétine, Naringénine, Quercétine-3- <i>O</i> -rutinoside, Quercétine-3- <i>O</i> -glucoside et (Extrasynthèse- Genay).
Réactifs et milieux	Acide ascorbique (Panreac-Barcelone), Acide linoléique (Sigma-Aldrich- St. Louis), Acide thiobarbiturique (Accros- Geel), DPPH: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (Alfa Aesar-Ward Hill), $\beta$ -carotène, Trolox: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroman-2-carboxylic acid (Sigma-Aldrich), Tween 80 (Panreac), Gélose tryptique de soja, Milieu tryptique de soja (Bouillon, TSB) ( <i>Tryptic Soy Broth</i> ) et Gélose Mueller-Hinton (MH) (Sigma-Aldrich), INT: iodonitrotétrazoliumchloride (Panreac), Sulphorhodamine B (SRB), Bleu trypan, une solution pénicilline/streptomycine (100 U mL <sup>1</sup> et 100 mg mL <sup>1</sup> , respectivement), L-glutamine, Acides aminés, Ellipticine, Dexaméthasone, Trypsine-EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) (Sigma-Aldrich), milieux RPMI-1640 ( <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> ), DMEM, Sérum bovin fœtal (SBF) et solution Hank's balanced salt (Hyclone- GE Healthcare Life Sciences).
Tampons	Tris (hydroxyméthyl-aminométhane)-HCl (Molekula-Newcastle), Tampon phosphate dissodique (Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O).
Sels	Chlorure ferrique(FeCl <sub>3</sub> ), Ferricyanure de potassium (K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> ), (Sigma-Aldrich), Sulfate de fer (II) (FeSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O) (Ficher Scientific-Porto).
Appareils	Agitateur magnétique, ampoule à décanter de 2 L, bain-marie thermostaté, balance de précision, centrifugeuse à flacons coniques (Centurion, K2OR-2003, West Sussex, UK), centrifugeuse à tubes Eppendorf (Labofuge 200, Hanau, Allmond), chauffe ballon, distillateur Milli-Q (TGI Pure Water System, Greenville, USA), évaporateur rotatif R210 (Büchi, Flawil Swaziland), étuve, hotte, incubateur (Memmert INC123, Schwabach, German), microscope inversé,

---

lecteur de microplaques ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc.; Winooski, Vermont, USA), lyophilisateur, spectrophotomètre HPLC-UV-VIS Youngline, LC/MS (DionexUltimate 3000 UPLC, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA), réfrigérant, pompe, lyophilisateur (Gardiner, NY, USA), spectrophotomètre UV-Visible (Analytikjena 200, Jena, Allmond), ultrason, vortex.

---

Les différents solvants utilisés dans cette étude sont de qualité analytique.

## II. Matériel végétal: choix et identification des espèces étudiées

Les plantes étudiées ont été choisies sur la base de leur intérêt et leur fréquence d'emploi grâce à l'enquête ethnobotanique effectuée au cours de cette étude. Les plantes choisies sont *Myrtus nivelii* (Myrtaceae), *Osyris quadripartita* (Santalaceae) et *Tetraclinis articulata* (Cupressaceae).

✓ Les feuilles de *Myrtus nivelii* sont collectées dans la région du Tassili (latitude: 25.8135947; longitude: 8.1338558; altitude: 1287 m) et authentifiées par Docteur Sahki Rabéa (INRF de Tamanrasset, Algérie) en novembre 2013.

✓ Les feuilles d'*Osyris quadripartita* et de *Tetraclinis articulata* sont prélevées dans la région de Misserghin (latitude: 35.5852064; longitude: -0,7722974; altitude: 83 m) en Mai 2013 et Septembre 2016, respectivement. Ces deux dernières plantes ont été botaniquement identifiées par le professeur Marouf Abderrazak «Centre Universitaire de Naama, Algérie».

Les feuilles de ces plantes sont séchées à l'air libre puis broyées à l'aide d'un broyeur en poudre fine  $\approx$  40 mech et conservées dans des flacons sombres à température ambiante pour les études ultérieures.

## III. Composés bioactifs et la bio-activité des extraits des plantes

L'évaluation des propriétés biologiques des extraits des plantes a été effectuée par l'étude de leurs activités antioxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes et anti-tumorales.

### III.1. Préparation des extraits des plantes

La préparation des échantillons biologiques doit suivre les procédures garantissant l'absence de modification de leurs propriétés entre l'échantillonnage et les essais chimiques et la caractérisation d'une activité biologique par blocage de toute activité enzymatique. La surgélation dans de l'azote liquide est très efficace à condition de ne pas décongeler partiellement les échantillons avant l'extraction des métabolites. Nous avons opté pour la lyophilisation qui permet une manipulation plus aisée des échantillons et évite l'activité enzymatique. Les conditions d'extraction tels que la température, le temps, et le solvant d'extraction ont une

grande influence sur le type et la quantité de métabolites extraits (**Iloki-Assanga et al., 2015**). Le processus d'extraction doit être compromis entre la récupération des certaines classes de composés et la minimalisation de la décomposition des métabolites (**Tasioula-Margari et Tsabolatidou, 2015; Magwaza et al., 2016**).

Une extraction aqueuse sous reflux suivie par un partage liquide-liquide a été utilisée pour l'extraction des composés phénoliques qui permet l'extraire des formes libres, des esters et des hétérosides (**Bruneton, 2009**). Les extraits sont préparés de la même manière pour toutes les plantes testées.

### **III.1.1. Préparation de l'extrait aqueux par extraction sous reflux**

Les feuilles de *M. nivelii*, *O. quadripartita* et *T. articulata* préalablement nettoyées et broyées sont mises à décocter par un chauffage jusqu'à l'ébullition (eau distillée) sous reflux pendant 30 min dans un rapport de 1/10 (10 %, p/v). Cette extraction est répétée trois fois. Par la suite, l'extrait aqueux refroidi et récupéré après filtration à l'aide d'un entonnoir de Büchner. Les extraits sont ensuite réunis, congelés puis lyophilisés, permettant ainsi d'obtenir un extrait sec qui est considéré comme étant l'extrait brut. Les extraits lyophilisés sont conservés à une température de 4°C jusqu'à utilisation.

### **III.1.2. Extraction de partage liquide-liquide**

L'extrait brut lyophilisé (20 g) est solubilisé dans l'eau distillée (200 mL) puis soumis à un partage à l'aide d'une ampoule à décanter à l'aide de trois solvants à polarité croissante (**Figure 14**): chloroforme (polarité = 1.48; 200 mL), acétate d'éthyle (polarité = 0.894; 200 mL) et *n*-butanol (polarité = 0.810; 200 mL). L'extraction est faite à température ambiante à l'issue de laquelle les fractions obtenues sont évaporées à l'aide d'un évaporateur rotatif puis récupérées et conservées à l'obscurité et à 4°C jusqu'à analyse. L'extrait brut et les deux fractions acétate d'éthyle et *n*-butanol de chaque plante sont utilisés pour tous les tests.

L'extrait aqueux et leurs fractions organiques sont dissouts dans:

-l'eau désionisée et l'eau désionisée/méthanol (80:20) à une concentration de 5 mg/mL pour la détermination du profil des composés phénoliques.

-l'eau désionisée et le méthanol à une concentration de 5 mg/mL pour l'évaluation de l'activité antioxydante.

-dans le milieu de culture à une concentration de 20 mg/mL pour la détermination de l'activité antibactérienne.

-dans l'eau désionisée à une concentration de 8 mg/mL pour l'estimation des activités anti-inflammatoire et anti-tumorale. Pour effectuer les essais de bioactivité, les solutions stock sont ultérieurement diluées et testées.

### III.1.3. Détermination du rendement

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant ou après lyophilisation. Il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse sèche initiale de la plante soumise à l'extraction, et calculé selon la formule suivante:

$$R(\%) = \frac{m}{M_i} \times 100$$

R(%): Rendement en composés phénoliques (%)

m: masse obtenue après évaporation ou lyophilisation (g)

M<sub>i</sub>: masse sèche initiale du matériel végétal (g)

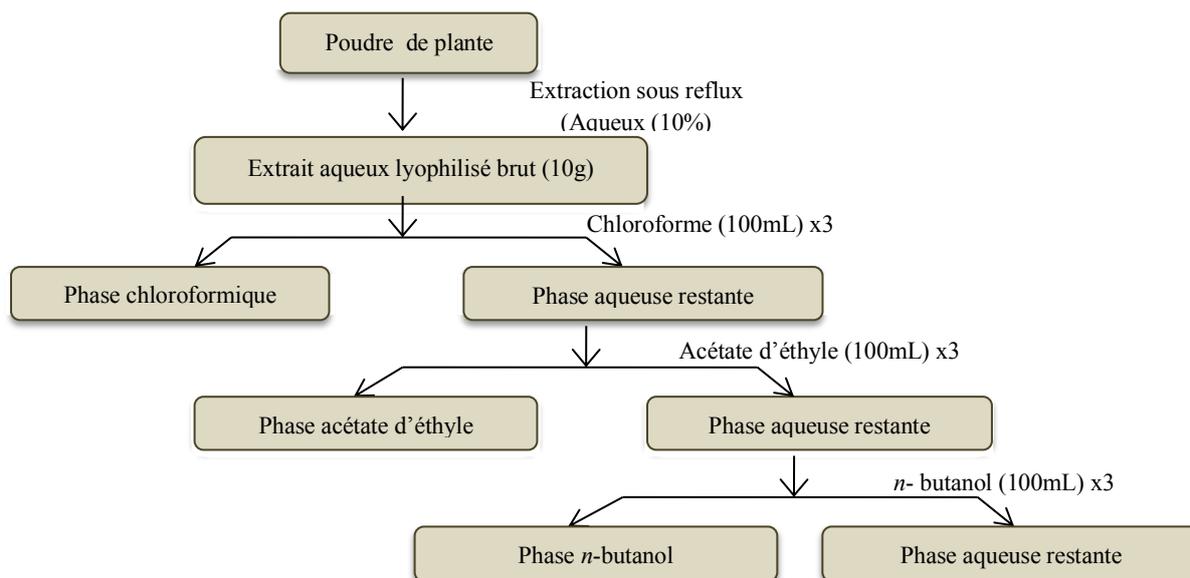


Figure 14. Procédure de partage liquide-liquide

## III.2. Composés phénoliques

### III.2.1. Principe

Les composés phénoliques sont l'un des groupes qui présentent diverses activités biologiques et pharmacologiques dont l'identification et la quantification peuvent donner une idée sur leur grande contribution dans les différentes activités biologiques des plantes.

La détection des composés phénoliques est réalisée par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup>) analytique couplée à un détecteur UV à barrette de photodiodes (détection à 280 et 370 nm) contrôlé par un logiciel Xcalibure (software version 1.3) et à un spectromètre de masse (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany).

La détection par MS est effectuée en mode négatif déprotoné en utilisant un spectromètre de masse linéaire trappe d'ion ou piège à ions quadripolaire (Ion Trap LTQ XL, Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) équipé par une source d'ionisation appelée Electro-nébuliseur (ESI; *Electrospray Ionization*). Les spectres sont enregistrés en mode d'ionisation chimique négative MS<sup>2</sup> entre -m/z 100 et 1700.

L'identification des composés phénoliques est effectuée en utilisant des composés standard, lorsqu'ils sont disponibles, afin de réaliser une comparaison de leurs temps de rétention, caractérisations UV-vis et spectres de masse; et aussi, par la comparaison des informations disponibles dans la littérature. Une fois que les composés phytochimiques sont déterminés, ils sont ensuite quantifiés au moyen d'une courbe d'étalonnage qui consiste à relier la mesure de l'aire du pic à la concentration effectuée à partir des étalons phénoliques du commerce en reportant les concentrations massiques en fonction de l'aire du pic. Dans le cas des composés phénoliques identifiés pour lesquels la substance de référence commerciale n'est pas disponible, la quantification est effectuée par une courbe d'étalonnage à l'aide du standard disponible le plus similaire. Les résultats sont exprimés en mg/g d'extrait.

### III.2.2. Méthodologie

La quantification et l'identification des composés phénoliques sont effectuées par HPLC-PDA-ESI/MS<sup>n</sup>, 20 µL de chaque extrait étudié sont dissous à l'aide d'un bain à ultrasons dans l'eau désionisée ou le méthanol (20%, eau désionisée) à une concentration de 5 mg/mL puis filtrés à l'aide de membranes filtrantes (Whatman, 0.2 µm). La méthodologie de la chromatographie utilisée dans cette étude a été précédemment décrite par Bessada *et al.* (2016).

Les analyses LC-MS sont effectuées dans les conditions détaillées dans le tableau 8. Le système HPLC utilisé comprend un système de pompage, un détecteur UV à barrette de photodiodes (PDA) dont la détection en double online est réalisée à deux longueurs d'ondes préférées dans la détection des composées phénoliques, 280 et 370 nm. Le détecteur est connecté à une trappe analyseur triple quadripolaire Quattro micro PDA 3200 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) avec une source (interface) electrospray (ESI) utilisée en mode d'ionisation négative pour la détection spectrométrique de masse, les spectres de masse sont enregistrés en mode d'ions négatif entre  $-m/z$  100 et 1700. La spectrométrie de masse permet de mesurer avec précision la masse d'une molécule selon son rapport masse/charge ( $m/z$ ). Cette analyse consiste en trois étapes, une étape d'ionisation, une étape d'accélération et une étape de détection.

Un spectromètre de masse est composé d'un système d'introduction de l'échantillon, d'une source d'ions, d'un analyseur qui séparent les ions selon leur  $m/z$  et d'un détecteur. Un gradient de solvant de 20 à 90 % B (v/v) est utilisé pendant 50 min pour les séparations. Le gradient d'élution isocratique a été établi à 15% pendant 5 min, 15 à 20% de B en 5 min, 20 à 25% de B en 10 min, 25 à 35% de B en 10 min, 35 à 50% pendant 10 min et la re-équilibration de la colonne a été réalisée en utilisant un débit de 0,5 mL/min. L'identification des molécules phénolique est réalisée sur la base de leurs spectres UV-Visible, leurs spectres de masse et la comparaison avec des étalons authentiques caractéristiques du groupe des substances étudiées. Chaque composé identifié par LC/MS est quantifié à l'aide d'une gamme d'étalonnage (20  $\mu$ L, 2.5-100  $\mu$ g/mL) réalisée avec des molécules de références pures : apigénine-*C*-glucoside ( $y = 107025x + 61531$ ;  $R=0.99$ ); (+)-catéchine ( $y = 84950x - 23200$ ); (-)-épicatéchine ( $y = 10314x + 147331$ ); kaempférol-3-*O*-glucoside ( $y = 11117x + 30861$ ); kaempférol-3-*O*-rutinoside ( $y = 11117x + 30861$ ); myricétine ( $y = 23287x - 581708$ ), quercétine-3-*O*-glucoside ( $y = 7769.9x - 343754$ ); quercétine-3-*O*-rutinoside ( $y = 13343x + 76751$ ); acide *p*-coumarique ( $y = 301950x + 6966.7$ ); naringénine ( $y = 18433x + 78903$ ); acide caféique ( $y = 388345x + 406369$ ); acide gallique ( $y = 11366x + 2^{e+6}$ ), acide protocatéchique ( $y = 214168x + 27102$ ), acide rosmarinique ( $y = 191291x - 652903$ ); acide ellagique ( $y = 26719x - 317255$ ); Acide *p*-hydroxybenzoïque ( $y = 208604x + 173056$ ). Les résultats sont exprimés en mg par g de l'extrait brut lyophilisé ou de la fraction en tant que moyenne  $\pm$  standard déviation. Les analyses LC-MS sont effectuées dans les conditions détaillées dans le tableau 8.

**Tableau 8.** Conditions chromatographiques des composés phénoliques

<b>Système</b>	Chromatographe en phase liquide Hewlett- Packard HP1100 équipé d'une pompe quaternaire, passeur automatique d'échantillon et détecteur UV (Agilent Technologies)
<b>Colonne (phase stationnaire)</b>	colonne Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 (4,6 x 150 mm, garnie de particules est de 3µm de silice greffée C18), colonne thermostatique à 35°C (Milford, Connecticut, USA)
<b>Phase mobile (Gradient)</b>	constituée de deux systèmes: (A) 0,1% de l'acide formique (HCOOH) dans l'eau ultra pure (v/v) (B) Acetonitrile (CH <sub>3</sub> CN), le gradient d'élution effectué est de 10 à 15% B pendant 5min, 15-25% B en 5 min, 25-35% B en 10 min, isocratique 50% B en 10 min et re-équilibre de la colonne en 50 min
<b>Débit</b>	0,5 mL/min
<b>Longueurs d'ondes</b>	280-370 nm
<b>Température</b>	35°C
<b>Software</b>	HPLC-Chemstation, Agilent Technologies, MS-Analyst®, Applied biosystem
<b>Autres conditions opératoires</b>	-Température du vaporiseur (350 °C) -Tension de la décharge couronne (6kV) -Température du capillaire de transfert (150 °C) -Gaz auxiliaire (azote ultra pur) dont gaz principal (70 unités arbitraires) et gaz de séchage (6 u.a)  Les expériences en mode MS/MS sont obtenues par collision dans la trappe avec de l'hélium

### III.3. Détermination des activités biologiques

Le screening des potentiels biologiques vise à mettre en évidence des extraits de plantes algériennes intéressants vis-à-vis du stress oxydatif. Dans ce contexte, trois plantes sont sélectionnées et quatre activités biologiques sont ont évaluées;

-dans un premier temps, l'activité antioxydante des extraits est évaluée *in vitro* par quatre tests biochimiques: la capacité de piégeage du radical libre DPPH, le pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP), le test de blanchissement du β-carotène et le test d'inhibition de la peroxydation lipidique en utilisant des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS).

-un test d'activité anti-inflammatoire est mené sur des macrophages murins (cellules RAW 264.7).

-la cytotoxicité des extraits végétaux est évaluée sur quatre lignées cellulaires cancéreuses humaines.

-enfin, l'activité antibactérienne est testée contre plusieurs souches bactériennes.

Avant l'étude de ces différentes activités biologiques, aucun criblage d'activité anti-inflammatoire, anti-tumorale ou antibactérienne n'a été réalisé sur les espèces végétales étudiées.

### III.3.1. Détermination de l'activité antioxydante

Dans cette partie expérimentale, deux volets sont envisagés:

- ✓ le premier volet concerne l'extraction des substances polaires particulièrement les composés phénoliques par l'eau désionisée suivie par un partage liquide-liquide à l'aide de trois solvants à polarités croissantes puis l'identification et la quantification de ces composés.
- ✓ dans le deuxième volet, consiste à étudier les activités biologiques des extraits polaires des plantes étudiées. Parmi ces activités, le potentiel le plus important est représenté par le pouvoir antioxydant. Pour l'évaluer, quatre tests généralement sont utilisés pour les plantes médicinales. Ces essais sont globalement classifiés selon leur mécanisme d'action en deux grandes catégories comme:
  - ✓ des désactivateurs (quencher) de l'oxygène singulet (*single-electron transfert*; SET) essentiellement représentés par la méthode de pouvoir antioxydant de réduction de fer (FRAP) et la méthode de piégeage de radical libre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
  - ✓ des donneurs d'hydrogène (*hydrogen-atom transfert*; HAT) concernant l'essai d'inhibition de blanchissement de  $\beta$ -carotène et le test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS).

#### III.3.1.1. Préparation des extraits et détermination d'IC<sub>50</sub>

Les extraits aqueux lyophilisés sont dissous dans l'eau et les fractions acétate d'éthyle et butanol sont dissoutes dans le méthanol à une concentration de 5 mg/mL, par la suite, une série des dilutions a été effectuée à partir des solutions de stock. Les résultats sont exprimés en valeur d'IC<sub>50</sub> qui correspond à la concentration d'extrait qui donne 50% de l'activité antioxydante ou la dose capable d'inhiber 50% du processus oxydatif. Celle-ci est calculée à partir de l'équation suivante:

$$IC_{50} = \frac{(x_2 - x_1)}{(y_2 - y_1)} \times (50 - y_1) + x_1$$

Où:  $x_1$ : la concentration d'extrait ayant un pourcentage d'inhibition au-dessous de 50%.

$x_2$ : la concentration d'extrait ayant un pourcentage d'inhibition au-dessus de 50%.



$y_1$ : le pourcentage d'inhibition qui correspond à la concentration  $x_1$

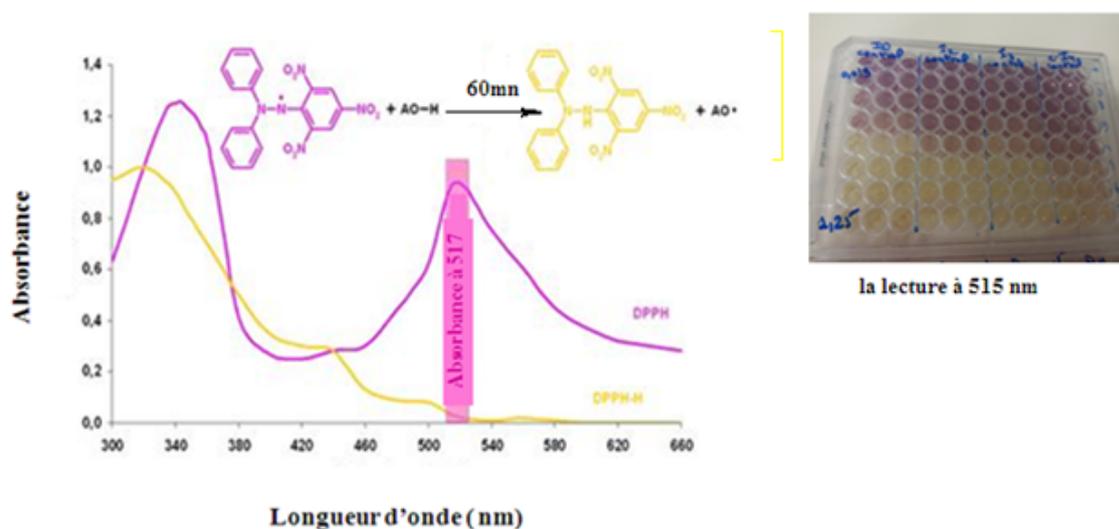
$y_2$ : le pourcentage d'inhibition qui correspond à la concentration  $x_2$

### III.3.1.2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

#### III.3.1.2.1. Principe

Cette méthode introduite par Blois (1958) est basée sur le principe de donner un atome d'hydrogène au DPPH (Sigma,  $C_{18}H_{12}N_5O_6$  ; MM = 394.33) en présence d'un antioxydant. Dans cette méthode colorimétrique, les antioxydants (AH) se comportent comme des donateurs d'atomes d'hydrogène en réduisant le radical diphényl picryl-hydrazyl qui est un radical libre stable (DPPH $^{\bullet}$ ) soluble dans le méthanol ou l'éthanol, d'une couleur violette en forme réduite non radicalaire, diphényl picryl-hydrazine (DPPH-H), de couleur jaune (**Figure 15**), (Pokorny *et al.*, 2001; Roginsky et Lissi, 2005; Boligon *et al.*, 2014). En solution, il présente une absorbance maximale à 517 nm; lors d'une réaction avec un antioxydant, une réduction se traduit par une diminution de l'absorbance de la solution de DPPH $^{\bullet}$ .

Ce test est largement utilisé comme un test préliminaire pour l'étude du pouvoir antioxydant (Goupy *et al.*, 2003) d'une large gamme de composés tels que les polyhydroxy aromatiques (composés phénoliques), les acides aminés aromatiques, le glutathion, l' $\alpha$ -tocophérol et l'acide ascorbique impliqués dans les plantes (Craft *et al.*, 2012).



**Figure 15.** Description du mécanisme réactionnel entre le radical 2-2 Diphényl-1-picrylhydrozyl et un antioxydant (AH) (Boligon *et al.*, 2014).

### III.3.1.2.2. Méthodologie

L'activité antioxydante des extraits est testée *in vitro* selon la méthode décrite par Barros *et al.* (2013). Cette méthodologie est effectuée à l'aide d'un lecteur de microplaques ELX800 (Bio-Tek) à 96 puits selon les étapes suivantes: 30  $\mu\text{L}$  de différentes concentrations de chaque extrait (en triplicat) sont déposés sur la microplaque, 270  $\mu\text{L}$  de la solution méthanolique de DPPH ( $6 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$ ) y sont mélangés. Le mélange est incubé à l'obscurité pendant 60 min. La réduction du radical DPPH est déterminée par la mesure de l'absorbance à 515 nm. Les extraits sont testés contre un blanc qui contient la solution de DPPH incubée dans les mêmes conditions que les échantillons. Le Trolox est utilisé comme un témoin positif (substance de référence). Le pourcentage de la décoloration de DPPH est calculé selon l'équation suivante:

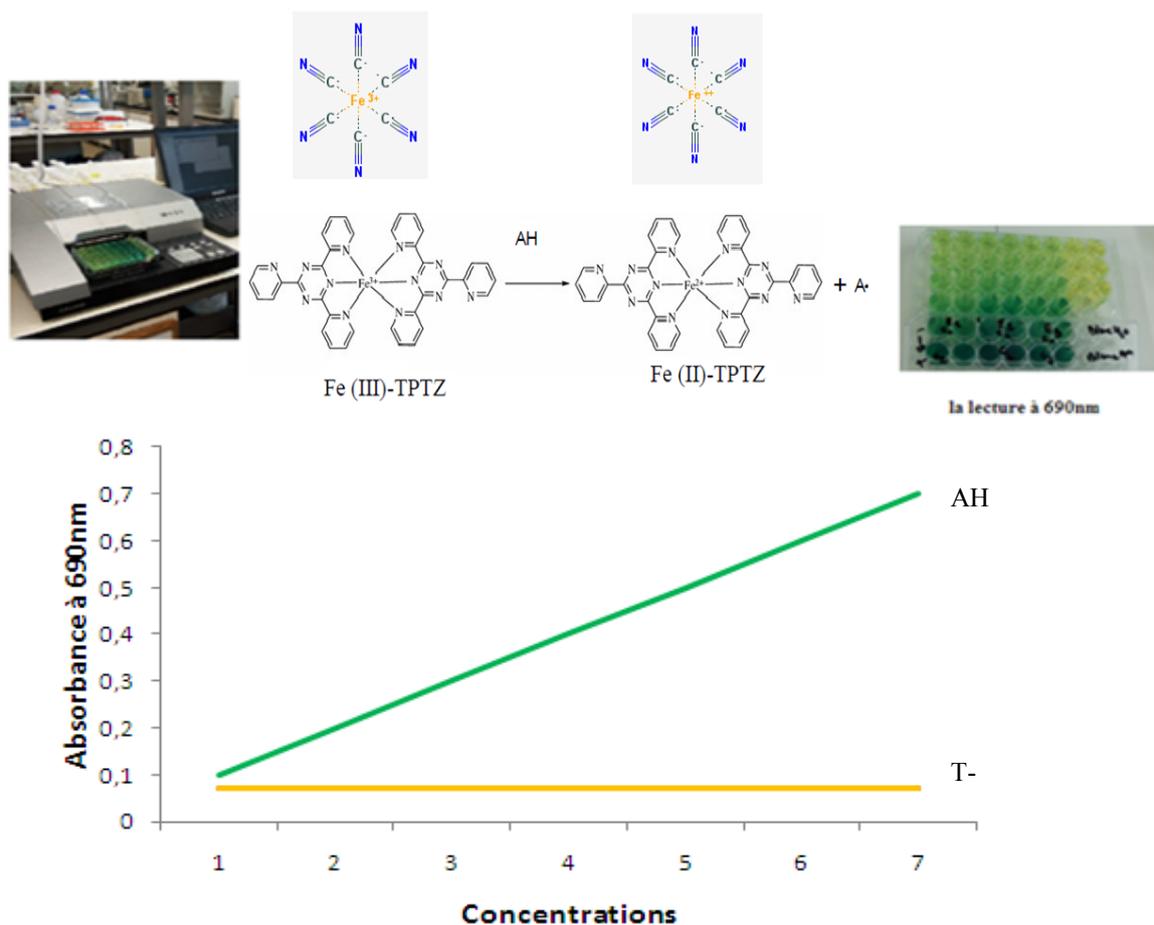
$$\text{IP \%} = (A \text{ DPPH} - A \text{ Extrait}) / A \text{ DPPH} \times 100.$$

$A \text{ DPPH}$ : Absorbance de solution DPPH;  $A \text{ Extrait}$ : Absorbance de la solution contenant l'extrait.

### III.3.1.3. Méthode du pouvoir antioxydant de réduction de fer (FRAP)

#### III.3.1.3.1. Principe

L'évaluation de réduction de fer (*Ferric ion Reducing Antioxidant Power*) est basée sur la présence d'un réducteur dans les extraits qui provoque la réduction de complexe de forme ions ferriques  $\text{Fe}^{3+}$ / ferricyanide en forme ions ferreux (ferrocyanure;  $\text{Fe}^{2+}$ ) (**Berker *et al.*, 2007**) (**Figure 16**). Cette réduction accompagnée d'un changement de couleur jaune en une couleur bleu cyanée dans un milieu réactionnel est souvent utilisée comme indicateur de l'activité de donner d'électrons par les composés phénoliques (**Modaressi *et al.*, 2013**). De ce fait, cette densité de couleur est mesurée à 690 nm. En outre, le complexe  $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  permet l'estimation des concentrations des polyphénols participant dans la réaction de redox (**Adjimani et Asare, 2015**).



**Figure 16.** Description de mécanisme réactionnel intervenant entre le complexe ferricyanide ferrique Fe(III) et un antioxydant (AH).

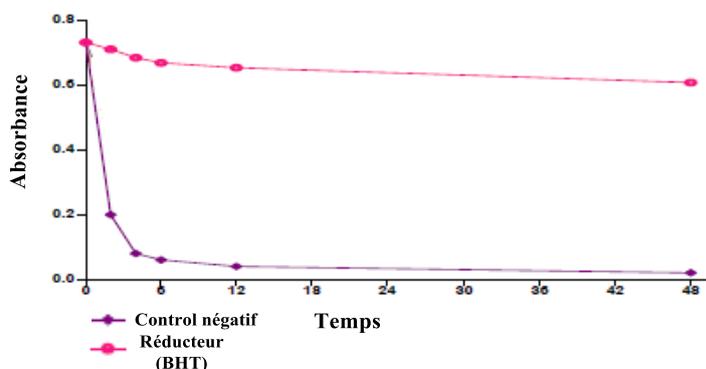
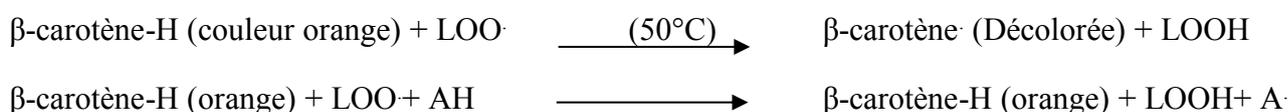
### III.3.1.3.2. Méthodologie

Ce dosage est basé sur la méthode décrite par Barros *et al.* (2013) selon le protocole suivant: dans des tubes Eppendorf, 0.5 mL de chaque concentration de différents extraits (2500 to 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sont déposés en quantité égale de solution tampon phosphate (200 mmol/L, pH 6.6, 0.5 mL) et ferricyanure de potassium (1% w/v, 0.5 mL). Le mélange est incubé dans l'étuve à 50°C pendant 20 min, 0.5 mL de l'acide trichloroacétique (10% w/v) sont ajoutés, 0.8 mL du mélange sont déposés dans des microplaques de 48 puits, (Cette expérience est répétée deux fois). Enfin, 0.8 mL de l'eau desionisée et 0.160 mL de chlorure de fer (0.1% w/v) sont additionnés. L'absorbance est mesurée à 690 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction du fer.

### III.3.1.4. Test de blanchissement du beta-carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique

#### III.3.1.4.1. Principe

La méthode de blanchissement du système  $\beta$ -carotène/acide linoléique est basée sur la capacité des molécules antioxydantes à réduire l'oxydation de l'acide linoléique et à inhiber les radicaux libres générés de ce système d'émulsion aqueux (les diènes conjuguées, les hydroperoxydes) sous des conditions thermiques. Ces produits formés lors de l'oxydation de l'acide linoléique attaquent les doubles liaisons du  $\beta$ -carotène (11 paires de double liaisons) provoquant la disparition de la couleur orange (la décoloration du  $\beta$ -carotène ou blanchissement) (**Figure 17**). Cette méthode consiste à mesurer par spectrophotomètre l'émulsion du système  $\beta$ -carotène/acide linoléique (**Laguerre *et al.*, 2007; Modaressi *et al.*, 2013**).



**Figure 17.** Cinétique de blanchissement du  $\beta$ -carotène à 490 nm en absence et en présence d'antioxydant (**Bouziid *et al.*, 2011**)

#### III.3.1.4.2. Méthodologie

2 mL d'une solution chloroformique de  $\beta$ -carotène (0.2 mg/mL) sont mis dans un ballon à col rodé et évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi, Flawil, Switzerland), 400 mg de Tween 80 et 2 gouttes d'acide linoléique (40 mg) sont ajoutés. Puis, un volume de 100 mL de l'eau désionisée est ajouté et agité vigoureusement. Dans des tubes à essai, 200  $\mu$ L des différentes concentrations des extraits et les contrôles négatif et positif (triplicata) sont pipetés. 4.8 mL de la solution d'émulsion  $\beta$ -carotène/acide linoléique sont additionnés à

chaque tube à essai. Les différentes dilutions sont mesurées à temps 0 (T<sub>0</sub>) à 470 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Analytikjena 200, Jena, Germany). Après l'incubation pendant 2 h (T<sub>120min</sub>) à 50°C. Une nouvelle lecture des concentrations est effectuée à la même longueur d'onde. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon l'équation suivante:

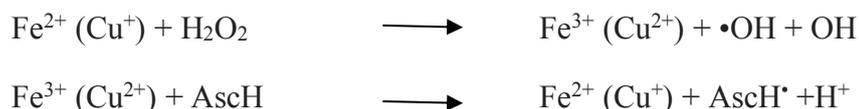
$$\% = \frac{A_{T120}}{A_{T0}} \times 100$$

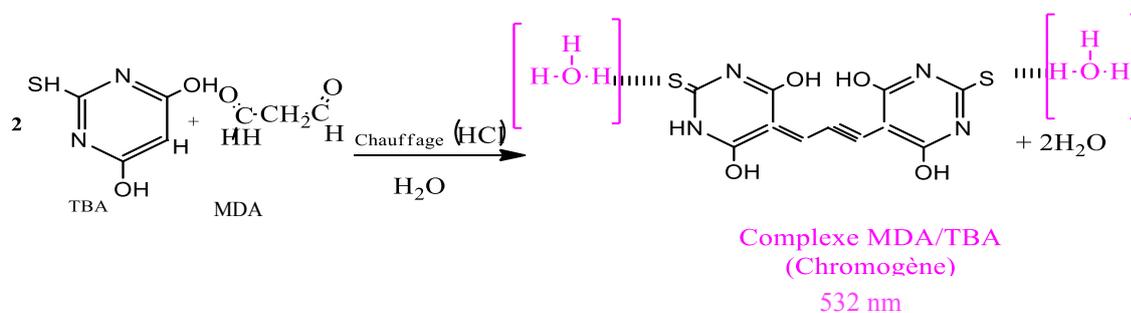
### III.3.1.5. Test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS)

#### III.3.1.5.1. Principe

Cette méthode d'inhibition de la formation des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBA) (test de TBARS), consiste à utiliser le cerveau de porc en tant que réel tissu animal, comme indicateur du processus de peroxydation lipidique. La peroxydation lipidique peut être déterminée par les produits de l'oxydation qui réagissent avec le TBA pour former des composés qui sont connus comme des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS). L'oxydation de peroxydes lipidiques conduit à la formation des radicaux d'alcoyles et de peroxydes comme produits d'oxydation primaire, qui à leur tour produisent de nombreux produits secondaires tels que les dérivés carbonylés comme le MDA, formés à la suite de la dégradation des acides gras polyinsaturés (**Laguerre *et al.*, 2007**).

En 1968, Yagi *et al.* ont appliqué la réaction de TBA avec MDA et les chromogènes liés aux lipopéroxydes dans les biomatériaux. Dans ce dosage, le malondialdéhyde (MDA) réagit avec deux molécules de TBA en présence de H<sup>+</sup> sous des conditions de chauffage (95 °C) et dans un milieu acide pour former un complexe MDA-TBA (Chromogène) d'une couleur rose mesuré au spectrophotomètre à  $\lambda$  rangé de 530-535 nm (**Figure 18**) (**Grotto *et al.*, 2009**).





**Figure 18.** Structures de TBA et MDA et leurs réactions en milieux aqueux d'après Dahle *et al.* (1962)

### III.3.1.5.2. Méthodologie

Une quantité de cerveau de porc (environ 5 g) est découpée en petits morceaux et placée dans un flacon avec un double volume (1:2; p/v) de tampon Tris-HCL (20 mM, pH 7.4). L'ensemble est centrifugé à 3500 g pendant 10 min (Centurion, k2OR-2003, West Sussex, UK). Dans des tubes Eppendorf, 0.2 mL de chaque concentration et de contrôles négatif et positif sont pipetés (triplicat). 0.1 mL de la solution de l'acide ascorbique (0.1 mM) suivie de 0.1 mL de sulfate de fer ( $\text{FeSO}_4$ ; 10 mM) sont mélangés à 0.1 mL de l'homogénat de cerveau du porc. Les différentes concentrations sont chauffées à 37°C pendant une heure, puis on ajoute 0.5 mL de l'acide trichloroacétique (28%) et 0.380 mL de la solution de l'acide thiobarbiturique. Le mélange est chauffé à 80°C pendant 20 min puis centrifugé (Labofuge200, Hanau, Germany) à 3000 tr/min pendant 5mn et finalement mesuré à 532 nm (Analytikjena200, Jena, Germany).

### III.3.2. Activité anti-inflammatoire

#### III.3.2.1. Principe

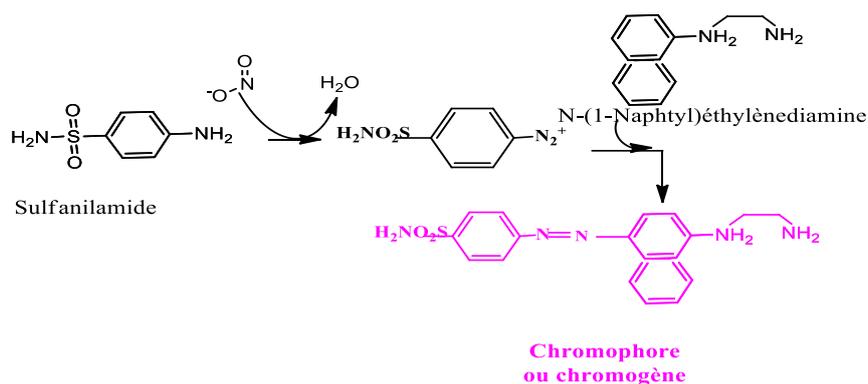
La production du NO dans le surnageant de culture de cellules stimulées est estimée par un dosage des produits de son oxydation en nitrites et nitrates. La concentration des nitrites totaux ( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ) est déterminée par la méthode de Griess (**Griess, 1879**).

Les macrophages jouent un rôle important dans l'activation du processus inflammatoire en sécrétant des médiateurs pro-inflammatoires contribuant à l'autorégulation du processus inflammatoire. L'un des produits sécrétés par les macrophages activés est le NO (**Boscá *et al.*, 2005; Xia et Triffitt, 2006**). La mesure de l'activité anti-inflammatoire est réalisée en utilisant le lipopolysaccharide (LPS), une endotoxine présente dans la paroi des bactéries Gram négatif qui stimule la production de médiateur pro-inflammatoire tel que l'oxyde

nitrique (NO) produit par les macrophages lors du processus de la réponse immunitaire. Les cellules provoquées sont traitées avec les différentes concentrations.

Le principe de cette méthode indirecte de réactif de Griess repose sur une réaction de diazotation qui a été décrite à l'origine par Griess en 1879 et qui utilise la sulfanilamide et le N-1-naphtylethylènediamine dihydrochloride (NED) en condition acide (présence de l'acide phosphorique) pour l'estimation de la concentration des dérivés de NO via la mesure de nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ). La mesure de la concentration de nitrite/nitrate repose sur la formation d'un complexe coloré par réaction de diazotation entre l'ion nitrite, une amine primaire aromatique, la sulfanilamide et une autre amine aromatique, le dihydrochlorure de N-(1-naphtyl)-éthylène diamine (NED). En effet, il s'agit de la réaction de GRIESS, réaction de diazotation spécifique de l'acide nitreux, qui se produit en deux étapes (**Figure 19**):

- ✓ L'ion nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) réagit avec la sulfanilamide ( $4\text{-H}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NH}_2$ ) pour former un composé diazoïque (sel de diazonium).
- ✓ Le sel de diazonium se combine ensuite en milieu acide ( $\text{pH} < 2$ ) avec le N-(1-Naphtyl)éthylène diamine (NED) pour former un chromophore d'une couleur rose à pourpre intense Azo (de formule  $\text{R-N=N-R}$ ) dont l'intensité dépend de la concentration en nitrite dans les échantillons est ensuite mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 540 nm (**Tsikis, 2007**). L'absorbance du chromophore est proportionnelle à la concentration des ions nitrite. En absence de nitrite, le réactif reste incolore.



**Figure 19.** Réactions chimiques impliquées dans la mesure de  $\text{NO}_2^-$  en utilisant le système réactif de Griess

### III.3.2.2. Méthodologie

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire est réalisée précédemment selon la méthode décrite par Barros *et al.* (2013) selon les étapes suivantes:

#### -La culture cellulaire

La lignée cellulaire de macrophages murins RAW 264.7 est cultivée dans un milieu DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) (Mediatech Cellgro, VA), avec les suppléments ajoutés: 10 % le sérum de veau fœtal (SBF) (Hyclone), des vitamines, des antibiotiques (pénicilline 100 I.U/mL et streptomycine 100 µg/mL), des acides aminés, à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Les macrophages sont détachés, la dissociation ne nécessite pas une trypsination. On les transfère ensuite dans des flacons coniques en polypropylène stérilisés de 25 mL pour la centrifugation 1200 tr/min pendant 5-15 mn. Après, on élimine le surnageant et on ajoute 3 mL du milieu au culot avec une légère agitation manuelle. Ensuite, 0.075 mL de suspension cellulaire sont prélevés dans un Eppendorf afin de réaliser une numération en présence de 0.075 mL de colorant de bleu Trypan (concentration finale: 0.4%) en utilisant des hématocytomètres de Neubauer et l'observation sous microscope inversé. Un volume de milieu de culture est introduit dans un flacon de 10 mL (complété à 10 mL qsp) contenant un volume calculé précédemment de suspension cellulaire afin que la densité finale des cellules en culture soit d'environ 5x10<sup>5</sup> cellules par puits. Les macrophages sont ensuite ensemencés dans des microplaques de 24 puits (BD Falcon) à une densité de 5 x 10<sup>5</sup> cellules par puits, puis incubés pendant 24 heures afin de leur permettre d'adhérer. Les cellules sont par la suite traitées avec quatre différentes concentrations de chaque extrait (200, 50 µg/mL, 12.5 et 3.125 µg/mL) pendant une heure. Le dexaméthasone (50 nM) est utilisé comme contrôle positif pour l'expérimentation. Les macrophages sont ensuite stimulés avec LPS (1 mg mL<sup>-1</sup>) pendant 18 h à 37°C. Le surnageant est récolté pour la détermination de la quantité de NO selon la méthode de révélation au réactif de GRIESS (**Green et al., 1990**).

Tous les tests sont effectués en triplicata. L'effet des échantillons en absence de LPS est aussi évalué afin de voir la production d'oxyde nitrique (NO). Le contrôle négatif est effectué en absence de LPS. L'ensemble des extraits et LPS est dissous dans le milieu supplémenté DMEM.

### III.3.2.3. Détermination d'oxyde nitrique

Pour déterminer l'oxyde nitrique (NO), le réactif de Griess est utilisé selon le protocole suivant: 100µL de surnageant de cellules sont transférés dans une microplaque de 96 puits mélangés avec une quantité égale de réactif de Griess. Une couleur violette commence à apparaître immédiatement. Le mélange est incubé à une température ambiante pendant 10 min.

L'oxyde nitrique produit est déterminé en mesurant l'absorbance à 540 nm (microplate reader ELX800 Biotek). Chaque test est effectué deux fois en triplicata. La présence de nitrite est quantifiée à partir d'une courbe standard préparée avec le nitrite de sodium  $\text{NaNO}_2$  (100  $\mu\text{M}$  à 1.6  $\mu\text{M}$ ,  $y = 0.0063x + 0.1318$ ,  $R^2=0,9999$ ). Les résultats sont exprimés par des valeurs de l'IC50 ( $\mu\text{g}/\text{mL}^1$ ), qui correspond à la concentration de l'échantillon qui donne 50% d'inhibition de la production d'oxyde nitrique (NO) qui est déterminée graphiquement à partir des courbes donnant l'inhibition en pourcentage en fonction de la concentration testée (Logiciel Excel), calculés suivant la formule suivante:  $(C_s - C_c) / C_c \times 100$

Cs: concentration calculée à partir du graphe (NO) de chaque extrait; Cc: concentration du contrôle.

### III.3.3. Détermination de l'activité anti-tumorale

#### III.3.3.1. Principe

L'activité cytotoxique est réalisée sur des cellules cancéreuses humaines en utilisant la méthode de sulforhodamine B (SRB) rapportée précédemment par Vichai et Kirtikara (2006) et détaillée dans le tableau 9.

L'essai de l'activité antiproliférative par SRB est une méthode indirecte pour mesurer la prolifération des cellules, largement utilisée pour l'estimation de l'inhibition de croissance ou la cytotoxicité des cellules par la méthode colorimétrique qui estime le nombre de cellules vivantes. Le test de SRB repose sur l'absorption du réactif aminoxanthine ou sulforhodamine B (SRB) dont les deux groupes sulfoniques sont chargés négativement, d'une couleur rose vif liée avec des acides aminés basiques et qu'on peut mesurer par spectrophotomètre à 570 nm sur des microplaques de 96 puits. Cette méthode est donc basée sur la mesure de la quantité des protéines produites par les cellules. Plus la quantité des protéines est élevée, plus la couleur est intense c'est-à-dire plus le nombre de cellules est grand (**Rodrigues et al., 2011**). L'objectif de ce test est d'utiliser les extraits pour réduire la prolifération des cellules cancéreuses. L'étude de l'hépatotoxicité est réalisée sur des cellules de lignées de foie de porc (*Porcine Liver Cell Lines*, PLP2) en suivant la méthode détaillée par Abreu et al. (2011).

**Tableau 9.** Lignées de cellules humaines utilisées

Lignée cellulaire*	Type
<b>Hela</b>	Adénocarcinome cervicale
<b>HepG2</b>	Carcinome hépatocellulaire
<b>MCF7</b>	Adénocarcinome de sein (glande mammaire)
<b>NCI-H460</b>	Cancer bronchique ( NCI-H460) non à petites cellules (CBNPC) (Non-Small cell lung cancer)

\*Toutes les lignées cellulaires de cancers humains utilisées dans cette étude proviennent de American Type Culture Collection «ATCC» (Manassas, Etats-Unis)»

### **-Sulforhodamine B (SRB)**

La SRB est un est un colorant d'une couleur rose vif avec deux groupes sulfoniques dont l'histochimie est similaire à celle des colorants apparentés, tel que le bleu de Coomassie, le bleu de bromophénol et le jaune de naphthol S et qui sont largement utilisés comme colorants de protéines. Dans des conditions légèrement acides, SRB se lie à des acides aminés des protéines basiques dans des cellules fixées par le TCA pour fournir un indice sensible sur la teneur en protéines cellulaires qui est proportionnelle à la densité cellulaire. Le développement de la couleur dans le test SRB est rapide, stable et visible. L'absorbance de SRB peut être mesurée sur une large gamme de longueur d'onde visible soit par un spectrophotomètre, soit par un lecteur de plaques à 96 puits. Avec un protocole correctement optimisé, la coloration du SRB atteint un point final stable. Lorsqu'ils sont séchés à l'air, les échantillons fixés au TCA et colorés par SRB peuvent être conservés indéfiniment sans détérioration. La SRB solubilisée dans le tris est également stable pendant de longues périodes, à condition que l'évaporation ne se produise pas.

La méthode de coloration au SRB n'est pas destructive dans le sens où il n'est pas nécessaire de digérer des échantillons. Bien que le test du SRB ait été développé à l'origine pour les cellules attachées à un substrat plastique, il est plus simple, plus rapide et plus sensible que le test MTT, fournit une meilleure linéarité avec le nombre des cellules, est moins sensible aux fluctuations environnementales, et ne nécessite pas beaucoup de temps pour mesurer la vitesse de réaction initiale (Skehan *et al.*, 1990).

### **III.3.3.2. Méthodologie (Lignées de cellules cancéreuses et culture cellulaire)**

#### **-Culture cellulaire**

- ✓ Lignées cellulaires cancéreuses

Ces cellules utilisées lors de l'expérimentation pour évaluer l'activité anti-tumorale *in vitro* par le dosage SRB sont indiquées dans le tableau 9.

Les lignées cellulaires utilisées dans cette méthode sont considérées comme des cellules adhérentes, c'est-à-dire qu'elles poussent uniquement lorsqu'elles adhèrent à un substrat leur convenant. Toutes les lignées de cellules ont été maintenues comme des cellules adhérentes, cultivées en monocouches (flacons de culture cellulaire Corning®) d'un maximum de 80% de confluence dans un milieu de RPMI 1640 complété avec 10% de SBF inactivé et chauffé, 2 mM glutamine et 1% de pénicilline / streptomycine à 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> et de l'air humidifié (incubateur).

#### ✓ Hépatotoxicité (Culture primaire)

Elle consiste à isoler un fragment d'organe ou de tissu et de le maintenir en survie dans un milieu approprié *in vitro*;

-les cellules cultivées sont préparées à partir de foie frais de porc obtenu par une maison d'abattage local il s'agit de PLP2.

-les tissus hépatiques sont rincés par HPSS (*Hank's balanced salts solution*) contenant 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et sont découpés en 1x1x1 mm<sup>3</sup> d'explants.

-les explants (de petits morceaux de tissus) sont fixés sur un récipient de culture traité et baignés dans un milieu de culture où ils sont placés dans des flacons de culture cellulaire de 25 cm<sup>2</sup> contiennent un milieu DMEM supplémenté en 10% SBF, 2 mM d'acides aminés, 100 U/mL de pénicilline, 100 mg/mL de streptomycine. Les explants sont ensuite incubés à 37 °C sous des conditions d'atmosphère humidifiée contenant 5% CO<sub>2</sub>.

-après quelques jours, des cellules individuelles se déplacent de l'explant de tissus vers la surface du récipient de culture où elles commencent à se diviser et proliférer

-le milieu est changé chaque deux jours. Les explants sont cultivés pendant environ deux semaines, les cellules se fixent, se divisent et prolifèrent. C'est ce qu'on appelle une culture primaire.

#### -Comptage cellulaire et trypsination

On lave le tapis cellulaire en introduisant 2.5-5 mL de PBS (HBSS) puis on agite doucement la boîte pendant 30 sec et on élimine tout le liquide à l'aide d'une micropipette. Les cellules cultivées *in vitro* adhèrent à un support et adhèrent entre-elles grâce à la matrice extracellulaire. Le repiquage des cellules nécessite leur décollement du support et leur

séparation les unes des autres, ce qui est obtenu par action d'une enzyme protéolytique, la trypsine. Son action est inhibée par les ions calcium et par le sérum de veau fœtal (SBF). On introduit un volume de 1.5 à 2 mL de trypsine 0.25% + EDTA. Une fois que l'enzyme a individualisé les cellules, il faut que son action soit arrêtée par addition de SBF avant que les cellules ne soient abîmées. Il faut donc contrôler l'action de la trypsine en stoppant son activité dès que le tapis cellulaire s'est individualisé du support. Pour bien répartir sur tout le tapis cellulaire, on le met ensuite à l'incubateur 5 à 10 mn jusqu'à ce qu'on observe le détachement des cellules adhérentes du support (flacon de culture). Après, on les transfère dans des flacons coniques en polypropylène stérilisés de 25 mL pour la centrifugation 1200 tr/min pendant 5 min. On élimine ensuite le surnageant et on ajoute 3ml du milieu au culot avec une légère agitation manuelle. On introduit 3 à 5 mL du milieu de culture complété (l'action de la trypsine est stoppée par le SBF) pour arrêter la trypsination. Il faut après trypsination dénombrer les cellules vivantes et mortes pour déterminer avec précision le volume de suspension cellulaire à introduire dans les microplaques pour l'essai: 0.075 mL de suspension cellulaire sont prélevés dans un tube Eppendorf afin de réaliser une numération en présence de 0.075 mL de colorant de bleu Trypane (concentration finale: 0.4% (p/v) en utilisant une cellule de Neubauer (plaque de microscope quadrillée) pour le comptage cellulaire. Le dénombrement est effectué sur cinq champs choisis au hasard, la moyenne des cellules est déterminée selon la formule suivante:

Densité cellulaire [cellules/ml]=  $10^4 \times M/d$ .

M: Moyenne de cellules pour les cinq champs.

d: Facteur de dilution.

On met en place un volume du milieu de culture dans chaque flacon de 10 mL (complété à 10 mL qsp) à introduire un volume calculé précédemment de suspension cellulaire afin que les cellules en culture soient placées à une densité finale d'environ  $1 \times 10^4$ . Toutes les cellules ont subi le même traitement pour le protocole du test SRB suivant:

### **-Protocole**

Après l'étape de la trypsination des cellules, chaque suspension de lignée de cellules et les cellules de culture primaire est placée et sub-cultivée dans des plaques de 96 puits qui sont (0.190  $\mu$ L) préalablement pipetées par 0.01 mL de chaque concentration d'extrait (400, 100, 25, 6.25 et 1.5625  $\mu$ g/mL) avec une densité d'ensemencement appropriée avec un inoculât de  $1 \times 10^4$  cellules par puits pour permettre l'attachement de ces cellules pendant 48 h. Après

l'incubation, les cellules adhérentes sont fixées à l'aide de l'acide trichloracétique (TCA, 10%; 100 µL) et ensuite incubées pendant une heure à 4°C. Les microplaques sont ensuite rincées par l'eau déionisée et mises à sécher dans une étuve à 50°C pendant 10 min. 100 µL d'une solution de SRB sont après ajoutés dans chaque puits. Les microplaques sont par la suite incubées pendant une demi-heure à la température de chambre. La solution SRB (0.4%, acide acétique 1%) est retirée et rincée par l'acide acétique. Ensuite, 200 µL de Tris-base (10 mM; pH 10.5) sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 570 nm à l'aide d'un lecteur de plaque 96 puits. (ELX800, Bio-Tek Instruments, Winooski, USA). L'ellipticine est utilisé comme contrôle positif.

Les résultats sont exprimés par des valeurs GI50 (la concentration d'échantillon qui inhibe 50% de la croissance cellulaire nette) dans µg/mL de la solution aqueuse de l'extrait brut ou des fractions. Les valeurs sont déterminées par l'analyse d'une courbe d'étalonnage qui représente le pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des extraits donnés. Le pourcentage d'inhibition de croissance des cellules est calculé selon l'équation suivante:

$$PI\% = (1 - (As - Am / Ac - Am)) \times 100$$

**Ac:** absorbance de contrôle négatif contenant seulement les cellules tumorales

**Am:** absorbance des cellules initiales (10000).

**As:** absorbance de l'échantillon.

Les résultats présentés ici se rapportent à une expérience représentative puisque tous les tests sont exécutés en trois répétitions, la moyenne de standard déviation est toujours inférieure à 5%.

### III.3.4. Activité antibactérienne

#### III.3.4.1. Principe

L'activité antibactérienne est réalisée par la méthode de micro-dilution en milieu liquide (dilution en bouillon) à l'aide des microplaques de 96 puits. Pour chaque extrait, la concentration minimale d'inhibition (CMI) a été déterminée. Cette méthode évalue l'efficacité d'un extrait à empêcher la croissance (inhibition, effet bactériostatique) des bactéries qui sont en contact direct avec les échantillons. La CMI des extrais est définie comme étant «la plus faible concentration d'une substance active ou d'antibiotique suffisante pour arrêter la croissance ou le développement d'un microbe d'un certain nombre des souches bactériennes sans le tuer *in vitro* après une incubation pendant une nuit» (Andrews, 2001). Les bactéries

utilisées dans cette étude sont présentées dans le tableau 10. Ce sont des souches bactériennes Gram négatif et Gram positif obtenues à partir d'isolats cliniques. Toutes les cultures utilisées sont issues des malades hospitalisés dans les divers départements de l'unité de santé de Bragança, du centre hospitalier de Trás-os-Montes et Alto-Douro (Vila Real, Nord-Est de Portugal). La méthode des microplaques 96-puits est utilisée précédemment par Kuete *et al.* (2011).

**Tableau 10:** Souches bactériennes utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne

Groupes de souches	Souche bactérienne	Origine
Gram -	- <i>Escherichia coli</i>	- urine
	- <i>E. coli</i> (BLSE*)	- urine
	- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	- urine
	- <i>K. pneumoniae</i> (BLSE*)	- urine
	- <i>Morganella morganii</i>	-urine
	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-urine
Gram +	- <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline (SARM)	-expectoration
	- <i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la methicilline (SASM)	-exsudat de la plaie
	- <i>Listeria monocytogenes</i>	-liquide céphalo-rachidien
	- <i>Enterococcus faecalis</i>	-urine

\*BLSE: béta-lactamase à spectre élargi.

### III.3.4.2. Méthodologie

Tous les microorganismes appartiennent au laboratoire de bactériologie, centre de recherche de montagnes, institut d'agronomie, université de Santa Apoloniã de Bragança, Portugal. La détermination des CMI est menée en utilisant la méthode colorimétrique rapide microbienne basée sur la réduction de la couleur de l'INT selon la méthode de micro-dilution en milieu liquide avec quelques modifications et comparée avec celle du contrôle positif «antibiotique de référence» pour chaque souche bactérienne.

#### -Préparation de l'inoculum bactérien

Les bactéries à tester ont étéensemencées sur des boites de Pétri contenant des milieux sélectifs appropriés aux souches bactériennes utilisées puis incubés à 37°C pendant 24 heures.

Pour obtenir des colonies jeunes des bactéries afin de mettre en évidence l'activité antibactérienne des échantillons étudiés, deux milieux de culture ont été utilisés:

-la gélose MacConkey, pour les bactéries non exigeantes.

-la gélose au sang qui contient 7% de sang du mouton, pour les bactéries exigeantes.

#### **-Préparation de la suspension bactérienne à partir de l'inoculum bactérien**

Après incubation, nous avons choisi 4 à 5 colonies bien isolées avec une anse de platine et transférées dans un tube d'eau distillée stérile. A partir des colonies jeunes bien isolées de culture pendant une nuit de 18 à 24 h, dans des tubes à essai une suspension bactérienne est réalisée dans l'eau désionisée stérile pour chaque souche puis mélangée à l'aide d'un vortex. La turbidité de cette suspension est ajustée à 0.5 de Mac Farland (Agilent/HP 8453, Santa Clara, California, USA) pour obtenir alors un inoculum d'une concentration estimée à  $10^5$  unités formant colonie par millilitre (ufc/mL) grâce à un DENSIMAT.

#### **✓ Ensemencement**

Dans des tubes à essai, les concentrations de solution mère pour chaque extrait ont été d'abord préparées et dissoutes dans un milieu approprié, soit le milieu Mueller Hinton (MH) (8 souches) ou le milieu du Bouillon Tryptone Soja (TSB) (*Enterococcus faecalis* et *Listeria monocytogenes*) puis homogénéisés à l'aide d'un vortex à une concentration de 20 mg/mL. Dans des tubes Eppendorfs, 0.480 mL de chaque extrait sont mélangés avec 20  $\mu$ L de chaque souche bactérienne. Dans des microplaques à 96 puits, 0.2 mL de chaque concentration de chaque extrait préparé à partir d'une série de dilution (10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125) sont déposés contre un contrôle négatif en remplaçant l'extrait par un milieu adéquat.

#### **✓ Incubation**

Les plaques sont recouvertes, puis agitées légèrement à l'aide d'un agitateur de microplaques puis incubées à 37 °C pendant 18 h. L'essai est répété trois fois.

#### **✓ Révélation**

La CMI de chaque extrait est évaluée après l'addition de 40  $\mu$ L de chlorure de *p*-iodonitrotétrazolium (INT) (0.2 mg/mL, eau désionisée) comme indicateur de variabilité puis suivie par l'incubation à 37 °C pendant 30 min (Memmert INC123, Schwabach, German).

#### **✓ Expression des résultats**

Les bactéries viables réduisent le colorant jaune en une couleur rose. La CMI est déterminée comme étant la concentration de l'échantillon correspondante aux derniers puits où il y'a un changement de la couleur du milieu qui représente une inhibition complète de la

croissance microbienne. La CMI est encore définie comme étant la plus faible dose d'extrait pour laquelle on n'observe pas une croissance visible à l'œil nu des bactéries après l'incubation. La faible concentration qui produit une inhibition significative (autour de 50%) de la croissance des bactéries en comparant avec le contrôle positif est considérée comme CMI.

#### **IV. Étude statistique**

L'analyse de variance dans cette étude est effectuée par le test ANOVA, c'est un test utilisé pour analyser les différences entre les moyennes des différentes données. Des méthodes statistiques unies variées sont employées dans tous les essais. Les résultats sont ensuite suivis par le test Tukey's HSD avec un niveau de signification de 5% ( $p = 0.05$ ), (logiciel SPSS v. 23.0) et analysés par le test de *t*-Student. Le logiciel utilisé est SPSS (Statistics Package for Social Sciences) version 23.0 (IBM Corporation, New York, USA). Les données sont représentées par leur moyenne  $\pm$  standard déviation (écarte type) par rapport à la moyenne (SDM). Pour toutes les méthodes, trois répétitions sont effectuées (triplicata).

PARTIE III.

---

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

### I. Choix de la méthode d'extraction et le rendement en composés phénoliques

Le choix des solvants a été pris à la suite de nombreuses études réalisées sur la recherche de conditions optimales d'extraction des polyphénols, où plusieurs paramètres ont été testés: la nature des solvants, la méthode d'extraction utilisée, le temps d'extraction et/ou d'une étape de délipidation (**Chandrasekara et al., 2016**).

L'utilisation de l'eau suivie d'un partage contre des solvants polaires pourrait favoriser l'extraction des composés polaires tels que les polyphénols, et, donc, influencer sur les activités biologiques de l'échantillon.

Les extractions aqueuses sous reflux suivie d'un fractionnement liquide-liquide pour toutes les plantes étudiées ont fourni des composés plus polaires, Les valeurs représentant la moyenne des rendements d'extraction des composés de l'extraction varient de 2.5 à 24.5%.

-Pour *M. nivellii*, le rendement de la fraction butanolique présente le pourcentage le plus élevé de 16.25% par rapport aux autres fractions acétate d'éthyle et chloroforme avec des pourcentages de 8.75 et 2.5 % respectivement.

-Pour *O. quadripartita*, le rendement est varié entre 4.5 et 24,5 % pour la fraction chloroformique et la fraction butanolique respectivement.

-Pour *T. articulata*, on remarque que l'acétate d'éthyle présente un rendement plus faible avec 3.55%.

On note que les plantes étudiées contiennent effectivement des composés polaires et leurs rendements en ces composés dans les feuilles de chaque plante est surtout dans les fractions acétate d'éthyle et n-butanol sont les plus élevés. L'ordre de grandeur des rendements d'extraction, se présente comme suit: la fraction butanolique >fraction acétate d'éthyle> fraction chloroformique pour toutes les plantes (**Tableau 11**). Ces différences de rendement de l'extraction d'une espèce à une autre ont été précédemment rapportées dans la littérature. Ainsi, Hayder *et al.* 2008 ont obtenu le même ordre de rendement dans les différents solvants utilisés pour l'extraction de *M. communis* (**Hayder et al., 2008a**). Selon plusieurs auteurs, l'origine de récolte de l'espèce, la période de récolte, l'organe de la plante, la durée de séchage et la méthode d'extraction, la polarité de solvants utilisés sont des facteurs parmi d'autres qui peuvent aussi avoir un impact direct sur les rendements en composés polaires (**Salminen, 2003; Iloki-Assanga et al., 2015**).

**Tableau 11:** Rendements d'extraction (%) selon les plantes et leurs fractions.

Rendement de fraction	<i>M. nivelii</i>	<i>O. quadripartita</i>	<i>T. articulata</i>
<b>Extrait aqueux</b>	20 ± 0.3	22 ± 0.05	21 ± 0.1
<b>Chloroforme</b>	2.5 ± 0.01	4.5 ± 0.02	4.14 ± 0.03
<b>Acétate d'éthyle</b>	8.75 ± 0.04	12.1 ± 0.05	3.55 ± 0.02
<b><i>n</i>-Butanol</b>	16.25 ± 0.1	24.5 ± 0.08	8.61 ± 0.04

## II. Étude du profil phénolique des extraits étudiés

### II.1. Identification des composés phénoliques

Dans le but d'identifier les molécules présentes dans nos extraits, nous avons combiné l'HPLC à deux systèmes de détection:

✓ UV-vis réalisé par un détecteur à barrette de diodes (DAD, Diode Array Detector): qui permettent de suivre une analyse à plusieurs longueurs d'ondes simultanément, et d'enregistrer les spectres d'absorption de chaque composé élué par la phase mobile (**Dou *et al.*, 2007**)

✓ La spectrométrie de masse (MS): de nos jours, la MS est couramment employée pour déterminer les constituants polyphénoliques résolus par HPLC. Elle consiste à mesurer les rapports masse/charge ( $m/z$ ) des atomes ou des molécules présents dans un échantillon donné car non seulement ce sont deux modes de détection souvent rencontrés pour l'analyse des composés phénoliques mais surtout ils fournissent des informations structurales sur les analytes étudiés. Par exemple, HPLC couplé à spectrométrie de masse en tandem par l'ionisation par électrospray (ESI, *Electrospray Ionisation*) a été effectuée pour déterminer les composés phénoliques (**Dou *et al.*, 2007**).

Les analyses par LC-ESI-MS/MS du profil des composés phénoliques des extraits bruts aqueux et leurs fractions organiques, la surface de pic (aire) de chaque composé ont été enregistrées par le détecteur UV. Les structures chimiques de ces constituants ont été identifiées sur la base de leur temps de rétention et des modèles de fragmentation. Les chromatogrammes sont illustrés dans la figure 21; 24; 27, le temps de rétention et les données de la fragmentation de masse des composés sont indiqués dans le tableau 12; 13 et 14.

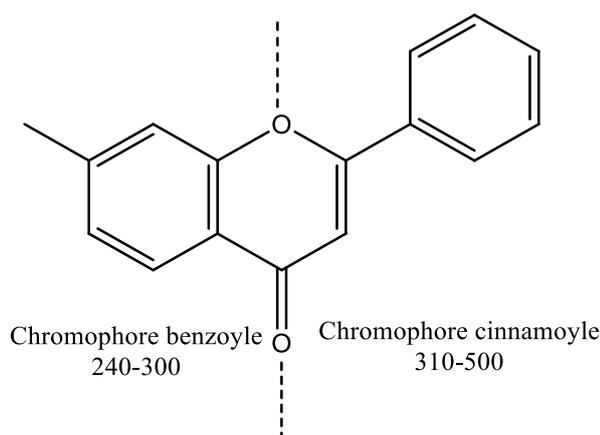
Les flavonoïdes ont un spectre d'absorption spécifique. Ils présentent deux bandes caractéristiques dans l'UV-Vis, une bande I (noyau B) qui absorbe entre 310 et 520 nm et une bande II (noyau A) qui absorbe entre 240 et 300 nm. Suivant le nombre de doubles liaisons conjuguées sur la structure des flavonoïdes, ces bandes seront plus ou moins intenses. Il est

ainsi facile de faire la différence entre des aglycones à cycle C ouvert (chalcone et aurone) qui ont une bande II très réduite, et les autres flavonoïdes à cycle C fermé qui possèdent une bande II beaucoup plus intense (**Figure 20**). Au contraire les iso-flavones et les flavanones possèdent une bande I qui est généralement réduite à un épaulement (**Andersen et Markham, 2005; de Rijke *et al.*, 2006**).

Cependant, les acides phénoliques absorbent dans deux zones, en observant une première absorption maximale entre 225 et 235 nm, et la deuxième, entre 290 et 330 nm.

A titre d'exemple l'acide benzoïque, ils présentent une seule région d'absorption maximale entre 235 et 325 nm; seules les molécules de di-hydroxylés ont deux maxima d'absorption (**Cheyrier *et al.*, 2012; Holser, 2012**).

Dont le but d'une identification phytochimique des flavonoïdes dans les plantes, une HPLC couplée à la spectrométrie de masse à trappe ionique fonctionnant en mode électronébulisation négative a été développée pour la séparation et la détection de différents flavonoïdes aglycones naturels.



**Figure 20:** Domaine d'absorption des flavonoïdes dans le domaine UV-Visible

Les tableaux 12, 13 et 14 résument la nature de chaque composé phénolique identifié des différents extraits testés, le temps de rétention, les ions moléculaires, les ions fils issus (fragments) des différentes fragmentations. Toutes les molécules détectées ont été caractérisées par l'étude de leurs fragmentations obtenues par ESI-MS/MS en mode négatif, en comparant les données obtenues (le temps de rétention et schémas de masse de fragmentation) avec la littérature et le cas échéant par l'injection de standards dans les mêmes conditions chromatographiques. Les concentrations des composés individuels, sont quantifiés par comparaison des surfaces à l'aide des courbes d'étalonnage obtenues pour des standards correspondants sont présentées dans la partie matériel et méthodes.

### II.1.1. *M. nivelii*

Il s'agit de la première étude sur la caractérisation: l'identification et la quantification des composés phénoliques présents dans les feuilles de *M. nivelii*. Le profil phytochimique de ces constituants dans l'extrait aqueux brut de *M. nivelii* et les fractions acétate d'éthyle et butanolique est présenté dans le tableau 12 et la figure 22.

Vingt-sept composés ont été identifiés, comprenant des tanins hydrolysables (dérivés de gallotanins et d'ellagitanins), des flavonoïdes (la myricétine, la quercétine, le kaempférol et les dérivés de la catéchine) et un acide phénolique. La fraction d'acétate d'éthyle a révélé la présence de 25 composés, tandis que la fraction butanolique et l'extrait aqueux brut ont révélé seulement 19 et 17 composés, respectivement (**Figure 21**).

Les pics 1, 2, 4, 7, 10 et 14 ont montré des spectres UV cohérents avec les dérivés de galloyle et d'hexahydroxydiphénoyle (HHDP) (**Barry et al., 2001; Romani et al., 2012**). Selon la littérature, la principale caractéristique dans les spectres de masse de ces composés sont la molécule (ion) déprotonée  $[M-H]^-$  et la perte d'un ou plusieurs groupes ellagique (302 um), acide gallique (170 um) et/ou groupement galloyle (152 um). Les caractéristiques de masse concernant les pics 1 et 2 avec ( $[M-H]^-$  à m/z 633; fragments d'ions à m/z 463 et 301) ont concordent avec l'isomère galloyl-HHDP-glucose, alors que les pics 4, 7 et 10 ( $[M-H]^-$  à m/z 785; les fragments d' ions à m/z 633, 615, 483, 419, 301) correspondent au digalloyl-HHDP-glucoside (**Figure 23**), tandis que le pic 14 ( $[M-H]^-$  à m/z 937; les fragments d'ions à m/z 767, 635, 465 et 301) concordent avec un trigalloyl-HHDP-glucose (**Carocho et al., 2014**).

Les composés 1 à 8, 10 à 12 et 17 ont été identifiés comme des gallotanins composés de fragments trimères et tétramères de galloyle liés au glucose.

D'après la littérature (**Sanz et al., 2010**), les principales caractéristiques des spectres de masse de ces composés sont la molécule déprotonée  $[M-H]^-$  (m/z 635 et 787) et la perte d'un ou plusieurs groupes galloyles (152 unités de masse) et/ou l'acide gallique (170 unités de masse). Les composés 1 et 4 (ion  $[M-H]^-$  à m/z 483) révèlent un modèle typique de fragmentation d'un trigalloyl glucose, tandis que les composés 3, 5, 7 et 8 (ion  $[M-H]^-$  à m/z 635), Les composés 10-12 (ion  $[M-H]^-$  à m/z 787) et le composé 17 (ion  $[M-H]^-$  à m/z 939) présentent un motif de fragmentation caractéristique du trigalloyle, du tétragalloyle et du pentagalloyl glucose respectivement (**Sanz et al., 2010**).

Pic 3 ( $[M-H]^-$  m/z 495) est identifié à l'ion déprotoné de l'acide digalloylquinique, libérant trois fragments d'ions  $MS^2$  à m/z 343 (libération du premier groupe galloyle  $[M-152-H]^-$ ) et m/z 191 (Libération du second groupe galloyle  $[M-152-H]^-$ ) et m/z 169 (libération de l'acide quinique avec la formation d'acide gallique déprotoné) (Wyrepkowski *et al.*, 2014).

De même, le pic 8 ( $[M-H]^-$  à m/z 647) a été identifié comme étant l'acide trigalloylquinique. Le pic 12 ( $[M-H]^-$  à m/z 469) a été identifié comme une dilactone d'acide valonique, en tenant compte du schéma de fragmentation et des spectres UV-Vis présentés par Wyrepkowski *et al.* (2014).

Les pics 6 ( $[M-H]^-$  à m/z 953) et 17 ( $[M-H]^-$  m/z 1105) sont identifiés comme étant la rugosine A et B respectivement (Fecka, 2009).

Les composés restants correspondent aux flavonols (pics 13, 19, 20, 23, 25 et 27) et à un flavan-3-ol (pic 11). Ce dernier pic ( $[MH]^-$  à m/z 915) est provisoirement identifié comme étant un dimère de gallocatéchine-gallate, présentant un schéma de fragmentation avec les fragments à m/z 457 (gallocatéchine-gallate) et m/z 169 (gallate), Précédemment signalé par Fracassetti *et al.* (2013). Les flavonols détectés sont des dérivés de la quercétine ( $\lambda_{max}$  autour 350 nm et un fragment  $MS^2$  à m/z 301), kaempférol ( $\lambda_{max}$  autour de 348 nm, fragment  $MS^2$  à m/z 285) et myricétine ( $\lambda_{max}$  environ 354 nm, Fragment  $MS^2$  à m / z 317).

La myricétine-3-*O*-glucoside (pic 15), la quercétine-3-*O*-glucoside (pic 21), le kaempférol-3-*O*-glucoside (pic 24) et la myricétine (pic 26) sont identifiés en fonction de leur temps de rétention, de leur masse et des caractéristiques UV-vis en comparaison avec des standards. Le flavonoïde myricétine-3-*O*-glucoside a déjà été signalé dans les feuilles de *Myrtus communis* L. (Hayder *et al.*, 2008b, Viuda-Martos *et al.*, 2011; Messaoud *et al.*, 2012).

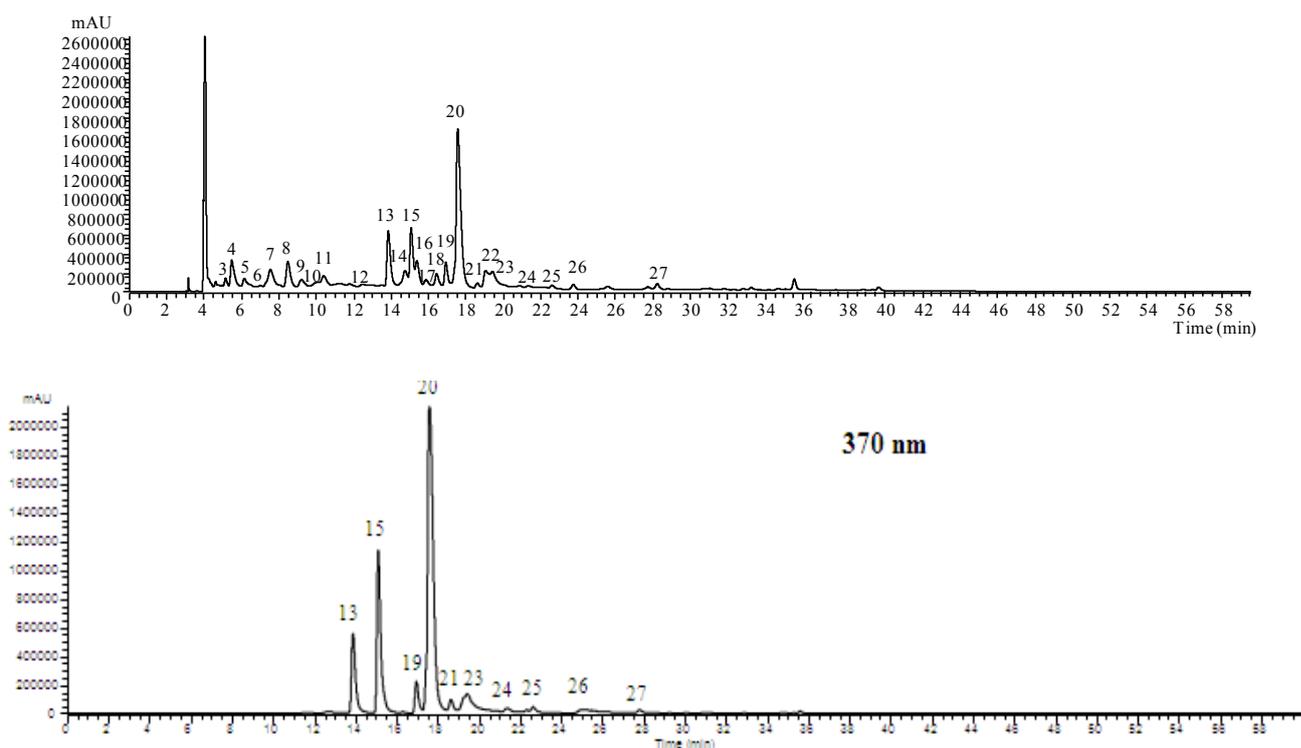
Les composés 20 ( $[M-H]^-$  à m/z 464) et 25 ( $[M-H]^-$  à m/z 447) présentent un fragment à  $MS^2$  m/z 317 (myricétine) et m/z 301 (quercétine) correspondant à la perte d'un résidu de rhamnosyl (-146 mu). Ces composés sont considérés comme étant myricétine-3-*O*-rhamnoside et quercétine-3-*O*-rhamnoside, selon leur identification précédente dans les feuilles de *M. communis* par Romani *et al.* (2004); (2012) et Messaoud *et al.* (2012).

Les pics 13, 19 et 23 sont identifiés comme étant des dérivés hexosyliques de la myricétine, de la quercétine et du kaempférol et semblent également être liés à la partie d'acide gallique, produisant des ions déprotonés à m/z 631 (pic 13), compatible avec la myricétine-hexosyl-gallate, à m/z 615 (pic 19) avec la quercétine-hexosyl-gallate et à m/z 599

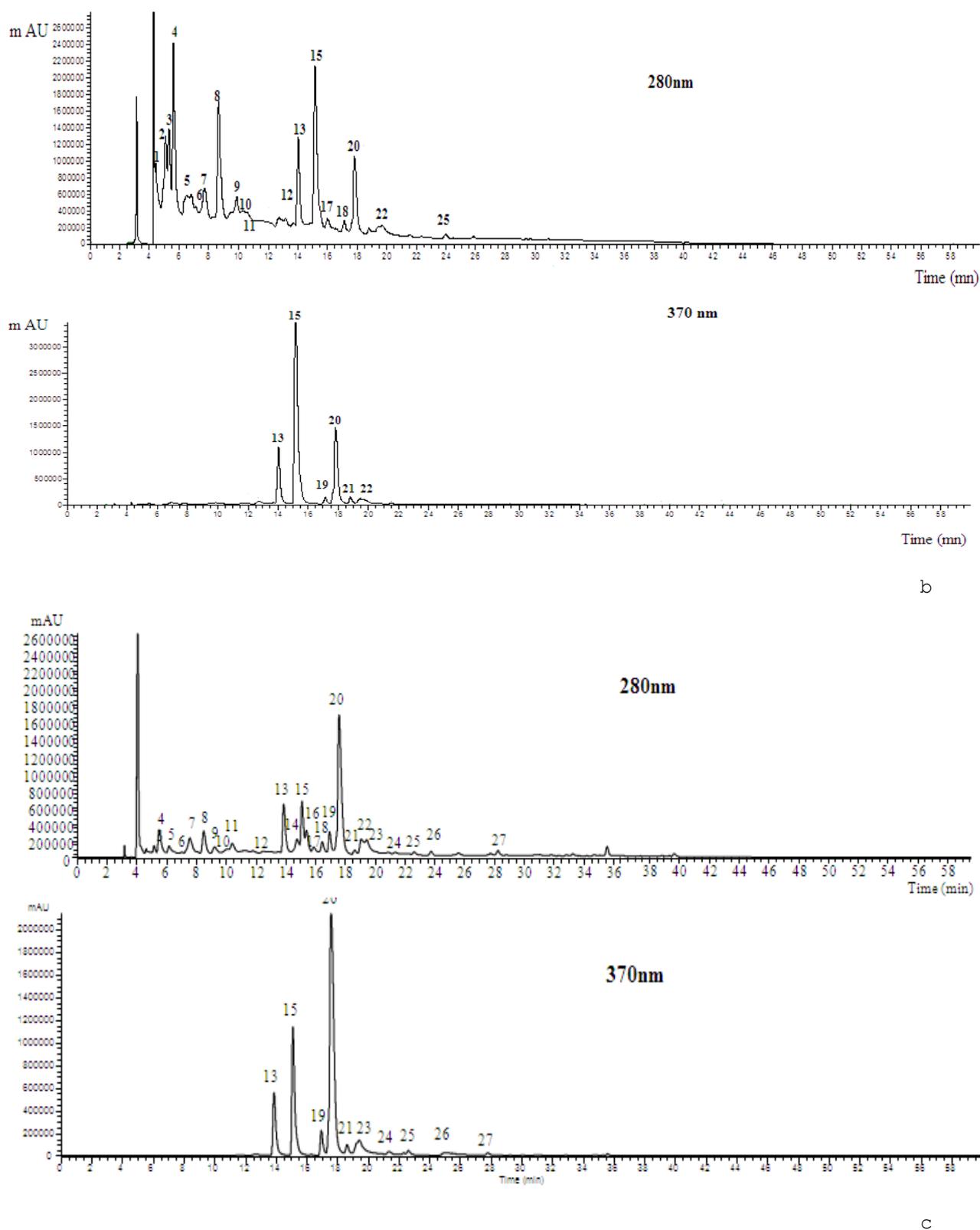
(pic 23) avec le kaempférol-rhamnosyl-gallate. Le pic 27 ( $[M-H]^-$  à  $m/z$  625) est identifié comme étant un myricétine-coumaroyl hexoside, en raison de la fragmentation de l'ion produit à  $m/z$  479 (perte de résidu *p*-coumaroyl, -146 um) et  $m/z$  317 (perte de la partie d'hexosyle). Ce pic est identifié comme un glycoside de flavonol lié à un acide phénolique en raison de son temps d'éluion tardif, car la présence du résidu hydroxycinnamoyl implique une diminution de la polarité, ainsi que son spectre UV-Vis ( $\lambda_{\max}$  316 nm).

Enfin, l'acide phénolique, l'acide ellagique, est identifié de manière positive selon leurs caractéristiques de rétention, de masse et UV-vis par comparaison avec des références commerciales.

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré qu'il existe deux groupes principaux de composés polyphénoliques dans les extraits étudiés de myrte du désert algérien: les flavonols et les tanins hydrolysables. Ceci est en accord avec des études antérieures sur ce genre, en particulier sur les feuilles de *M. communis*, dans lesquelles les principaux composés phénoliques sont également les flavonols (myricétine-3-*O*-galactoside, myricétine-3-*O*-rhamnoside et quercétine-3-*O*-glucoside), flavan-3-ols (catéchine, gallocatéchine et épigallocatechine) et des tanins hydrolysables (Romani *et al.*, 1999, 2004, 2012; Viuda-Martos *et al.*, 2011).

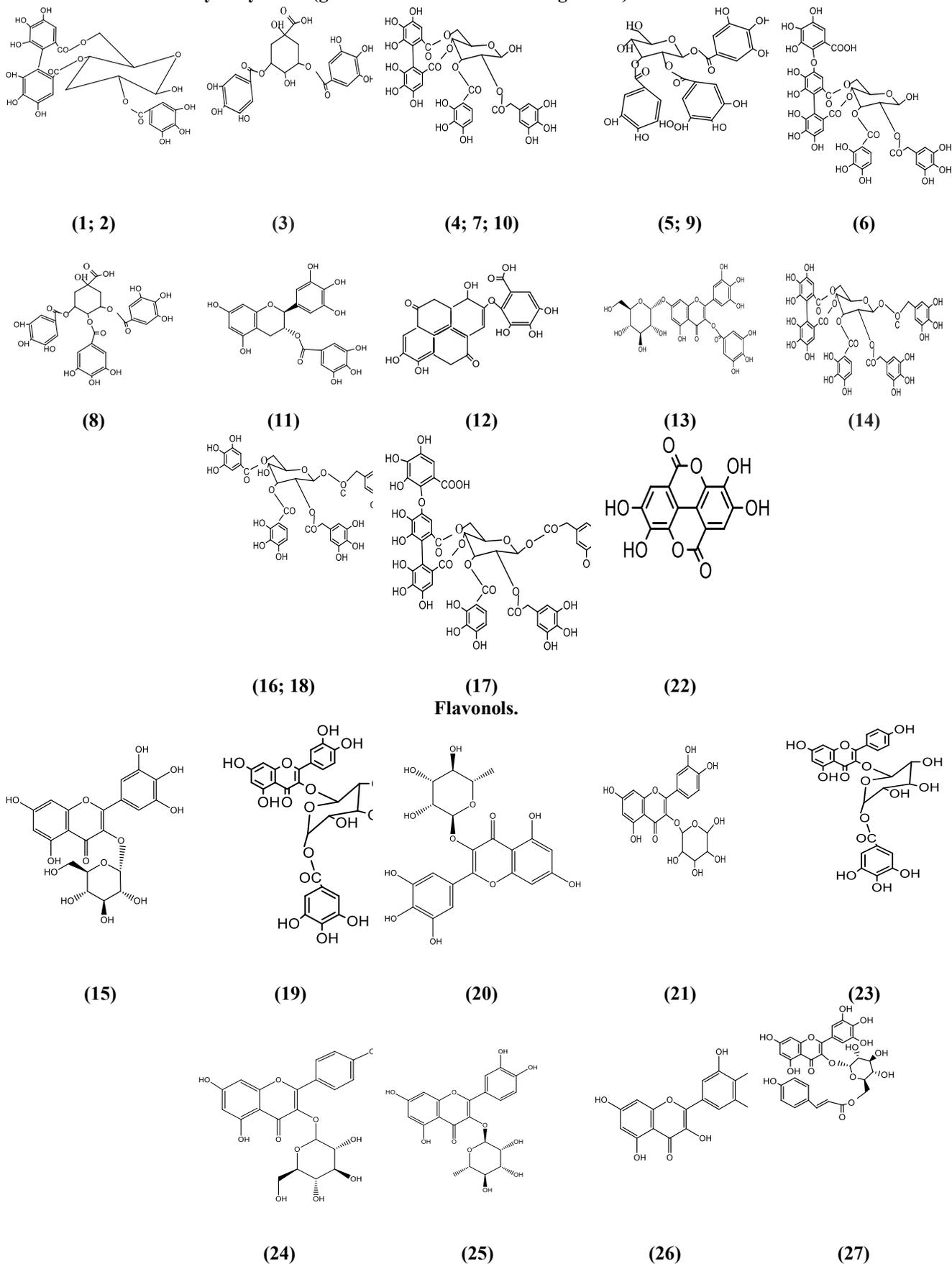


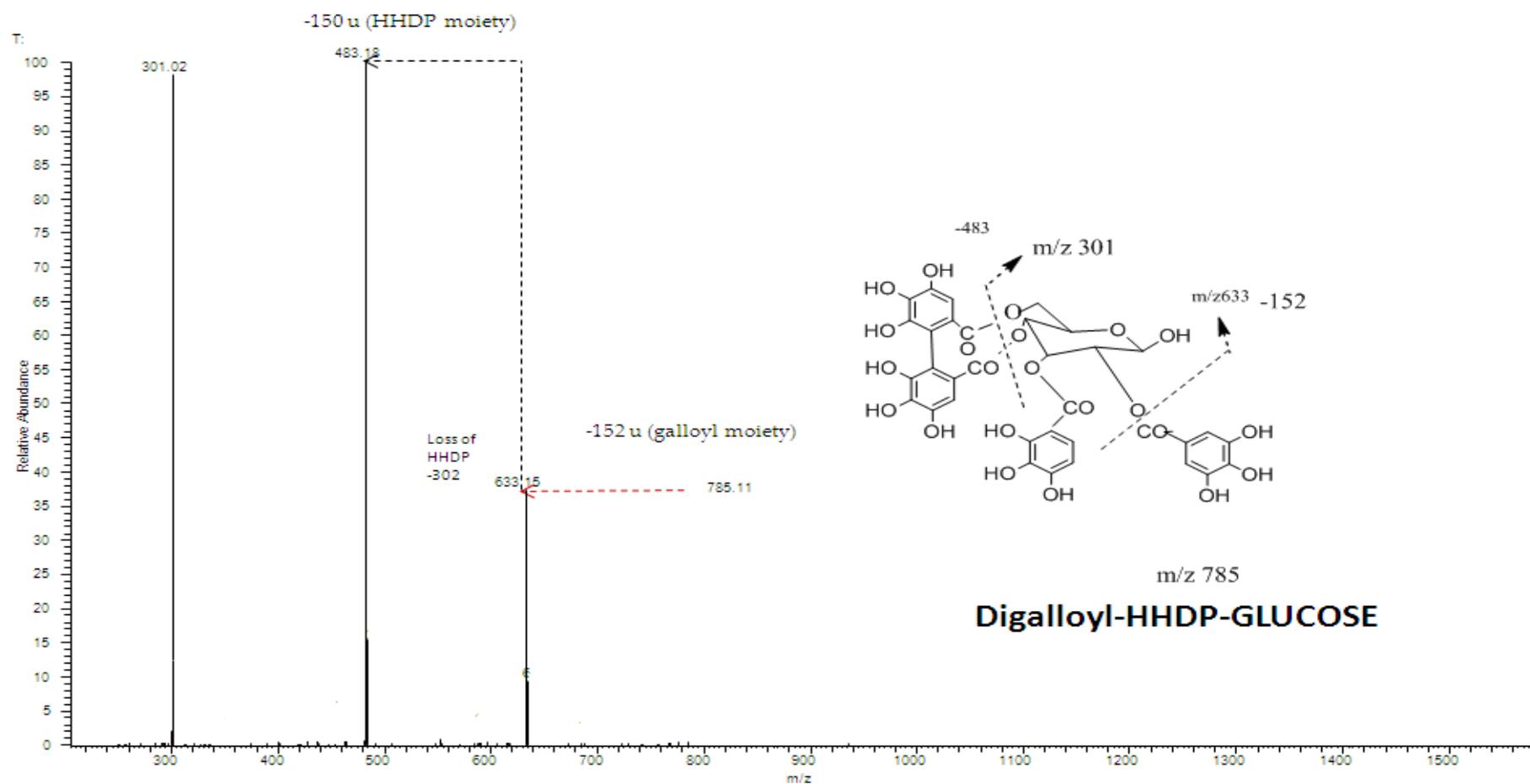
a



**Figure 21.** Profil chromatographique HPLC-DAD des composés phénoliques de la fraction d'acétate d'éthyle (a), fraction butanolique (b), extrait aqueux de *M. nivellii* enregistré à 280 et à 370 nm. Les composés sont indiqués dans le tableau 12

## Tanins hydrolysables (gallotanins et dérivés des ellagitannins)

Figure 22. Structures chimiques de différents composés phénoliques identifiés chez *M. nivellii*



**Figure 23.** Spectre de masse et fragmentation de l'ion digalloyl-HHDP-glucose identifié dans les extraits de *M. nivellii*

**Tableau 12:** Identification et quantification des composés phénoliques dans les feuilles de *M. nivellii* (moyenne  $\pm$  SD). Temps de rétention (Rt), longueurs d'onde d'absorption maximale dans la région visible ( $\lambda_{\max}$ ), données spectrales de masse

Composé	Rt (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Identification	Quantification (mg/g extrait)		
						Extrait aqueux brut	Fraction acétate d'éthyle	Fraction butanolique
1	4.43	267	633	463 (100), 301 (62)	Galloyl-HHDP-glucoside <sup>1</sup>	nd	nd	10.1 $\pm$ 0.4
2	5.09	266	633	463 (100), 301 (51)	Galloyl-HHDP-glucoside <sup>1</sup>	29.0 $\pm$ 0.5*	nd	17.4 $\pm$ 0.2*
3	5.32	273	495	343 (100), 191 (86), 169 (60)	Acide digalloylquinique <sup>2</sup>	nd	6.41 $\pm$ 0.07*	14.3 $\pm$ 0.2*
4	5.63	274	785	633 (38), 615 (23), 483 (93), 419 (21), 301 (100)	Digalloyl-HHDP-glucoside <sup>1</sup>	14.5 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	19.28 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	26.7 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
5	6.5	269	635	483 (19), 465 (100), 421 (80), 313 (52), 295 (28), 169 (32)	Trigalloylglucoside <sup>2</sup>	3.0 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	7.1 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	6.18 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
6	6.85	256	953	909 (5), 785 (50), 765 (15), 633 (100), 615 (3), 483 (53), 419 (10), 301 (20)	Rugosine B <sup>1</sup>	5.4 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	7.0 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	9.4 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
7	7.77	265	785	633 (21), 615 (8), 483 (100), 419 (12), 301 (72)	Digalloyl-HHDP-glucoside <sup>1</sup>	8.9 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	20.72 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	16.9 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>
8	8.67	276	647	495 (100), 477 (18), 343 (80), 325 (43), 191 (20), 173 (13), 169 (47)	Acide trigalloylquinique <sup>2</sup>	11.2 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	22.2 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	31.3 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
9	9.9	276	635	483 (18), 465 (100), 421 (6), 313 (80), 295 (12), 169 (24)	Trigalloylglucoside <sup>2</sup>	nd	12.3 $\pm$ 0.1*	12.2 $\pm$ 0.3*
10	10.23	270	785	633 (17), 615 (12), 483 (99), 419 (18), 301 (100)	Digalloyl-HHDP-glucoside <sup>2</sup>	7.22 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	11.1 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	6.6 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>
11	10.61	273	915	457 (100), 331 (58), 305 (26), 169 (98)	Dimère gallocatéchine-gallate <sup>3</sup>	10.9 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	35.6 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	13.2 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
12	12.6	258,364	469	425 (100), 301 (75)	Acide valoneique dilactone <sup>1</sup>	nd	9.5 $\pm$ 0.2	8.47 $\pm$ 0.01

13	14.04	356	631	479 (100), 317 (63)	Myricétine-hexosyl-gallate <sup>4</sup>	13.4±0.2 <sup>c</sup>	37.0±0.5 <sup>a</sup>	17.8±0.1 <sup>b</sup>
14	14.78	276	937	767 (100), 635 (17), 465 (56), 301 (37)	Trigalloyl-HHDP-glucoside <sup>1</sup>	4.63±0.05*	17.1±0.4*	nd
15	15.15	357	479	317 (100)	Myricétine-3- <i>O</i> -glucoside <sup>4</sup>	8.48±0.09 <sup>c</sup>	19.88±0.05 <sup>b</sup>	23.6±0.3 <sup>a</sup>
16	15.5	273	787	635 (27), 617 (100), 301 (15)	Tetragalloylglucose <sup>1</sup>	nd	16.3±0.1	nd
17	16.01	260	1105	1061 (100), 937 (87), 785 (29), 767 (84), 635 (14), 465 (61), 419 (21), 301 (41)	Rugosine A <sup>1</sup>	4.9±0.2 <sup>c</sup>	9.7±0.1 <sup>a</sup>	7.8±0.2 <sup>b</sup>
18	16.4	277	787	635 (15), 617 (100), 301 (25)	Tetragalloylglucose <sup>1</sup>	4.02±0.02*	13.2±0.5*	nd
19	17.13	352	615	463 (100), 301 (66)	Quercétine-hexosyl-gallate <sup>5</sup>	1.88±0.08 <sup>c</sup>	10.54±0.06 <sup>a</sup>	1.99±0.04 <sup>b</sup>
20	17.83	356	463	317 (100)	Myricétine-3- <i>O</i> -rhamnoside <sup>4</sup>	11.3±0.4 <sup>c</sup>	85.75±0.03 <sup>a</sup>	12.4±0.1 <sup>b</sup>
21	18.75	354	463	301 (100)	Quercétine-3- <i>O</i> -glucoside <sup>5</sup>	1.64±0.02 <sup>c</sup>	3.1±0.2 <sup>a</sup>	2.18±0.02 <sup>b</sup>
22	19.17	251,366	301	284 (15), 245 (20), 185 (12), 173 (5), 157 (3)	Acide ellagique <sup>1</sup>	nd	27.1±0.1*	6.4±0.4*
23	19.61	356	599	447 (100), 285 (28)	Kaempférol-hexosyl-gallate <sup>6</sup>	4.3±0.4*	8.34±0.07*	nd
24	21.52	351	447	285 (100)	Kaempférol-3- <i>O</i> -glucoside <sup>6</sup>	nd	3.3±0.1	nd
25	22.8	348	447	301 (100)	Quercétine-rhamnoside <sup>5</sup>	nd	3.2±0.2	nd
26	25.05	370	317	299 (18), 289 (29), 273 (12), 245 (14)	Myricétine <sup>4</sup>	nd	5.5±0.1	nd
27	27.93	316	625	479 (100), 317 (32)	Myricétine-coumaroylhexoside <sup>4</sup>	nd	2.12±0.04	nd
<b>Tanins hydrosolubles totaux</b>						93±1 <sup>c</sup>	172±1 <sup>a</sup>	167.5±0.4 <sup>b</sup>
<b>Acides phénoliques totaux</b>						-	27.08±0.08 <sup>a</sup>	6.4±0.4 <sup>b</sup>
<b>Flavonoïdes totaux</b>						45±1 <sup>c</sup>	200±2 <sup>a</sup>	62.9±0.7 <sup>b</sup>

---

<b>Composés phénoliques totaux</b>	138±3 <sup>c</sup>	398±3 <sup>a</sup>	236.8±0.1 <sup>b</sup>
--	--------------------	--------------------	------------------------

---

Dans chaque rangée, les différentes lettres signifient des différences significatives entre l'extrait brut de *M. nivellii* et les fractions ( $p < 0.05$ ). Lorsque seulement deux échantillons étaient présents, le test-*t* de Student a été utilisé pour déterminer la différence significative entre deux échantillons différents, avec  $\alpha = 0.05$ ; \* signifie une différence significative entre les échantillons ( $p < 0.001$ )

### II.1.2. *O. quadripartita*

Les analyses par LC-DAD-ESI/MS/MS ont permis d'identifier les composés phénoliques dans l'extrait aqueux et les fractions d'acétate d'éthyle et butanolique dans les feuilles d'*O. quadripartita* (**Tableau 13; Figure 25**). La figure 24 montre les chromatogrammes de l'extrait aqueux et des fractions obtenues à 280 et 370 nm par HPLC-DAD avec attribution des pics majoritaires.

Vingt-huit composés phénoliques individuels: quinze flavan-3-ols, six flavones, quatre flavonols, deux acides phénoliques et un dérivé des flavanones sont détectés. A notre connaissance, il s'agit de la première étude caractérisant complètement la composition phénolique dans les feuilles d'*O. quadripartita*. Le plus grand groupe de composés présents à la fois dans les fractions et dans l'extrait est les dérivés de flavan-3-ols (**Figure 26**). Les composés 8 et 12 sont identifiés comme étant la (+)-catéchine et (-)l'épicatéchine, en fonction de leurs caractéristiques de temps de rétention, de masse et UV-vis en comparaison avec des standards commerciaux. Les flavan-3-ols restants sont identifiés comme étant des proanthocyanidines basés sur leurs ions pseudo moléculaires et leurs motifs de fragmentation MS<sup>2</sup>. L'analyse des fragments produits fournit des informations sur le type des unités élémentaires et peut également indiquer leur position relative dans des proanthocyanidines oligomères. Les spectres de masse ne permettent cependant pas d'établir la position de la liaison entre les unités de flavonols (c'est-à-dire C4-C8 ou C4-C6) ni de différencier les catéchines isomères (par exemple, la catéchine/ l'épicatéchine).

Les composés 3, 5, 9, 11, 14, 16 et 21 présentent le même ion pseudo moléculaire [M-H]<sup>-</sup> à m/z 577 et les mêmes motifs de fragmentation MS<sup>2</sup> concordant avec les dimères de type B (épi) catéchine. Les ions fils produits caractéristiques MS<sup>2</sup> sont observés à m/z 451 (-126 u), 425 (-152 u) et 407 (-152-18 u), sont attribuables au HRF (*heterocyclic ring fission*): capture de l'hétérocycle, au RDA (*Retro-Diels-Alder fission*): capture apparaissant sur des cycles de plus de six carbones et à la perte d'eau à partir d'une unité (épi) de catéchine, et à m/z 289 et 287, qui pourraient être associés aux fragments correspondant respectivement à l'unité de catéchine inférieure et supérieure (épi) (**Santos-Buelga et González-Paramás, 2014**). Selon leur comportement d'élution, ces composés pourraient être temporairement attribués aux différents dimères de catéchine (C) et d'épicatéchine (EC) liés par des liaisons inter-flavanaires C4-C8 ou C4-C6. Ainsi, dans la RP-HPLC, on s'attend à ce que les procyanidines B3 (C-4,8-C) et B1 (EC-4,8-C) s'éluent avant la (+)-catéchine et les dimères B4 (C-4,8-CE) et B2 (EC-4,8-EC) avant (-)-épicatéchine (**Santos-Buelga et al., 2003**). Ainsi, qu'ils

pourraient être associés aux pics 3, 5, 9 et 11, respectivement, une identification qui a également été soutenue par une comparaison avec nos composées bibliothécaires. Quant aux pics 14, 16 et 21, il pourrait s'agir de dimères liés en C4-C6 en tenant compte de leur élution ultérieure. En fonction de leur position relative dans le chromatogramme, ils pourraient correspondre aux procyanidines B7 (EC-4,6-C), B8 (C-4,6-EC) et B5 (EC-4,6-EC). Les concentrations de ces composés dans les échantillons semblent cohérentes avec ces identités, puisque les dérivés liés à C4-C6 sont habituellement moins abondants que leurs homologues C4-C8 (de Pascual-Teresa *et al.*, 2000).

De même, les pics 1, 2, 6, 7 et 19 (ions pseudo-moléculaires  $[M-H]^-$  à  $m/z$  865) peuvent être attribués en tant que type B-(épi) catéchinotrimères. Dans ce cas, il est plus difficile d'anticiper une structure pour les composés, bien que les oligomères ont censés s'éluer d'autant plus tôt, que le nombre d'unités de catéchines inférieures est élevé (Santos-Buelga *et al.*, 2003). les pics 1 et 2 pourraient être correspondre aux trimères C-4, 8-C-4, 8-C (C2) et EC-4, 8-C-4, 8-C, les seuls susceptibles d'être élués avant le dimère B3. Dans tous les cas, les schémas de fragmentation sont cohérents avec ceux attendus pour de tels types de composés, c'est-à-dire similaires à ceux observés pour les dimères de proanthocyanidines mais avec des fragments supplémentaires à partir des clivages alternatifs de différentes liaisons inter-flavanes.

Le pic 10 présente un ion pseudo moléculaire  $[M-H]^-$  à  $m/z$  435 avec un ion fragment  $MS^2$  à 289 suite à la perte de -146 u, correspondant à un rhamnoside. La possibilité que ce fragment puisse correspondre à un résidu de *p*-coumaroyl peut être éliminée car aucun maximum n'a été observé dans le spectre UV autour de 310 nm. Le fragment  $MS^2$  reste avec (épi) catéchine. L'ordre d'élution du composé suggère qu'il pourrait être dérivé d'épicatéchine car les dérivés glycosylés devraient s'éluer avant leurs aglycones correspondants, de sorte qu'il soit identifié comme étant l'épicatéchine-*O*-rhamnoside.

Les composés 13, 15, 17, 18, 22 et 23 présentent des ions pseudo-moléculaires  $[MH]^-$  à  $m/z$  593 ou 563, libérant des ions fragment  $MS^2$  à  $m/z$  à 473 et / ou 443 suite à la perte de 90 et 120 u, caractéristique de flavones-*C*-glycosylées. La perte de -120 u est typique des hexoses attachées à *C*, alors que celle de -90 u est observée pour les pentoses *C*-attachés et il est également habituel dans le cas des hexoses 6-*C* mais moins fréquent dans le cas des 8-*C*-hexoses (Cuyckens et Claeys, 2004).

Les composés sont identifiés provisoirement comme des glycosides d'apigénine en raison de l'observation des ions à  $m/z$  383 et 353 qui pourraient correspondre à l'aglycone,

plus les résidus des sucres qui lui restent liés (apigénine +113 u) et (apigénine +83 u), respectivement (**Ferreres *et al.*, 2003**). Le fait qu'aucun fragment correspondant à d'hexosyle (-162 u) ou d'une partie de pentosyl (-132 u) n'a été détecté, suggère que les sucres ne sont pas liés par des liaisons hétérosidiques (liaisons-*O*).

Ces observations ont permis l'identification provisoire de ces composés sous la forme de l'apigénine-di-*C*-hexoside (composé 13) et de l'apigénine-*C*-hexoside-*C*-pentoside (composés 15, 17, 18, 22 et 23). Schaftoside (apigénine-6-*C*- $\beta$ -D-glucopyranoside-8-*C*- $\alpha$ -L-arabinopyranoside), isoschaftoside (apigénine-6-*C*- $\alpha$ -L-arabinopyranoside-8-*C*- $\beta$ -D-glucopyranoside) et vicénine-2 (apigénine 6,8-di-*C*-glucoside) déjà rapportés par Iwashina *et al.* (2008) dans des parties aériennes séchées et des fruits d'*Osyris alba*. Ainsi, la vicénine-2 pourrait être supposée provisoirement au pic 13, bien qu'aucune affectation comme schaftoside/isoschaftoside ne puisse être conclue pour les autres cinq composés.

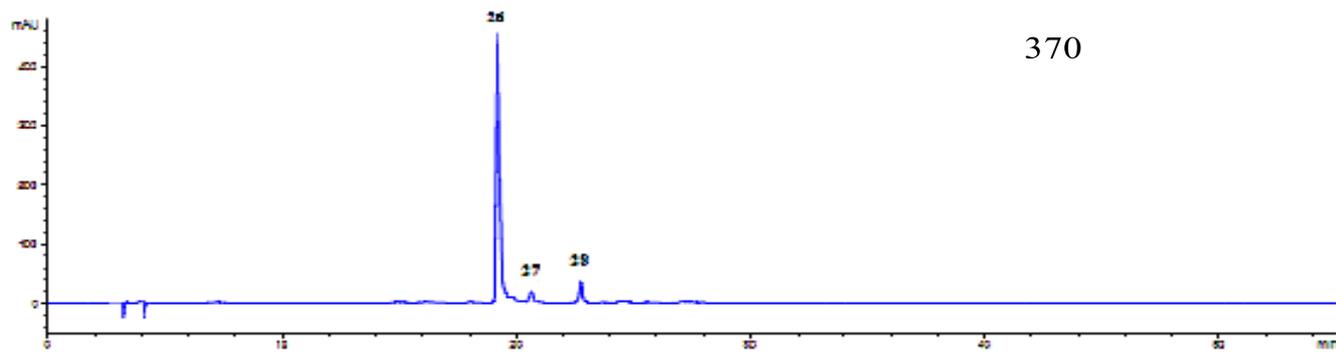
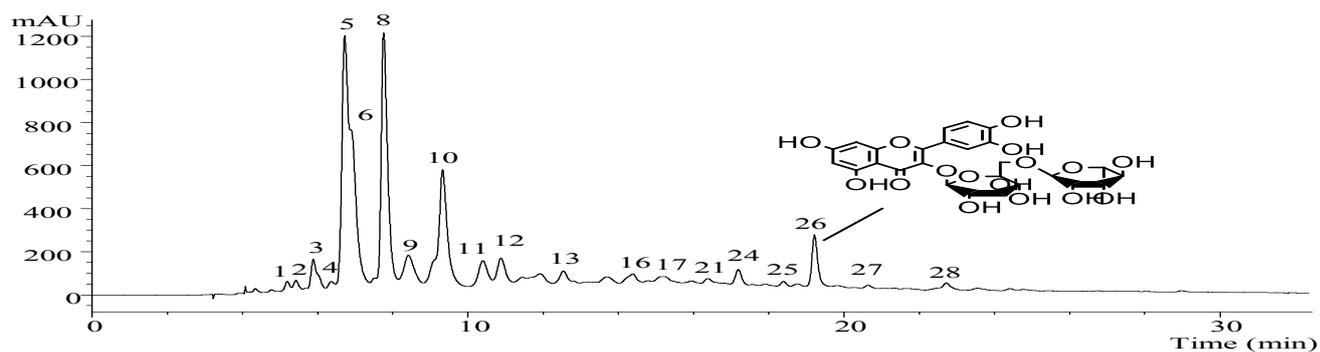
Les pics 4 et 24 ont été positivement identifiés comme acide protocatéchique et l'acide *p*-coumarique, respectivement, en fonction de leurs caractéristiques de temps de rétention, de masse et UV-vis en les comparant avec celles des standards commerciaux. La comparaison avec les standards a également permis d'identifier les pics 26, 27 et 28 comme étant la quercétine-3-*O*-rutinoside (**Figure 26**), la quercétine-3-*O*-glucoside et le kaempférol-3-*O*-rutinoside, respectivement, des mêmes paramètres comparés à ceux des standards commerciaux. Ces trois flavonols ont déjà été décrits chez d'autres espèces d'*Osyris*, telles que *O. alba* (**Iwashina *et al.*, 2008**).

L'ion pseudo moléculaire du composé 20 ( $[MH]^-$  à  $m/z$  755), libérant un seul fragment  $MS^2$  à  $m/z$  301, a indiqué qu'il correspondait à un dérivé de quercétine portant deux résidus désoxyhexosyle et un résidu hexosyle, et que ces trois sucres sont liés ensemble. Étant donné qu'aucune information sur l'identité et l'emplacement des résidus de sucre sur l'aglycone ne peut être obtenue, le composé est provisoirement identifié comme étant la quercétine-*O*-didésoxyhexosyl-hexoside.

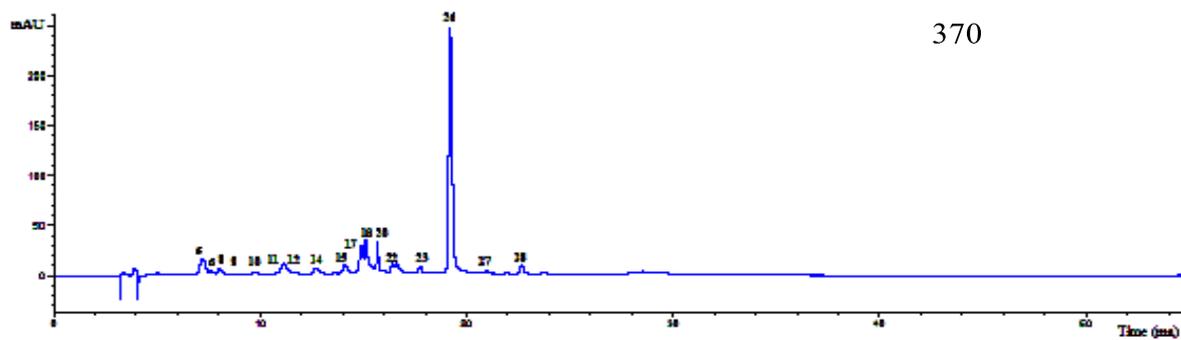
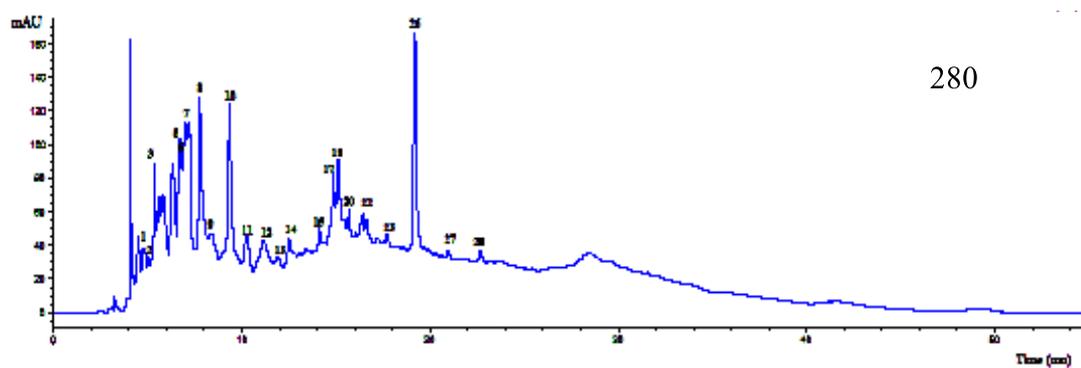
Enfin, le composé 25 ( $[MH]^-$  à  $m/z$  433) présente un ion de fragment  $MS^2$  à  $m/z$  271 (-162 u) indiquant la perte d'un fragment hexoside de l'aglycone, qui est identifié comme étant la flavanone naringénine cette identification également basée sur son spectre UV. Ainsi, il est provisoirement identifié comme étant le naringénine-*O*-hexoside.

Par ailleurs, les profils phénoliques de toutes les fractions et les extraits présentent des similitudes dans leur composition qualitative, bien que certaines différences aient été

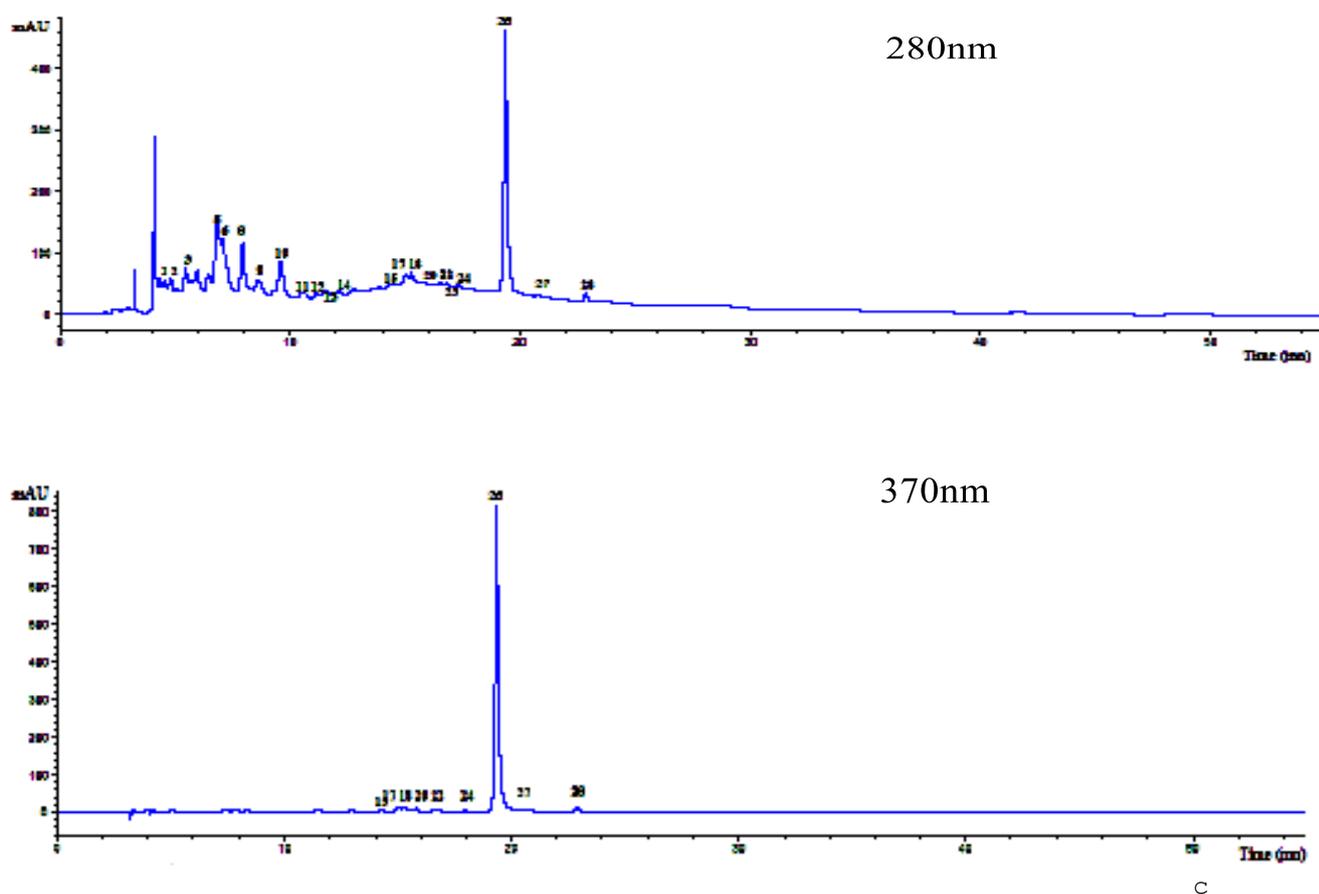
observées, en particulier dans la fraction d'acétate d'éthyle, où aucun dérivé de flavone n'est présent.



a

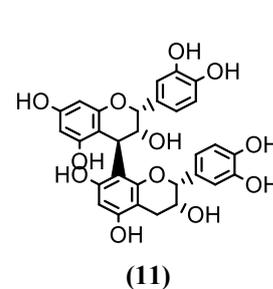
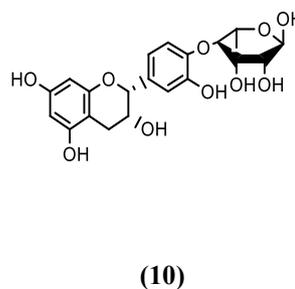
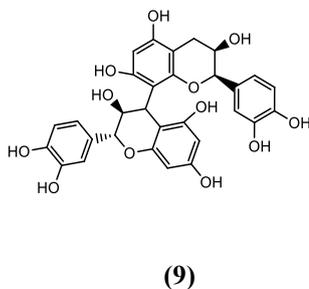
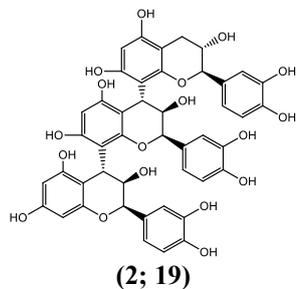
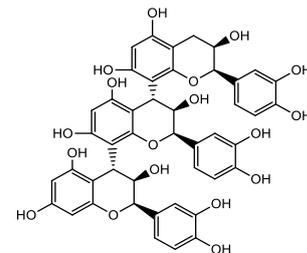
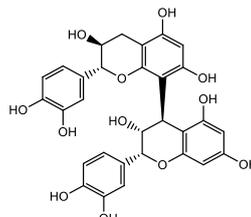
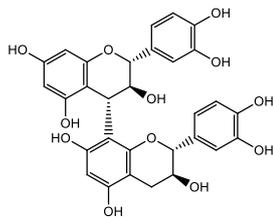
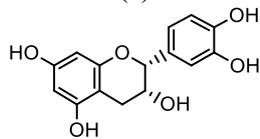
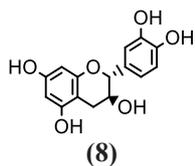


b

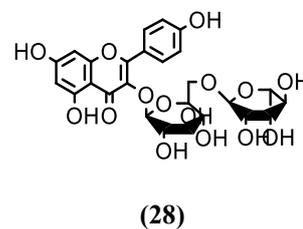
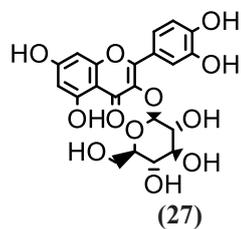
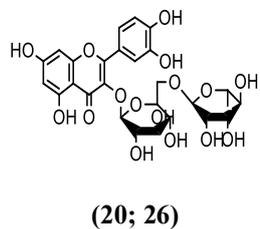


**Figure 24.** Profil chromatographique HPLC-DAD des composés phénoliques de la fraction d'acétate d'éthyle (a), butanolique (b), extrait aqueux (c) d'*O. quadripartita* enregistré à 280 et à 370 nm. Les composés sont indiqués dans le tableau 13.

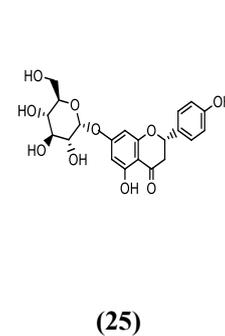
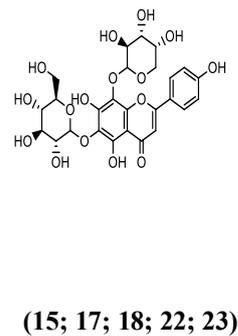
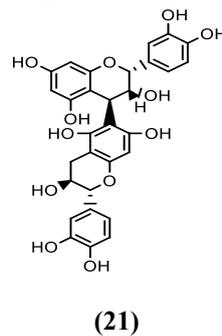
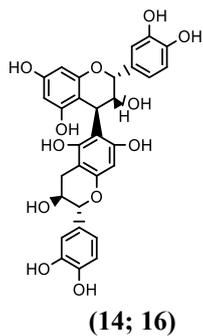
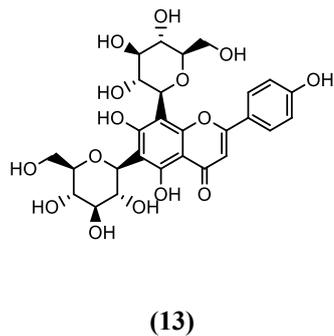
## Flavanols



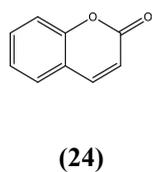
## Flavanols



## Flavones



## Flavanone



## Acides phénoliques

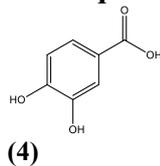


Figure 25. Structures chimiques de différents composés phénoliques identifiés chez *O. quadripartita*

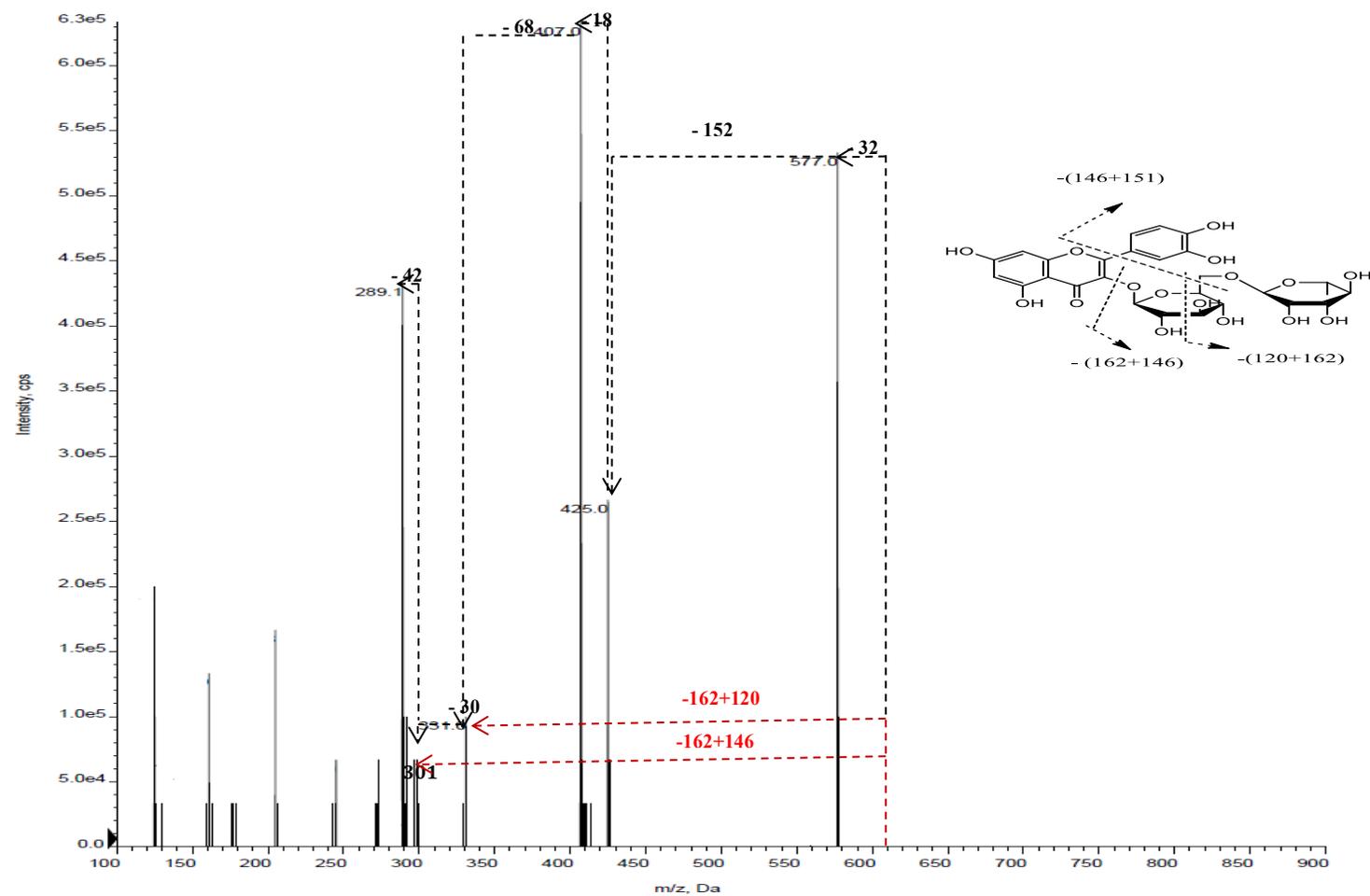


Figure 26. Spectre de masse et fragmentation de l'ion quercétine-3-O-rutinoside identifié dans les extraits d'*O. quadripartita* (ionisation du mode négatif)

**Tableau 13.** Identification et quantification des composés phénoliques dans les feuilles d'*O. quadripartita* (moyenne  $\pm$  SD). Temps de rétention (Rt), longueurs d'onde d'absorption maximale dans la région visible ( $\lambda_{\max}$ ), données spectrales de masse.

Composé	Rt (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	ion Pseudomoléculaire [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Identification	Quantification (mg/g d'extrait)		
						Extrait aqueux	Fraction acétate d'éthyle	Fraction butanolique
1	5.2	278	865	739 (5), 713 (5), 695 (13), 577 (17), 575 (12), 425 (17), 407 (30), 289 (13), 287 (40)	Trimère de (épi)catéchine de type B [identité suggérée : trimère C2 (C-4,8-C-4,8-C)]	2.6 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	3.4 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	5.1 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
2	5.4	280	865	739 (9), 713 (13), 695 (22), 577 (30), 575 (26), 425 (17), 407 (39), 289 (17), 287 (26)	Trimère de (épi)catéchine de type B [identité suggérée: trimère: EC-4,8-C-4,8-C]	4.0 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	3.77 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	4.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
3	5.9	280	577	451 (23), 425 (31), 407 (100), 289 (62), 287 (8)	Dimère de procyanidine B3 (C-4,8-C)	5.02 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	11.32 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	2.1 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>
4	6.0	260,296sh	153	109 (100)	Acide protocatéchine	nd	1.5 $\pm$ 0.2	nd
5	6.7	280	577	451 (15), 425 (46), 407 (100), 289 (50), 287 (9)	Dimère de procyanidine B1 (EC-4,8-C)	11.1 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	100.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	8.7 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>
6	6.9	280	865	739 (5), 713 (5), 695 (16), 577 (31), 575 (10), 425 (15), 407 (38), 289 (23), 287 (15)	Trimère de (épi)catéchine type B	12.1 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	74.1 <sup>a</sup>	10.8 $\pm$ 0.5 <sup>c</sup>

7	7.3	280	865	739 (8), 713 (7), 695 (20), 577 (45), 575 (8), 425 (20), 407 (30), 289 (11), 287 (25)	Trimère de (épi)catéchine type B	nd	nd	6.6±0.2
8	7.8	280	289	245 (42), 203 (36), 187 (27), 161 (13), 137(28)	(+)-Catéchine (C)	10.1±0.2 <sup>c</sup>	110.5±0.3 <sup>a</sup>	12.8±0.3 <sup>b</sup>
9	8.4	280	577	451 (13), 425 (38), 407 (100), 289 (48), 287 (15)	Dimère de procyanidine B4 (E-4,8-EC)	5.7±0.1 <sup>b</sup>	30±1 <sup>a</sup>	4.5±0.2 <sup>c</sup>
10	9.3	278	435	289 (30), 271 (11), 245 (6), 203 (8), 161 (5), 137 (100), 125 (49)	Épicatéchine- <i>O</i> -rhamnoside	6.8±0.3 <sup>c</sup>	67.1±0.4 <sup>a</sup>	12.7±0.5 <sup>b</sup>
11	10.4	280	577	451 (18), 425 (82), 407 (91), 289 (100), 287 (18)	Dimère de procyanidine B2 (EC-4,8E-C)	1.18±0.02 <sup>c</sup>	21.7±0.2 <sup>a</sup>	7.7±0.2 <sup>b</sup>
12	10.9	278	289	245 (39), 203 (30), 187 (17), 161 (13), 137 (17)	(-)-Épicatéchine (EC)	1.25±0.01 <sup>b</sup>	21±1 <sup>a</sup>	0.71±0.01 <sup>c</sup>
13	11.1	338	593	503 (12), 473 (20), 383 (40), 365 (8), 353 (40), 325 (14), 297 (12), 283 (13)	Apigénine-6,8-di- <i>C</i> -glucoside (vicénine-2)	0.4±0.01 <sup>b</sup>	nd	1.2±0.3 <sup>a</sup>
14	12.5	280	577	451 (20), 425 (18), 407 (5), 289 (54)	Dimère de procyanidine B7 (EC-4,6-C)	1.4±0.05 <sup>c</sup>	12.4±0.3 <sup>a</sup>	2.5±0.1 <sup>b</sup>
15	14.1	336	563	545 (3), 503 (13), 473 (13), 443 (13), 383 (22), 353 (48), 297 (13)	Apigénine-6- <i>C</i> -hexoside-8- <i>C</i> -pentoside	0.32±0.01 <sup>b</sup>	nd	0.75±0.01 <sup>a</sup>
16	14.4	280	577	451 (15), 425 (31), 407 (92), 289 (69), 287 (23)	Dimère de procyanidine B8 (C-4,6-EC)	nd	9.7±0.5	nd
17	14.9	336	563	545(3),503(7),473(7),443(12),383(35),353(30),297(12)	Apigénine-6- <i>C</i> -hexoside-8- <i>C</i> -pentoside	0.72±0.04 <sup>b</sup>	nd	1.87±0.04 <sup>a</sup>
18	15.2	336	563	545(3),503(4),473(7),443(20),383(24),353(26),297(5)	Apigénine-6- <i>C</i> -hexoside-8- <i>C</i> -pentoside	0.87±0.01 <sup>b</sup>	nd	1.9±0.1 <sup>a</sup>

19	15.3	280	865	739 (29), 713 (5), 695 (29), 577 (18), 575 (29), 425 (18), 407 (41), 289 (29), 287 (18)	Trimère de (épi)catéchine B	nd	6.7±0.5	nd
20	15.7	358	755	301 (100)	Quercétine- <i>O</i> -dideoxyhexosyl-hexoside	0.50±0.02 <sup>b</sup>	nd	1.62±0.01 <sup>a</sup>
21	16.4	280	577	451(5),425(18),407(12),289(35),287(12)	Dimère de procyanidine B5 (EC-4,6-EC)	nd	6.9±0.2	nd
22	16.5	338	563	545 (3), 503 (6), 473 (19), 443 (16), 383 (12), 353 (13), 297 (6)	Apigénine-6- <i>C</i> -hexoside-8- <i>C</i> -pentoside	0.15±0.01 <sup>b</sup>	nd	0.56±0.03 <sup>a</sup>
23	16.7	336	563	443 (21), 383 (11), 353 (12), 297 (12)	Apigénine-6- <i>C</i> -hexoside-8- <i>C</i> -pentoside	0.20±0.01 <sup>b</sup>	nd	0.58±0.02 <sup>a</sup>
24	17.2	312	163	119 (100)	Acide <i>p</i> -coumarique	0.050±0.001 <sup>b</sup>	1.9±0.1 <sup>a</sup>	nd
25	18.4	282, 324sh	433	271 (100)	Naringénine- <i>O</i> -hexoside	nd	1.10±0.01	nd
26	19.2	358	609	301 (100)	Quercétine-3- <i>O</i> -rutinoside	33.8±0.1 <sup>b</sup>	17.70±0.02 <sup>c</sup>	36.0±0.1 <sup>a</sup>
27	20.6	352	463	301 (100)	Quercétine-3- <i>O</i> -glucoside	0.14±0.01 <sup>b</sup>	0.68±0.01 <sup>a</sup>	0.12±0.01 <sup>b</sup>
28	22.7	348	593	285 (100)	Kaempférol-3- <i>O</i> -rutinoside	1.03±0.07 <sup>c</sup>	2.40±0.01 <sup>a</sup>	1.90±0.05 <sup>b</sup>
<b>Acides phénoliques totaux</b>						0.05±0.001 <sup>b</sup>	3.4±0.3 <sup>a</sup>	nd
<b>flavan-3-ols totaux</b>						62±2 <sup>c</sup>	479±5 <sup>a</sup>	79±2 <sup>b</sup>
<b>Flavonols totaux</b>						35.48±0.02 <sup>b</sup>	20.78±0.02 <sup>c</sup>	39.67±0.02 <sup>a</sup>
<b>Flavones totaux</b>						2.7±0.1 <sup>b</sup>	nd	6.9±0.1 <sup>a</sup>
<b>Flavanones totaux</b>						nd	1.10±0.01	nd

---

<b>Composés phénoliques totaux</b>	100±2 <sup>b</sup>	504±5 <sup>a</sup>	125±2 <sup>b</sup>
--	--------------------	--------------------	--------------------

---

Catéchine (C), épicatechine (EC) et non déterminé (nd). Dans la rangée des composés phénoliques totaux, les différentes lettres signifient des différences significatives entre l'extrait d'*O. quadripartita* et les fractions ( $p < 0.05$ ).

### II.1.3. *T. articulata*

Le profil phénolique de l'extrait aqueux brut de feuilles de *T. articulata* et de ses fractions est enregistré à 280 et à 370 nm. La figure 27 montre un profil chromatographique obtenu pour tous les extraits. Les caractéristiques des composées, les tentatives d'identification et la quantification sont présentées dans le tableau 14. La séparation chromatographique a permis d'élucider les structures de neuf composés phénoliques, dont trois flavan-3-ols (pics 1-3) et six flavonols (pics 4-9) (**Figure 28**).

Les composés 2 et 3 sont identifiés sont la (+)-catéchine et (-)-épicatéchine, respectivement, en fonction de leurs caractéristiques de temps de rétention, de masse et de specters UV-Vis en les comparant par rapport aux standards commerciaux. Ces deux composés ont été précédemment décrits dans des extraits de rameaux de *T. articulata* obtenus par décoction (extrait aqueux) et par soxhlet (acétate d'éthyle et extrait méthanolique) (**Zidane et al., 2014**). Le composé 1 ( $[M-H]^-$  à  $m/z$  577) révèle un motif de fragmentation  $MS^2$  cohérent avec le dimère de catéchine de type B (épi) ((épi) catéchine dimère). Les ions observées à  $m/z$  451 (-126 u), 425 (-152 u) et 407 (-152-18 u), sont attribuables aux réactions de HRF (fissures hétérocycliques), RDA (retro-Diels-Alder) et une perte supplémentaire d'eau d'une unité (épi) catéchine. Quant à  $m/z$  289 et 287, ils pourraient être associés respectivement aux fragments correspondant à l'unité inférieure et supérieure (épi) de catéchine (**Rached et al., 2016**). A notre connaissance, ce composé n'a pas été signalé précédemment dans *T. articulata*.

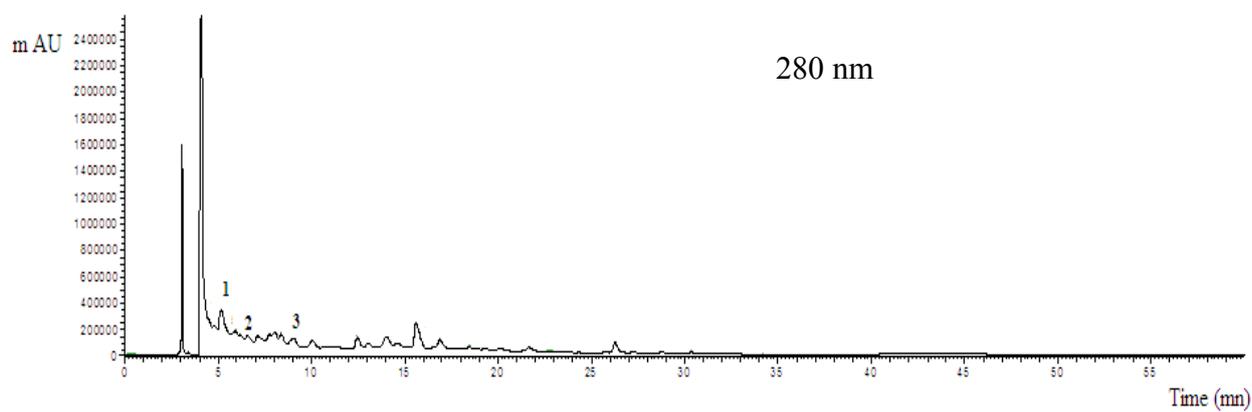
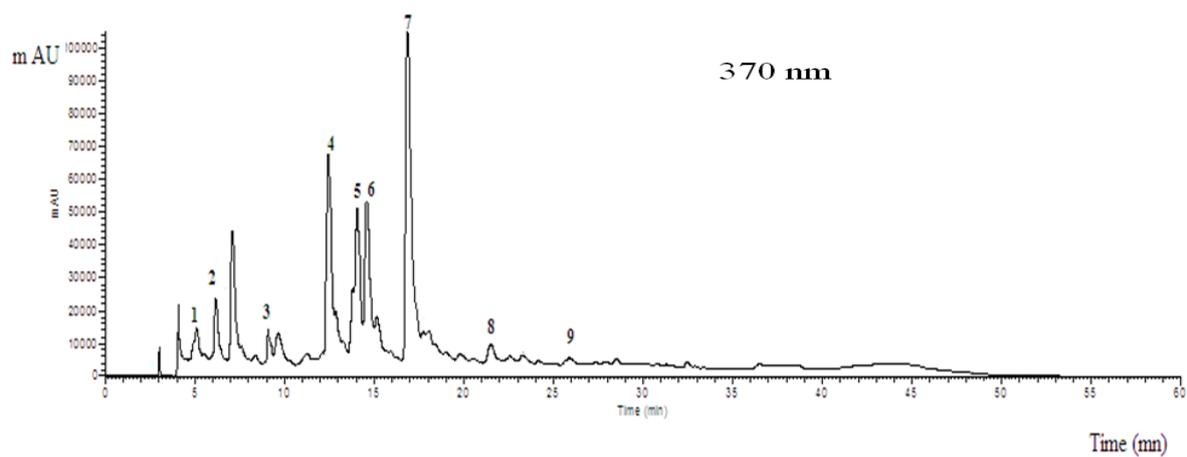
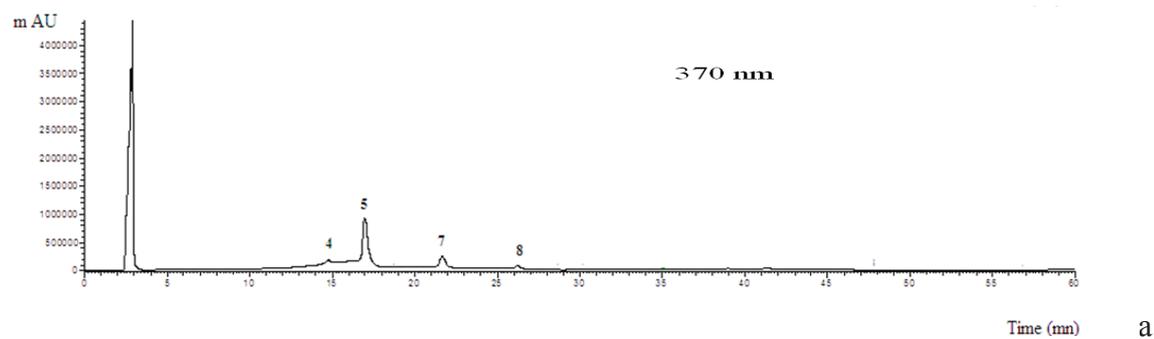
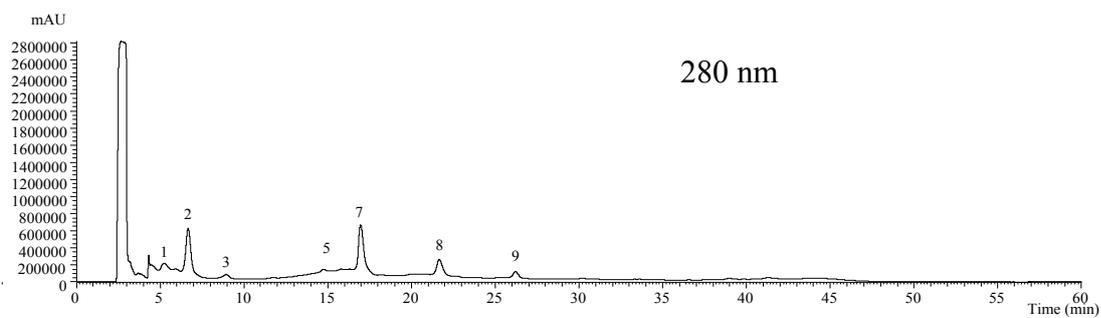
Les dérivés glycosidiques de flavonols identifiés sont des dérivés de la myricétine ( $\lambda$  max autour de 354 nm et un fragment  $MS^2$  à  $m/z$  317, pics 4-7), de la quercétine ( $\lambda$  max environ 350 nm et un fragment  $MS^2$  à  $m/z$  301, pic 8) et kaempférol ( $\lambda$  max autour de 340 nm, fragment  $MS^2$  à  $m/z$  285, pic 9) (**Tableau 14**). Le composé 6 ( $[MH]^-$  à  $m/z$  479) assigné comme est identifié comme étant la myricétine-3-*O*-glucoside par comparaison à un standard commercial.

Le composé 4 ( $[MH]^-$  à  $m/z$  611) libère deux fragments  $MS^2$  à  $m/z$  479 ( $[MH-132]^-$  correspondant à la perte d'un fragment de pentosyle) et  $m/z$  317 ( $[MH-162]^-$  lié à une perte d'un fragment d'hexosyle), laissant un résidu correspondant à la myricétine. Le fait que les deux fragments  $MS^2$  sont libérés suggère que les deux sucres soient attachés dans les

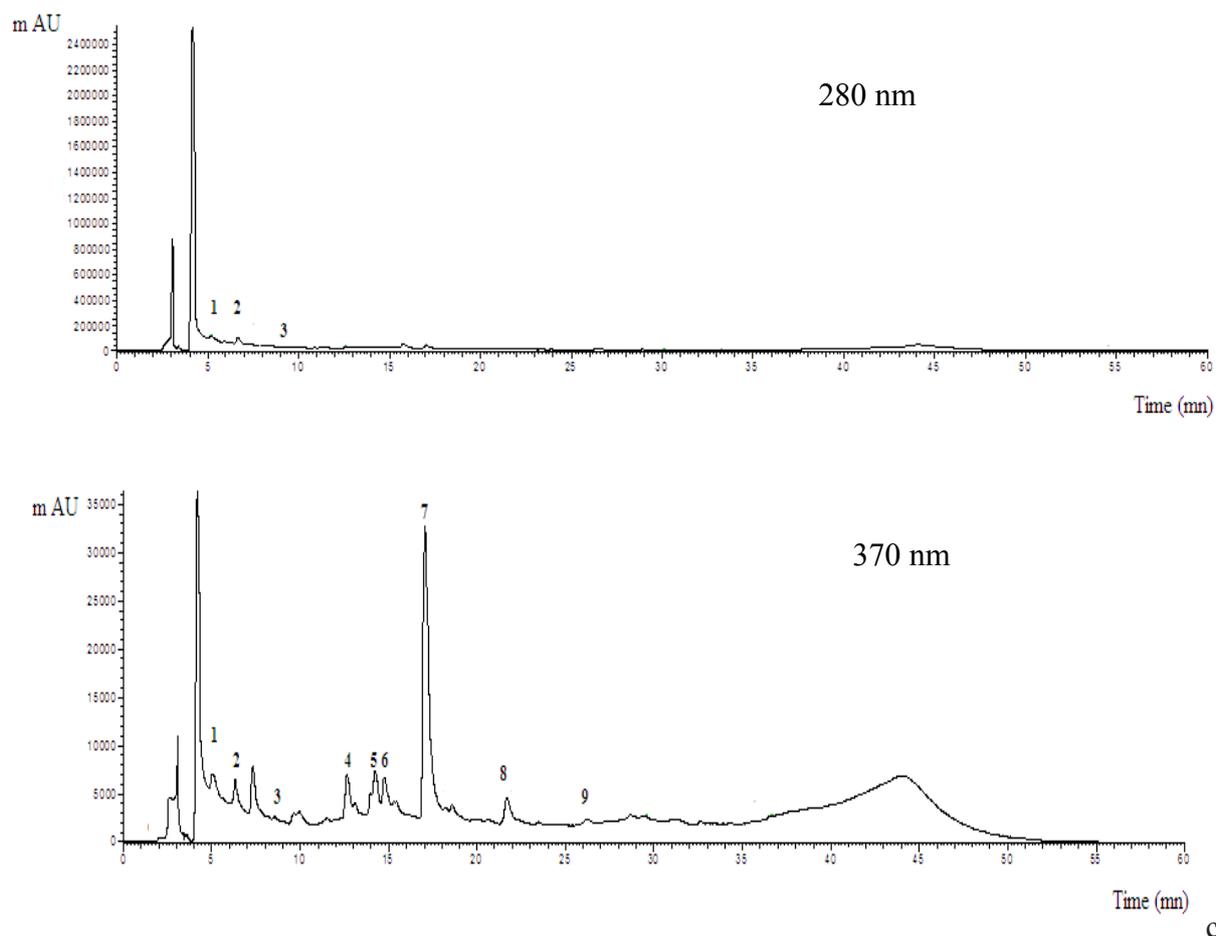
positions différentes de l'aglycone, ce qui laisse suggérer que le composé 4 est la myricétine-*O*-pentosyl-*O*-hexoside.

Le composé 5 ( $[M-H]^-$  à  $m/z$  625) libère un fragment  $MS^2$  à  $m/z$  317 ( $[M-H-308]^-$  correspondant à la perte d'un fragment désoxyhexosyl-hexoside). La présence de myricétine-3-*O*-glucoside pourrait indiquer que le pic 5 est également un 3-*O*-rutinoside, ce qui nous conduit à la proposition de la myricétine-3-*O*-rutinoside pour ce composé. Ces deux composés n'ont pas été rapportés dans le profil phénolique de *T. articulata* par Zidane *et al.* (2014).

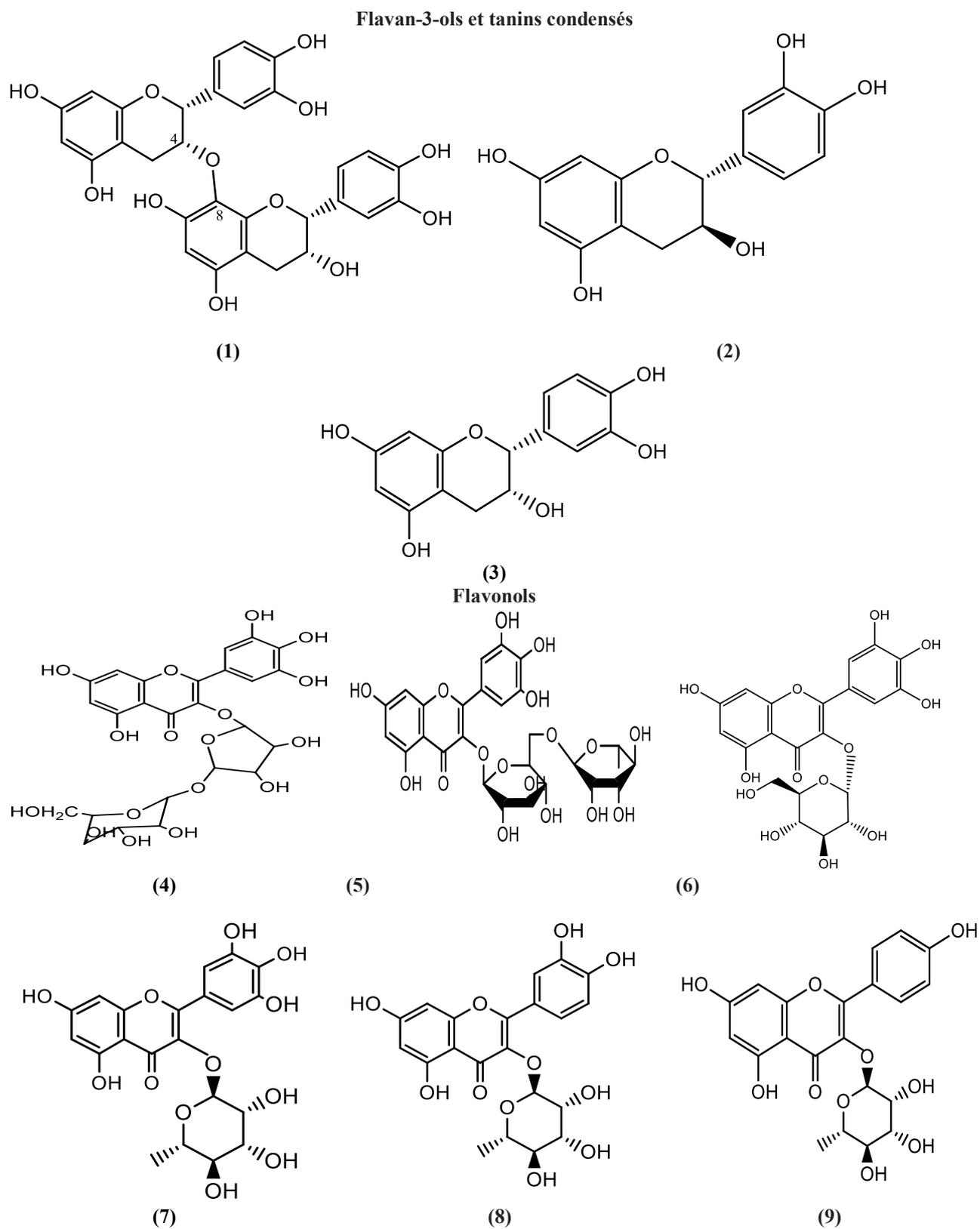
Les composés restants (pics 7 à 9) présentent des fragments  $MS^2$  correspondants à la perte d'une partie rhamnosyl (-146 mu) de myricétine (**Figure 29**), quercétine et de kaempférol. Ces composés ont été précédemment décrits dans des extraits de rameaux de *T. articulata* (Zidane *et al.*, 2014), ainsi assignés comme étant myricétine-3-*O*-rhamnoside (myricitrine, pic 7), quercétine-3-*O*-rhamnoside (quercitrine, pic 8) et kaempférol-3-*O*-rhamnoside (afzéline, pic 9).



b



**Figure 27.** Profil chromatographique HPLC-DAD des composés phénoliques de la fraction d'acétate d'éthyle (a), butanolique (b), extrait aqueux (c) de *T. articulata* enregistrée à 280 et à 370 nm. Les composés sont indiqués dans le tableau 14



**Figure 28.** Structures chimiques de différents composés phénoliques identifiés chez *T. articulata*

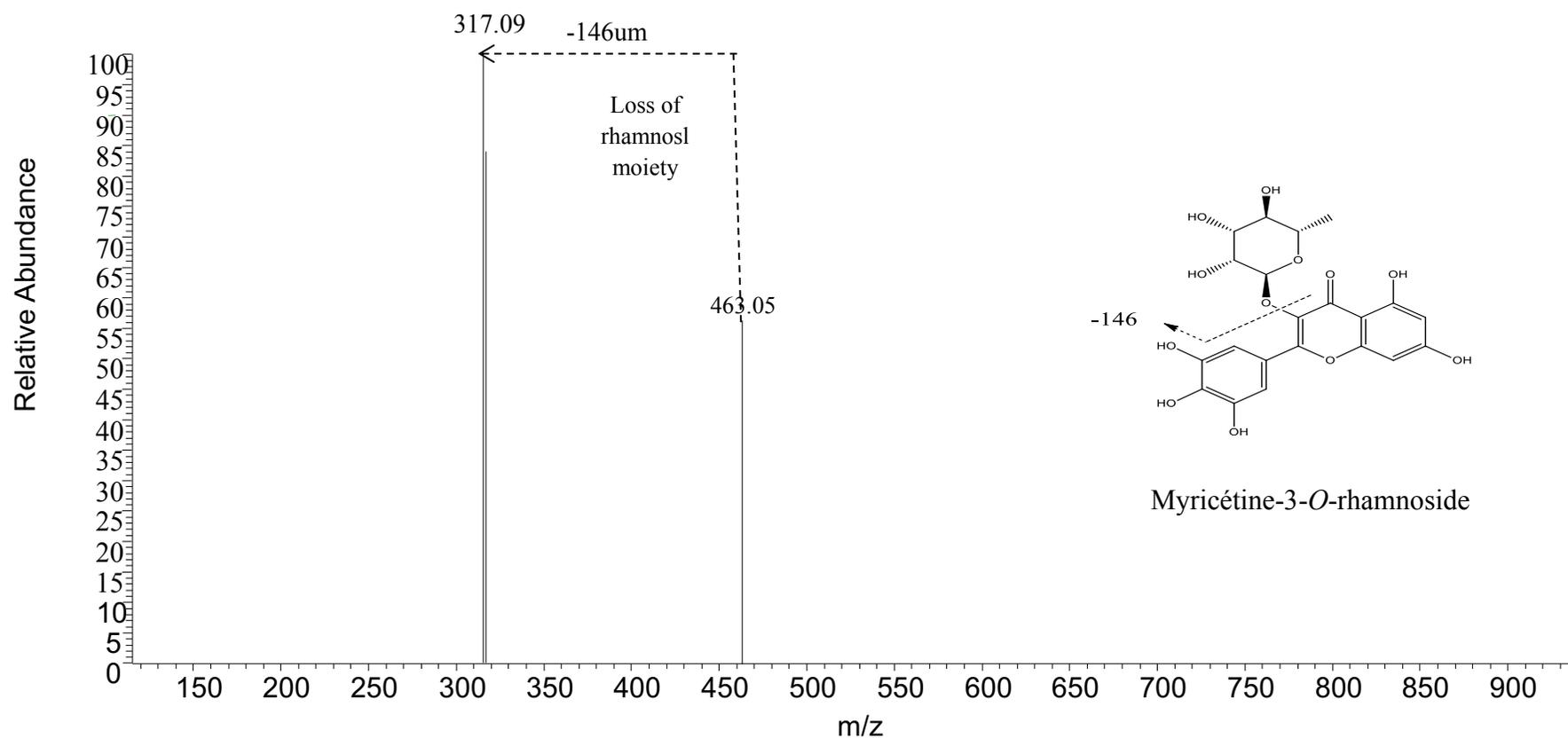


Figure 29. Spectre de masse et fragmentation de l'ion myricétine-3-O-rhamnoside identifié dans les extraits de *T. articulata*

**Tableau 14.** Identification et quantification des composés phénoliques dans les feuilles de *T. articulata* (moyenne  $\pm$  SD). Temps de rétention (Rt), longueurs d'onde d'absorption maximale dans la région visible ( $\lambda_{\max}$ ), données spectrales de masse.

Composé	Rt (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Tentative d'identification	Quantification (mg/g extrait)		
						Extrait aqueux brut	Fraction acétate d'éthyle	fraction butanolique
1	5.1	279	577	575 ( ), 451 (25), 425(100), 407 (21), 289 (12), 287 (9)	Dimère de (épi) catéchine B <sup>A</sup>	8.7 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup>	18.7 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	22.1 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>
2	6.7	280	289	245 (100), 231 (8), 205 (33), 179 (11), 165 (5)	(+)-Catéchine <sup>A</sup>	5.69 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	40.59 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	8.6 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>
3	8.9	280	289	245 (100), 231 (8), 205 (33), 179 (12), 165 (3)	(-)-Épicatéchine <sup>A</sup>	nd	2.4 $\pm$ 0.3 <sup>*</sup>	3.9 $\pm$ 0.1 <sup>*</sup>
4	12.6	355	611	479 (100), 317 (50)	Myricétine- <i>O</i> -pentoxyl- <i>O</i> -hexoside <sup>B</sup>	1.4 $\pm$ 0.03 <sup>*</sup>	nd	2.42 $\pm$ 0.01 <sup>*</sup>
5	14.8	350	625	317 (47)	Myricétine-3- <i>O</i> -rutinoside <sup>B</sup>	1.013 $\pm$ 0.002 <sup>b</sup>	6.5 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	1.11 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>
6	14.7	352	479	301 (100)	Myricétine-3- <i>O</i> -glucoside <sup>B</sup>	0.960 $\pm$ 0.001 <sup>*</sup>	nd	1.06 $\pm$ 0.02 <sup>*</sup>
7	17.0	356	463	317 (100)	Myricétine-3- <i>O</i> -rhamnoside <sup>B</sup>	1.4 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	15.9 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	2.42 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
8	21.7	352	447	301 (100)	Quercétine-3- <i>O</i> -rhamnoside <sup>C</sup>	1.013 $\pm$ 0.002 <sup>b</sup>	6.5 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	1.106 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>
9	26.2	340	431	285 (100)	Kaempférol-3- <i>O</i> -rhamnoside <sup>D</sup>	0.961 $\pm$ 0.001 <sup>c</sup>	2.43 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.06 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
<b>Flavonoïdes totaux</b>						21.2 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	93.1 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	43.87 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>

Dans chaque rangée, les différentes lettres signifient des différences significatives entre l'extrait brut de *T. articulata* et les fractions ( $p < 0.05$ ). Lorsque seulement deux échantillons étaient présents, le test t du Student a été utilisé pour déterminer la différence significative entre deux échantillons différents, avec  $\alpha = 0.05$ : \* signifie une différence significative entre les échantillons ( $p < 0.001$ )

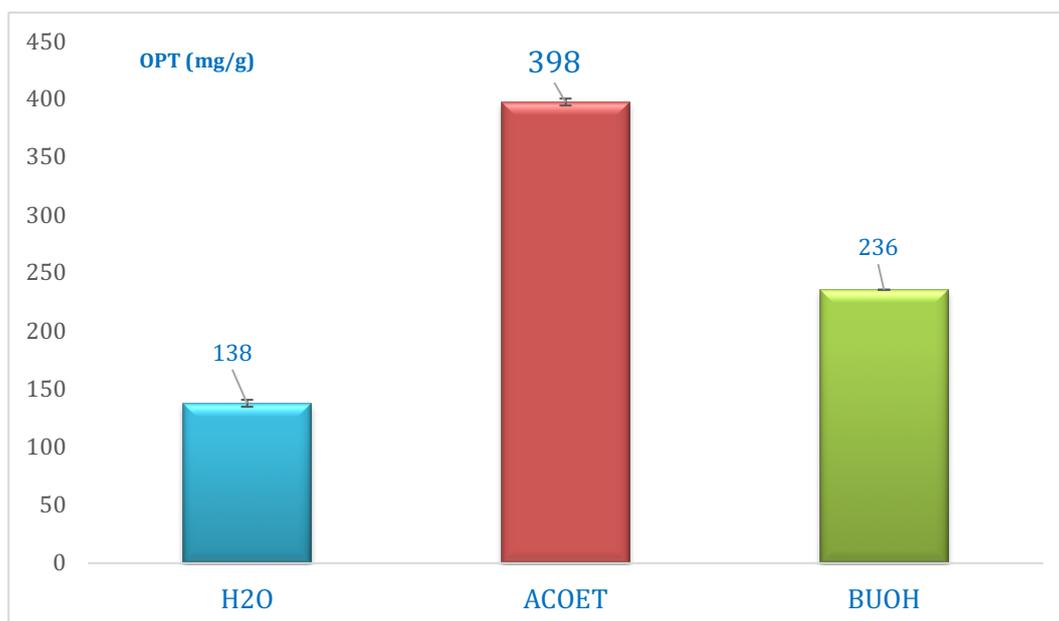
## II.2. Quantification des composés phénoliques

La quantification des composés identifiés par LC/MS est effectuée à l'aide d'une gamme d'étalon (20  $\mu$ L, 2,5-100  $\mu$ g/mL) réalisée avec des molécules de références pures sont indiquées dans la partie matériel et méthodes. Les résultats sont exprimés par mg per g de l'extrait brute lyophilisé ou la fraction fille. Les analyses LC-MS sont effectuées dans les conditions détaillées dans le tableau 7. La détection est réalisée avec un détecteur UV à barrette de photodiodes (PDA) en utilisant deux longueurs d'ondes préférées dans la détection des composés phénoliques; 280 et 370 nm.

### I.2.2.1. *M. nivellii*

Le contenu phénolique le plus élevé a été trouvé dans la fraction acétate d'éthyle (398 mg/g d'extrait, tableau 12; figure 30), les dérivés de myricétines glycosides étant les composés les plus abondants (136 mg/g), en particulier myricétine-3-*O*-rhamnoside et myricétine-hexosyl-gallate. Ces dérivés représentaient 34% des composés phénoliques totaux dans cette fraction et sont trois fois plus abondants que dans la fraction butanolique (46 mg/g) et quatre fois plus que ceux de l'extrait brut (26 mg/g). Le dimère gallocatéchine-gallate est également présent principalement dans la fraction d'acétate d'éthyle (35.6 mg/g), soit trois fois plus abondant que dans l'extrait aqueux brut (10.9 mg/g) et dans sa fraction butanolique (13.2 mg/g).

Les tanins hydrolysables sont également des constituants présents dans tous les échantillons, bien qu'ils présentent une concentration plus élevée dans la fraction d'acétate d'éthyle (172 mg/g, tableau 12). Néanmoins, cette fraction n'a pas révélé la présence de galloyl-HHDP-glucosides qui sont les composés les plus abondants dans l'extrait aqueux brut (pics 1 et 2; tableau 12), tandis que l'acide trigalloylquinique (pic 8) est le composé le plus abondant dans la fraction butanolique et le tanin hydrolysable le plus abondant dans la fraction d'acétate d'éthyle.

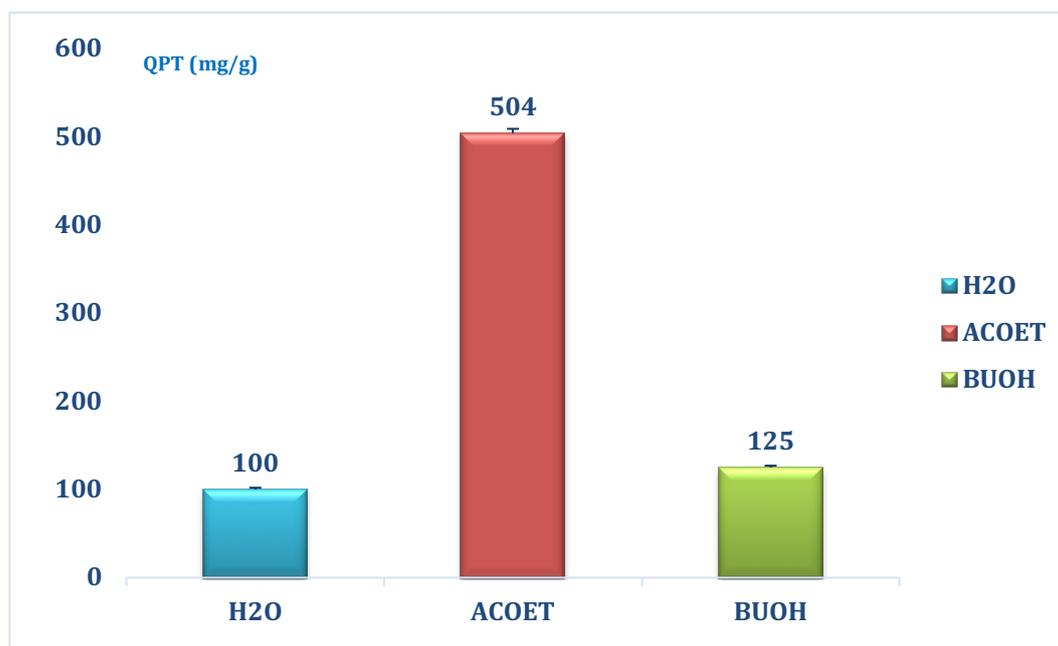


**Figure 30.** Teneurs en polyphénols totaux de l'extrait brut de *M. nivellii* et de ses fractions

### II.2.2. *O. quadripartita*

Les teneurs en polyphénols sont quantifiées par la méthode HPLC/MS, les résultats sont présentés dans le tableau 13 (**Figure 31**)

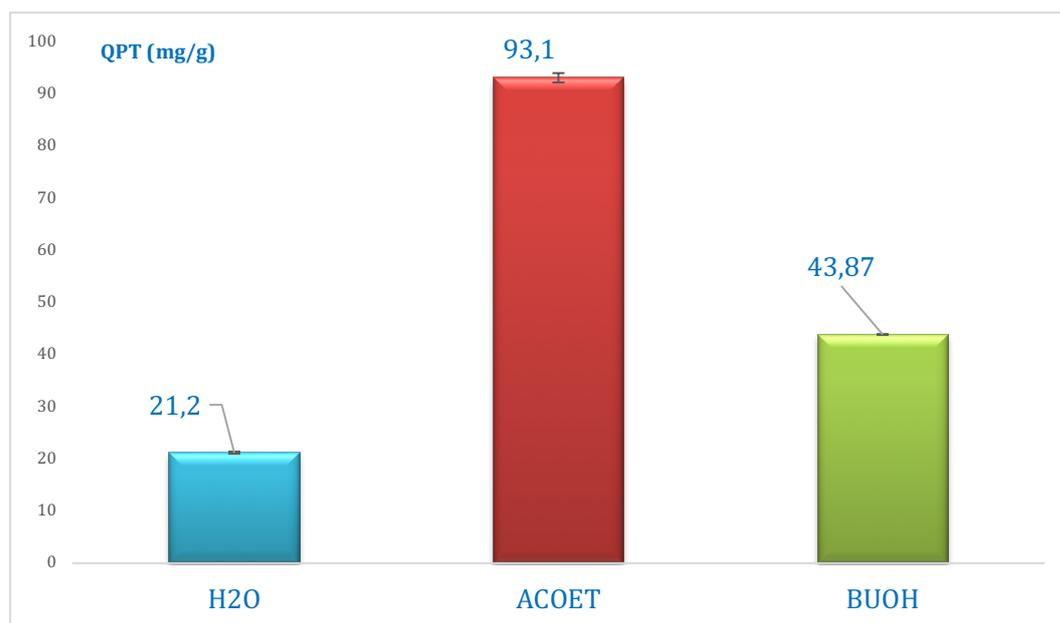
La fraction acétate d'éthyle présente la concentration la plus élevée en composés phénoliques, étant la catéchine le composé le plus abondant. L'extrait aqueux et la fraction butanolique présentent des teneurs similaires en composés phénoliques, la quercétine-3-*O*-rutoside étant la principale molécule présente.



**Figure 31.** Teneurs en polyphénols totaux de l'extrait brut d'*O. quadripartita* et de ses fractions

### II.2.3. *T. articulata*

Selon nos résultats récapitulés dans le tableau 14 et la figure 32, on note que la fraction de l'acétate d'éthyle présente la concentration en composés phénoliques la plus élevée ( $93.1 \pm 0.9$  mg / g d'extrait) par rapport à celles de la fraction butanolique et de l'extrait aqueux brut ( $43.87 \pm 0.02$  et  $21.2 \pm 0.2$  mg/g, respectivement). Les flavan-3-ols prédominent dans tous les échantillons avec une moyenne de 71% de la composition phénolique totale, le dimère d'(épi) catéchine du type B étant le composé principal dans la fraction butanolique et l'extrait brut ( $26.0 \pm 0.2$  et  $8.7 \pm 0.6$  mg/g, respectivement), tandis que la catéchine est le composé le plus abondant dans la fraction d'acétate d'éthyle ( $40.59 \pm 0.01$  mg/g). En ce qui concerne les flavonols, cette classe de composés phénoliques est présente en moyenne de 29% de la composition phénolique totale, et c'est la fraction d'acétate d'éthyle qui présente le contenu le plus important ( $31.4 \pm 0.1$  mg/g d'extrait), comparativement à la fraction butanolique et la solution aqueuse de l'extrait brut ( $9.18 \pm 0.04$  et  $6.7 \pm 0.1$  mg/g, respectivement) et où la myricétine-3-*O*-rhamnoside est le composé principal. Le contenu total en flavonoïdes, déterminé par l'analyse chromatographique est comparable à ceux obtenus à partir d'un dosage colorimétrique de Folin-Ciocalteu rapporté par El Jemli *et al.* (2016) dans l'extrait aqueux obtenu par extraction par perfusion de *T. articulata* du Maroc et par Herzi *et al.* (2013b), dans les extraits éthanolique et hexanique de *T. articulata* de Tunisie.



**Figure 32.** Teneurs en polyphénols totaux de l'extrait brut de *T. articulata* et de ses fractions

### III. Activité antioxydante

Pour évaluer l'activité antioxydante des échantillons, quatre tests couramment utilisés pour déterminer cette activité des plantes, des boissons et des fluides biologiques, ont été retenus. Ces essais peuvent être classés globalement comme des essais à base de transfert d'électrons (ET) (pouvoir réducteur du fer (FRAP) et le dosage du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) et des essais à base de transfert d'hydrogène (HAT) (L'inhibition de la peroxydation lipidique à travers le test TBARS et l'essai d'inhibition du blanchissement de  $\beta$ -carotène) (Huang *et al.*, 2005).

Les activités antioxydantes de l'extrait aqueux brut et de ses fractions d'acétate d'éthyle et de butanol sont comparées avec celle du Trolox pris comme témoin positif. Pour le test DPPH, la valeur IC50 représente la concentration requise pour un antioxydant pour atteindre 50% du piégeage du radical DPPH (Chen *et al.*, 2013). Les valeurs inférieures d'IC50 reflètent à une activité plus élevée de piégeage des radicaux libres d'un antioxydant (Osman, 2011).

#### III.1. *M. nivelii*

Les résultats de l'extrait aqueux et des fractions organiques de *M. nivelii* sont présentés dans le Tableau 15. Ce genre montre une capacité antioxydante intéressante, qui peut être liée à ses propriétés antiprolifératives, en particulier associées à la présence des flavonoïdes et de tanins hydrolysables (Romani *et al.*, 2004 et 2012).

-La très faible valeur d'IC50 présentée par la fraction acétate d'éthyle (3.27 µg/mL) indique l'activité de piégeage la plus élevée, par rapport à celles de la fraction butanolique et l'extrait aqueux brut (valeurs d'IC50 de 4.6 et 7.1 µg/mL, respectivement).

-Les résultats obtenus par le test du pouvoir réducteur révèlent que les extraits présentent un excellent potentiel antioxydant allant de 3.14 à 6.22 µg/mL. Encore une fois, c'est l'acétate d'éthyle qui révèle la plus grande capacité de réduire le Fe (III) suivi par la fraction butanolique et l'extrait aqueux brut.

-La méthode d'inhibition du blanchissement de β-carotène est basée sur la décoloration du β-carotène en raison de sa réaction avec les radicaux formés par l'oxydation de l'acide linoléique dans une émulsion. Cette inhibition peut être retardée en présence d'antioxydants qui ont la capacité de neutraliser les radicaux libres et d'inhiber la peroxydation lipidique (**Kato et al., 2009**). Tous les extraits ont démontré de fortes propriétés antioxydantes, en particulier la fraction acétate d'éthyle (3.30 µg/mL), suivie par la fraction butanolique (3.72 µg/mL) et l'extrait aqueux brut (4.49 µg/mL).

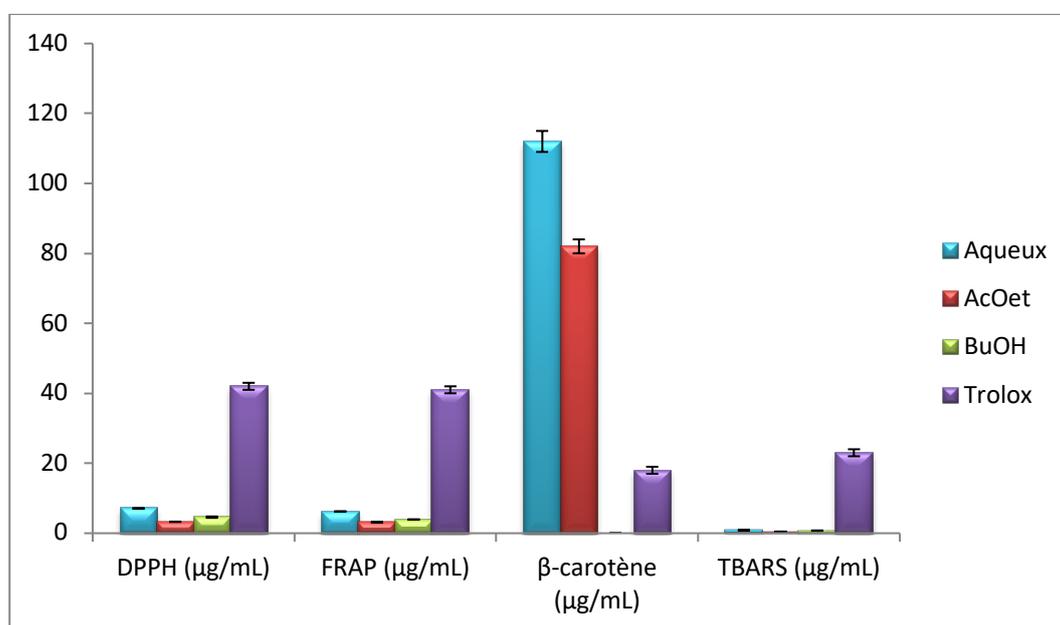
-Tous les échantillons présentent une grande capacité contre la peroxydation lipidique et à inhiber la formation du complexe MDA-TBA (malondialdéhyde- acide thiobarbiturique). La fraction d'acétate d'éthyle a montré à nouveau le potentiel le plus efficace par rapport à ceux de la fraction butanolique et de l'extrait aqueux brut (valeurs d'IC50 de 0.46; 0.74 et 0.87 µg/mL, respectivement).

Dans l'ensemble, la fraction d'acétate d'éthyle présente l'activité antioxydante la plus élevée, suivie de la fraction butanolique et l'extrait aqueux brut pour tous les tests utilisés (**Figure 33**). De plus, l'activité antioxydante de l'ensemble des échantillons est plus élevée que celle du Trolox (utilisé comme antioxydant de référence) (**Tableau 15**).

Par ailleurs, l'activité antioxydante présentée par les deux fractions et par l'extrait aqueux brut pourrait être corrélée avec la composition phénolique, en particulier avec les flavonols et les tanins hydrolysables. Ces groupes phénoliques ont été précédemment signalés pour montrer une activité antioxydante élevée (**Salah et al., 1995; Piwowarski et al., 2014; Bobinaité et al., 2016**).

Les hautes teneurs de myricétine-hexosyl-gallate, myricétine-3-*O*-rhamnoside, le dimère gallocatéchine-gallate, digalloyle et trigalloyl-HHDP-glucoside, tétragalloylglucoside et des dérivés de la quercétine et du kaempférol, présentes dans la fraction d'acétate d'éthyle (**Tableau 12**), pourraient le facteur principal contribuant à sa capacité antioxydante

supérieure. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par plusieurs auteurs (**Duan *et al.*, 2006; Khiralla *et al.*, 2015; Rached *et al.*, 2016**). Hayder *et al.* (2008b), et Pereira *et al.* (2016) ont montré que la myricétine-3-*O*-galactoside et la myricétine-3-*O*-rhamnoside isolés de *M. communis* présentent une forte activité antioxydante. Ces travaux réalisés pourraient également confirmer l'activité antioxydante la plus élevée de l'acétate d'éthyle par rapport aux autres fractions.



**Figure 33.** Potentiel antioxydant des extraits de *M. nivelii*

### III.2. *O. quadripartita*

-Les résultats du test DPPH révèlent que tous les extraits présentent une plus grande activité que de Trolox (IC<sub>50</sub>= 42 µg/mL). La plus grande activité étant noté avec la fraction d'acétate d'éthyle (IC<sub>50</sub>= 5 µg/mL) suivie de la fraction butanolique (IC<sub>50</sub>= 10 µg/mL) et de l'extrait aqueux brut (IC<sub>50</sub>= 12 µg/mL) (**Tableau 15**). Cette activité pourrait être attribuée aux métabolites secondaires des plantes comme les flavonoïdes et d'autres composés phénoliques (**Sala *et al.*, 2003; Kulkarni *et al.*, 2004; Krishnaiah *et al.*, 2011**).

- L'évaluation de pouvoir réducteur (FRAP) est basée sur la présence de réducteurs dans les extraits qui provoquent la réduction du complexe Fe<sup>3+</sup>/ ferricyanure permettant ainsi d'évaluer la quantité des polyphénols participant à la réaction redox (**Chung *et al.*, 2002, Amarowicz *et al.*, 2004**). La méthode de FRAP montre que la fraction acétate d'éthyle présente également le pouvoir réducteur le plus élevé (IC<sub>50</sub>= 2 µg/mL), suivie par la fraction butanolique (IC<sub>50</sub>= 4 µg/mL) et de l'extrait aqueux brut (IC<sub>50</sub>= 6 µg/mL). Cette activité est nettement meilleure que celle du Trolox (41 µg/mL) et ce ci pour tous les échantillons testés (**Tableau 15**).

- Le test de blanchissement de  $\beta$ -carotène/acide linoléique est basé sur la capacité de l'antioxydant à réduire l'oxydation de l'acide linoléique et à inhiber les radicaux libres générés par le système d'émulsion comme les hydroperoxydes, les diéniques conjugués provenant de l'oxydation de l'acide linoléique (Koleva *et al.*, 2002; Tepe *et al.*, 2005). Dans ce test, la fraction d'acétate d'éthyle a également montré la plus forte capacité d'inhibition, suivie de la fraction butanolique et de l'extrait brut (valeurs d'IC50: 3.4; 3.8 et 4.6  $\mu\text{g/mL}$ , respectivement, Tableau 15), présentant encore une inhibition du blanchissement de  $\beta$ -carotène supérieure à celle de Trolox (18  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figure 34).

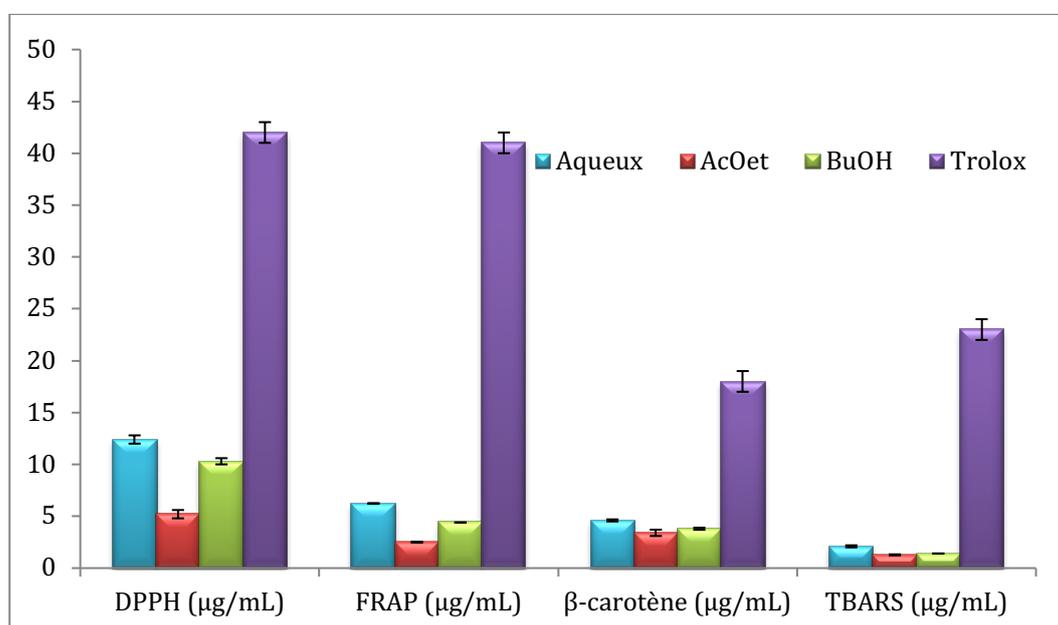
-L'inhibition de la formation de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBA) (le dosage de TBARS), en utilisant le cerveau de porc comme un tissu d'animal réel, est généralement utilisée comme indicateur du processus d'oxydation lipidique. Dans ce dosage, le malondialdéhyde (MDA) réagit avec TBA pour former un complexe MDA-TBA d'une couleur rose qui est mesuré par spectrophotométrie à 530-535 nm (Shahidi et Zhong, 2005).

L'oxydation des peroxydes lipidiques conduit à la formation de radicaux alcoxyles et peroxydes comme produits d'oxydation primaires, formés à la suite de la dégradation des acides gras polyinsaturés (Shahidi et Zhong, 2005). Le MDA pourrait produire des dommages à l'ADN et s'est révélée être une cause majeure de plusieurs maladies de vieillissantes comme le cancer (Shinmoto *et al.*, 1992, Liao *et al.*, 2014). Les activités les plus fortes ont été notées pour la fraction d'acétate d'éthyle (1.3  $\mu\text{g/mL}$ ), suivie par la fraction butanolique (1.4  $\mu\text{g/mL}$ ) et de l'extrait aqueux (2  $\mu\text{g/mL}$ ) et sont toutes supérieures à l'activité montrée par le Trolox (23  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figure 34).

La solubilité et la capacité d'extraction des polyphénols dépendent fortement du solvant, de sorte que la différence observée dans l'activité antioxydante des échantillons testés pourrait être liée à l'utilisation de différents solvants d'extraction qui ont certainement extrait des composés de polarité différente. Çelik *et al.* (2010) ont signalé l'influence du solvant et sa polarité sur le comportement antioxydant des composés phénoliques. Dans le même contexte, Singh *et al.* (2007) ont trouvé une activité antioxydante différente chez *Acacia auriculiform*. Il s'agit d'extraits préparés avec des solvants de polarité croissante ou décroissante, liés aux différences de contenu et de composition phénolique.

Dans notre cas, l'activité antioxydante de l'extrait aqueux brut et de ses fractions pourrait être liée à leur composition phénolique, ce qui influence leur capacité à éliminer les radicaux libres et à prévenir la peroxydation lipidique (Yanishlieva-Maslarova, 2001; Gardi *et al.*,

2015). L'activité antioxydante la plus élevée affichée par la fraction d'acétate d'éthyle pourrait être liée à sa teneur la plus élevée en composés phénoliques ( $504 \pm 5$  mg/g d'extrait, tableau 1), en particulier (+)-catéchine, suivie du dimère procyanidine B1 (EC-4, 8-C). La fraction butanolique a montré un contenu phénolique similaire à l'extrait brut aqueux ( $125 \pm 2$  et  $100 \pm 2$  mg/g respectivement), et les deux présentent des teneurs inférieures de flavan-3-ols que la fraction d'acétate d'éthyle, avec la quercétine-3-*O*-rutinoside comme flavonoïde majeur.



**Figure 34.** Potentiel antioxydant des extraits d'*O. quadripartita*

### III.3. *T. articulata*

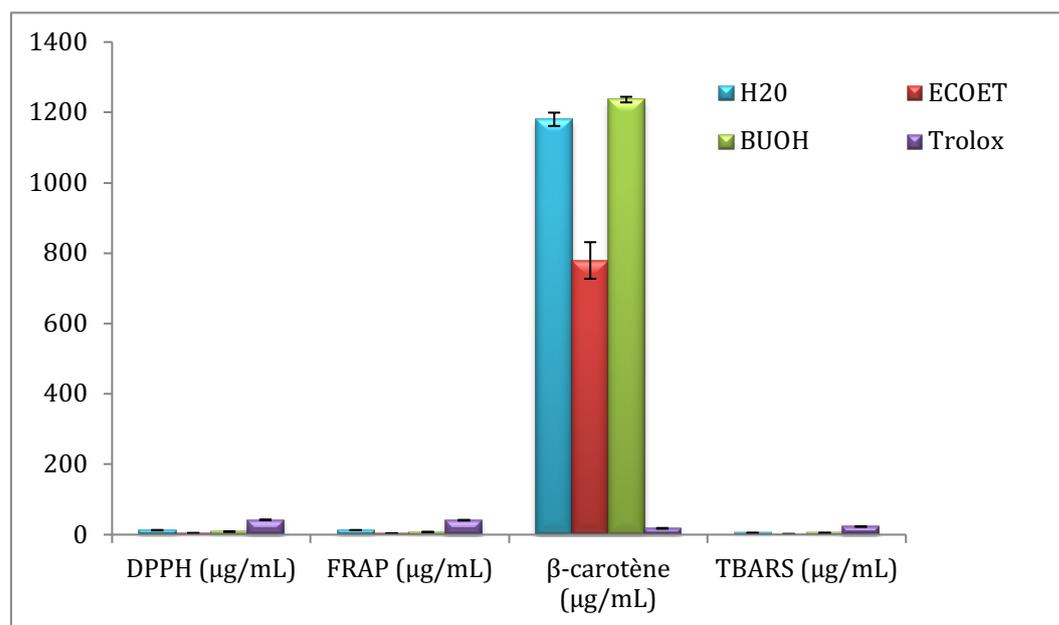
Le tableau 15 présente les résultats exprimés en valeurs des IC<sub>50</sub> de chacun des échantillons testés.

-On observe que la valeur d'IC<sub>50</sub> de la fraction acétate d'éthyle étudié par le test de DPPH est très faible ( $4.51 \pm 0.15$  µg/mL), ce qui indique une activité antioxydante élevée par rapport aux autres échantillons étudiés (valeurs d'IC<sub>50</sub>:  $8.65 \pm 0.16$  et  $12.68 \pm 0.67$  µg/mL pour la fraction butanolique et l'extrait aqueux, respectivement).

-La capacité de réduction ferrique de nos échantillons ainsi que le test au DPPH sont toujours supérieures pour la fraction acétate d'éthyle (IC<sub>50</sub> =  $3.84 \pm 0.01$  µg/mL), tandis que l'extrait aqueux révèle l'activité la plus basse (IC<sub>50</sub> =  $12.9 \pm 0.1$  µg/mL). La même constatation est faite pour le test inhibiteur de blanchiment de β-carotène (IC<sub>50</sub>= $31.16 \pm 2$  µg/mL) et l'essai de TBARS (IC<sub>50</sub>= $1.76 \pm 0.08$  µg/mL) (**Figure 35**).

Tous les extraits dans tous les essais montrent un potentiel antioxydant significatif par rapport à trolox, à l'exception du test d'inhibiteur de blanchiment du  $\beta$ -carotène (**Tableau 15**).

Les produits phytochimiques identifiés ont été précédemment rapportés comme ayant un excellent effet antioxydant (**Cimanga et al., 2001; Braca et al., 2002; Montoro et al., 2005, Srinivasan et al., 2015**). Tel est le cas du la myricétin-3-*O*-rhamnoside, l'un des flavonols principaux présents dans ces échantillons, par exemple, ce composé isolé à partir des feuilles de *Myrtus communis* présente une grande capacité à inhiber l'activité de la xanthine oxydase, la peroxydation lipidique et à éliminer le DPPH (**Hayder et al., 2008b**). Des résultats similaires ont également été trouvés par El Jemli *et al.* (2016), qui ont évalué l'activité antioxydante de l'extrait aqueux obtenu à partir des infusions de feuilles de *T.articulata* collectées du Maroc avec les essais suivants: DPPH, ABTS et l'essai du pouvoir réducteur. Djouahri et Boudarene (2012) ont mis en évidence une activité antioxydante élevée (déterminée par l'essai du pouvoir réducteur et le test DPPH) dans les extraits d'acétate d'éthyle, de chloroforme et des extraits bruts de méthanol de feuilles de *T. articulata* récoltée dans le centre ouest de l'Algérie, et ont corrélé l'activité observée avec des composés phénoliques qui jouent un rôle important en tant que donneurs d'hydrogène et des piègeurs antioxydants.



**Figure 35.** Potentiel antioxydant des extraits de *T. articulata*

**Tableau 15.** Activité antioxydants par quatre tests différents des différents extraits des trois plantes étudiées.

Activité antioxydante (valeurs d'IC <sub>50</sub> en µg/mL)	<i>M. nivelii</i>			<i>O. quadripartita</i>			<i>T. articulata</i>			Contrôle positive
	Extrait aqueux	F. acétate d'éthyle	F. <i>n</i> -butanol	Extrait aqueux	F. acétate d'éthyle	F. <i>n</i> -butanol	Extrait aqueux	F. acétate d'éthyle	F. <i>n</i> -butanol	Trolox*
<b>Test de DPPH</b>	7.1±0.1 <sup>a</sup>	3.27±0.05 <sup>c</sup>	4.6±0.2 <sup>b</sup>	12.4±0.4 <sup>a</sup>	5.2±0.4 <sup>c</sup>	10.3±0.3 <sup>b</sup>	12.7±0.7 <sup>a</sup>	4.5±0.2 <sup>c</sup>	8.7±0.2 <sup>b</sup>	42±1
<b>Test de pouvoir réducteur</b>	6.23±0.04 <sup>a</sup>	3.15±0.01 <sup>c</sup>	3.93±0.03 <sup>b</sup>	6.24±0.03 <sup>a</sup>	2.5±0.1 <sup>c</sup>	4.4±0.1 <sup>b</sup>	12.9±0.1 <sup>a</sup>	3.84±0.01 <sup>c</sup>	7.6±0.3 <sup>b</sup>	41±1
<b>Test de β-carotène</b>	4.48±0.12 <sup>a</sup>	3.28±0.08 <sup>c</sup>	3.68±0.00 <sup>b</sup>	4.6±0.1 <sup>a</sup>	3.4±0.3 <sup>c</sup>	3.8±0.1 <sup>b</sup>	47.2±0.7 <sup>b</sup>	31.16±2 <sup>c</sup>	49.44±0.3 <sup>a</sup>	18±1
<b>Test de TBARS</b>	0.87±0.02 <sup>a</sup>	0.46±0.02 <sup>c</sup>	0.74±0.06 <sup>b</sup>	2.1±0.1 <sup>a</sup>	1.28±0.05 <sup>c</sup>	1.41±0.01 <sup>b</sup>	4.8±0.4 <sup>a</sup>	1.76±0.08 <sup>b</sup>	4.8±0.2 <sup>a</sup>	23±1

\* Trolox est une substance de référence utilisée comme témoin positif pour l'activité antioxydante qui a été exprimée sous la forme de valeurs IC<sub>50</sub> (moyenne ± SD), ce qui signifie que plus cette valeur est faible, plus le pouvoir antioxydant est fort. IC<sub>50</sub>: la concentration d'extrait correspondant à 50% de l'activité antioxydante ou à 0.5 de l'absorbance dans le test du pouvoir réducteur. Les différentes lettres signifient des différences significatives entre les fractions de même espèce (p < 0.05).

#### IV. Activité anti-inflammatoire

Afin de mettre en évidence l'activité anti-inflammatoire présumée de ces plantes dans la médecine traditionnelle, les extraits aqueux et leurs fractions ont été testés pour leurs activités anti-inflammatoires à l'aide d'une lignée cellulaire de macrophages murins RAW 264.7 issue de souris et couramment utilisée dans ce type d'étude (Wang *et al.*, 2017).

Le monoxyde d'azote (NO) est un important médiateur oxydatif et inflammatoire produit par les macrophages et utilisé comme indicateur de l'inflammation induite par le LPS (lipopolysaccharide) (Tsai *et al.*, 1999; Alvarez-Suarez, 2017). La dexaméthasone est utilisée comme étant une inhibitrice de la production de NO (témoin positif) comme il est indiqué dans la figure 36.

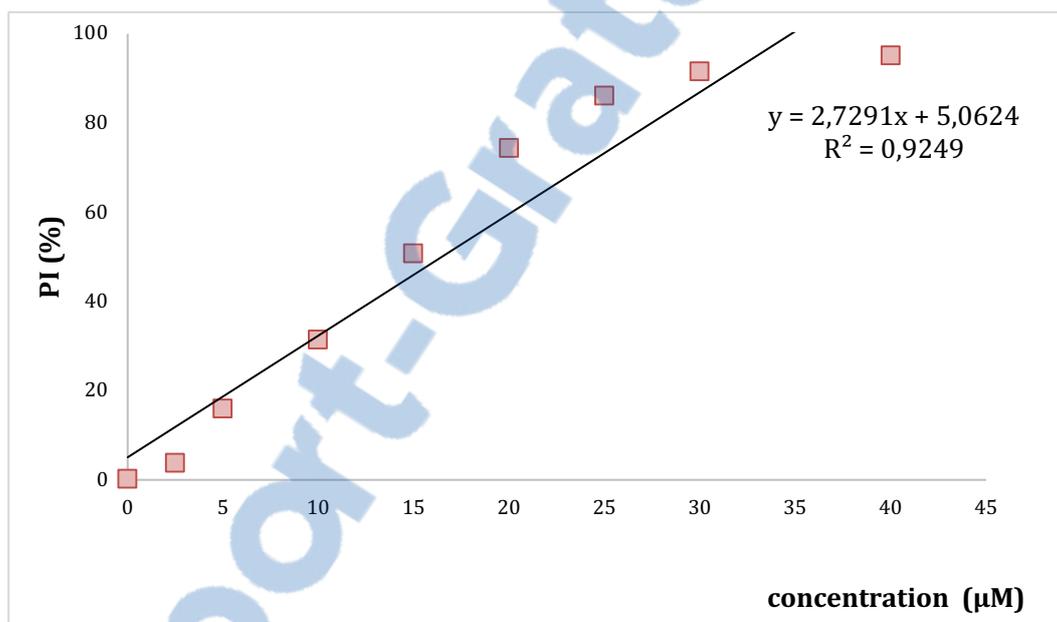


Figure 36. Courbe d'étalonnage de l'inhibition de la production de NO par la dexaméthasone

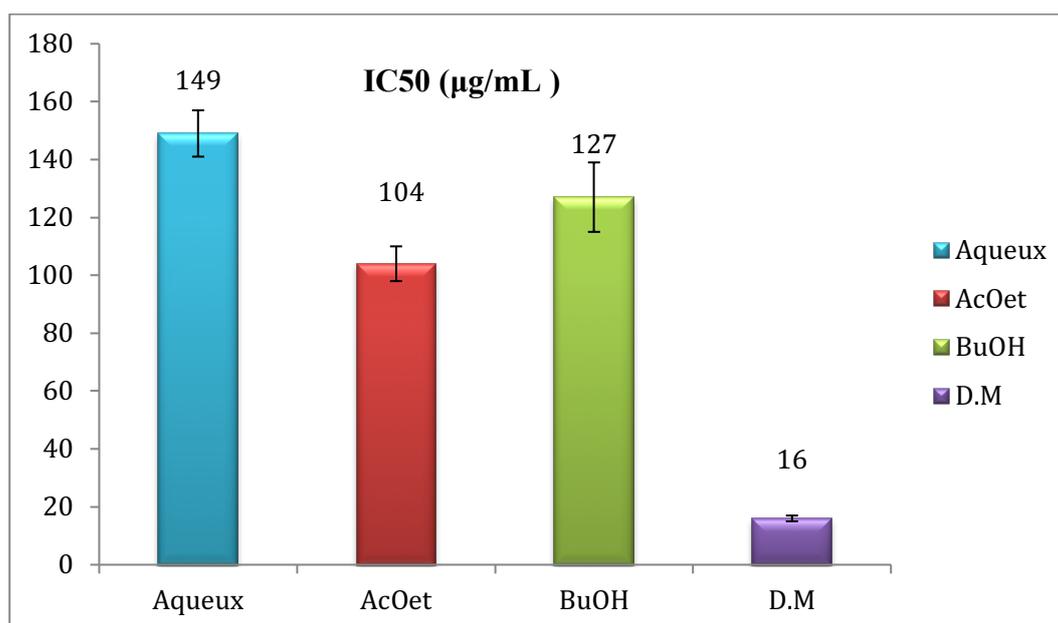
##### IV.1. *M. nivellii*

Le tableau 16 présente les résultats obtenus pour l'activité anti-inflammatoire des fractions acétate d'éthyle, butanolique et de l'extrait aqueux brut. Les résultats révèlent que tous les extraits inhibent la production de NO avec IC50=104, 127 et 149 µg/mL, pour la fraction d'acétate d'éthyle et butanolique et enfin, l'extrait aqueux brut, respectivement.

La fraction acétate d'éthyle est la plus active dans l'inhibition du NO par rapport à la fraction butanolique et l'extrait aqueux brut (Figure 37). Ces résultats concordent avec ceux de Touaibia et Chaouch (2015), qui ont démontré l'effet anti-inflammatoire, de l'extrait

méthanolique de *M. nivellii* réalisée *in vivo* par le test de l'œdème de la patte d'une souris Swiss induit par le carraghénane.

Le potentiel d'inhibition du NO par les extraits pourrait être attribué à la présence de composés bioactifs comme les flavonols, les ellagitanines et les acides phénoliques présents dans les échantillons, les principales molécules trouvées dans cette espèce, connues pour leur effet anti-inflammatoire *in vivo* et *in vitro* (Umesalma et Sudhandiran , 2010; Piwowarski *et al.*, 2014; Li, Peng *et al.*, 2017). Les différences entre les échantillons pourraient être attribuées à la distribution des biomolécules dans les fractions et l'extrait brut.



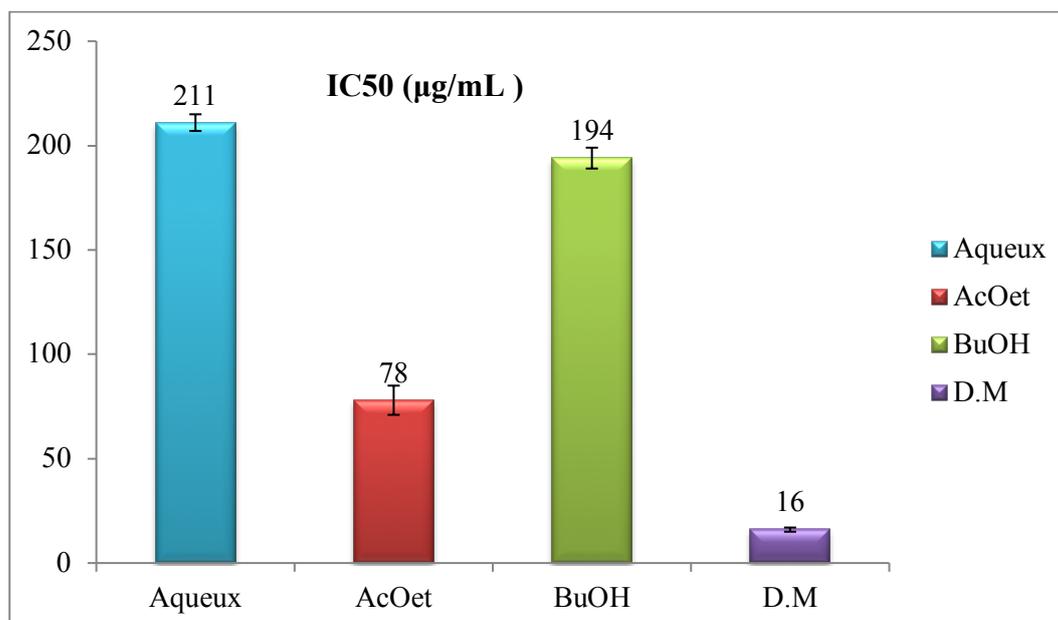
**Figure 37.** Inhibition de la production NO, induite par LPS par les extraits de *M. nivellii*

#### IV.2. *O. quadripartita*

Tous les échantillons ont montré des pourcentages d'inhibition significatifs avec des valeurs d'IC50 comprises entre 78 et 211 µg/mL (Tableau 16). La fraction acétate d'éthyle présente l'activité la plus élevée (Figure 38). Ces résultats rejoignent ceux de Gómez *et al.* (1995) qui ont étudié la propriété anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique de cette espèce, Celle-ci se fait par réduction de la perméabilité capillaire induite chez les rats par divers médiateurs chimiques. Plusieurs composants phytochimiques bioactifs, parmi lesquels des composés phénoliques, pourraient contribuer à l'activité mentionnée (Middleton et Kandaswami, 1992; Wang, Moustaid-Moussa *et al.*, 2014).

Les propriétés anti-inflammatoires du composé majeur présents dans la fraction acétate d'éthyle, la (+)-catéchine, ont été décrites par Marinovic *et al.* (2015), ce qui confirme son

rôle dans la bio-activité révélée par cette fraction. Le potentiel anti-inflammatoire présenté par la fraction butanol et l'extrait aqueux pourrait être lié à la présence de dérivés de la quercétine et des glycosides d'apigénine (Shen *et al.*, 2002; Wang et Huang 2013).

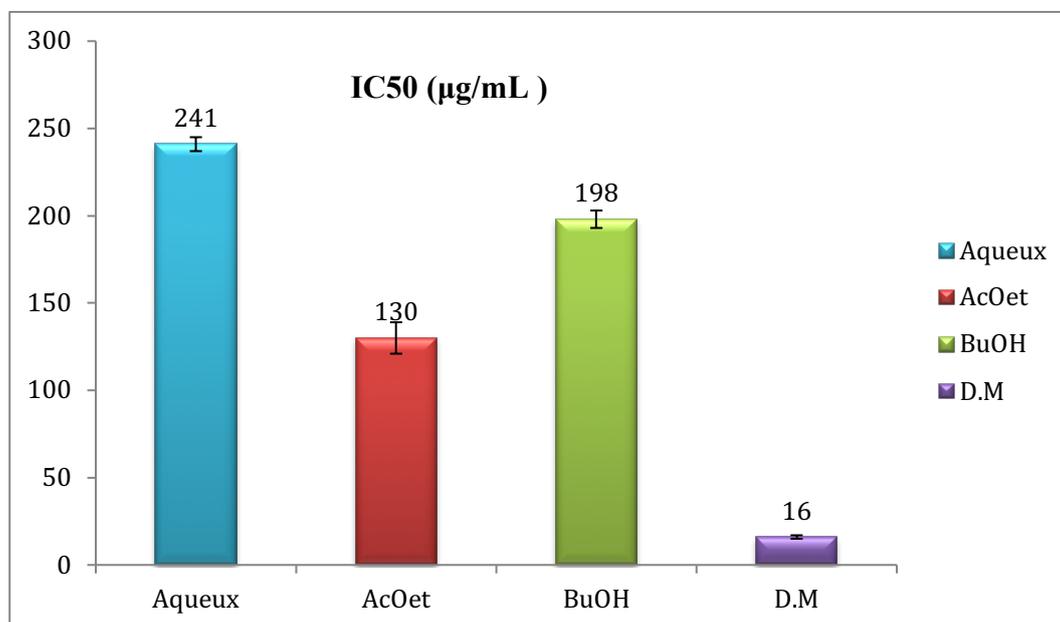


**Figure 38.** Inhibition de la production NO, induite par LPS par les extraits d'*Osyris quadripartita*

### III.3. *T. articulata*

L'extrait aqueux et ses fractions organiques de *T. articulata* ont montré une inhibition significative de la production de NO (Tableau 16). Ces résultats sont conformes aux usages traditionnels de cette espèce végétale, utilisée pour diverses affections inflammatoires. La fraction acétate d'éthyle présente un effet plus élevé ( $IC_{50} = 130 \pm 9 \mu\text{g/mL}$ ) que la fraction butanolique et l'extrait aqueux brut ( $198 \pm 5$ ;  $241 \pm 4 \mu\text{g/mL}$ ) (Figure 39). Par ailleurs, très peu d'études rapportent l'activité anti-inflammatoire de cette espèce. Ainsi, les extraits bruts de chloroforme, d'acétate d'éthyle et de méthanol de *T. articulata* montrent une forte capacité anti-inflammatoire, plus élevée que l'allopurinol (substance de référence), à travers de l'inhibition de la lipoxigénase et de la xanthine oxydase (Djouahri et Boudarene, 2012). Le potentiel anti-inflammatoire mis en évidence dans nos résultats pourrait être corrélé à la richesse de cette plante en flavonoïdes (catéchine, épicatechine, myricétine-3-*O*-rhamnoside et quercétine-3-*O*-rhamnoside, les principaux composés présents dans tous les échantillons). Hämäläinen *et al.* (2007) et Murakami, *et al.* (2015) ont démontré un léger potentiel de la catéchine et de l'épicatechine sur l'inhibition de la production de NO induite par LPS dans les lignées de cellules J774 et des cellules RAW264.7 stimulant la Pg-fimbriaeine et l'inhibition de l'expression du gène Cox2 et Tnfa respectivement.

En général, ces composés sont des molécules anti-inflammatoires qui pourraient aider à augmenter la capacité de l'organisme pour la protection contre l'inflammation, induite par le stress oxydatif. La capacité antioxydante démontrée par l'extrait aqueux brut et ses fractions peut être responsable de son potentiel anti-inflammatoire, par le piégeage des espèces réactives d'oxygène.



**Figure 39.** Inhibition de la production NO, induite par LPS par les extraits de *T. articulata*

**Tableau 16.** Activité inhibitrice de la formation de NO (moyenne  $\pm$  SD).

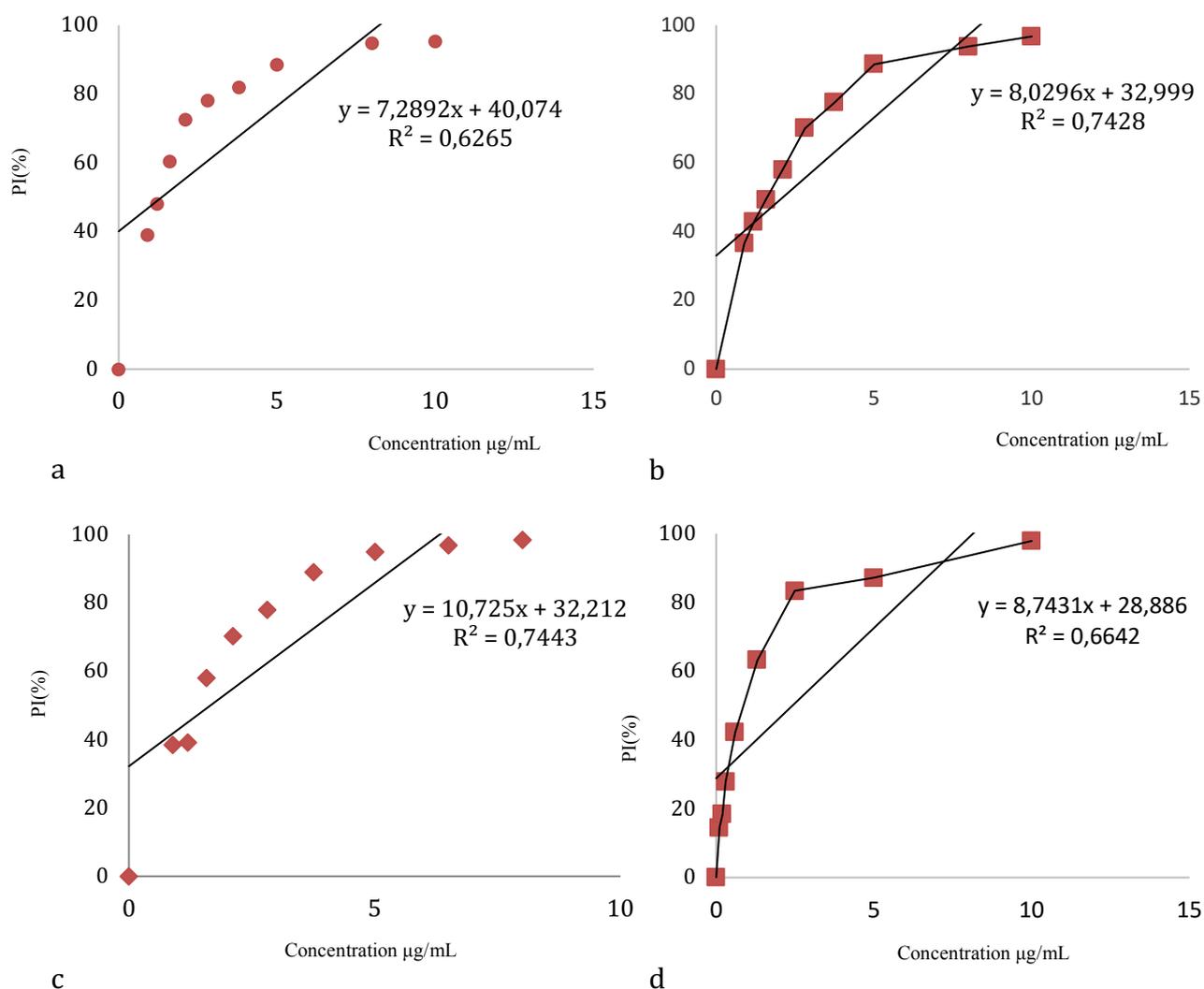
	Extrait aqueux brut	Fraction acétate d'éthyle	Fraction butanolique	Dexaméthasone
<b>Espèce</b>	<b>Valeurs d'IC<sub>50</sub>, (µg/mL)</b>			
<i>M. nivellii</i>	149 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	104 $\pm$ 6 <sup>c</sup>	127 $\pm$ 12 <sup>b</sup>	16 $\pm$ 1
<i>O. quadripartita</i>	211 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	78 $\pm$ 7 <sup>c</sup>	194 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	
<i>T. articulata</i>	241 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	130 $\pm$ 9 <sup>c</sup>	198 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	

Les valeurs sont exprimées en valeurs moyennes  $\pm$  standard déviation (n=3; expériences en triplet); les valeurs avec la même lettre dans chaque ligne peuvent être considérées comme identiques (p <0.05)

### V. Activité cytotoxique

La cytotoxicité est généralement déterminée par GI50, c'est la dose qui, *in vitro*, donne une inhibition de 50% de la croissance par rapport à la croissance du témoin. Les résultats obtenus sont traités par le logiciel Gen5 et sont exprimés suivant une courbe traduisant le pourcentage de cellules vivantes en fonction de la concentration de l'extrait étudié. Cette courbe permet de calculer la GI50 qui correspond à la concentration de l'extrait pour laquelle on observe une réduction de 50 % de la viabilité cellulaire par rapport à un témoin n'ayant subi aucun traitement. Les valeurs des GI50 après l'évaluation de l'activité antiproliférative des différents extraits de trois plantes, sont comparées avec l'ellipticine (substance de référence, figures 40) et présentées dans le tableau 17. Les propriétés cytotoxiques de l'extrait aqueux, les fractions acétate d'éthyle et butanoliques de chaque plante sont testées contre les lignées de cellules tumorales humaines: le MCF-7 (adénocarcinome du sein), le NCI-H460 (cancer du poumon non à petites cellules), HeLa (carcinome cervical) et HepG2 (carcinome hépatocellulaire), et les cellules non tumorales (PLP2: cellules primaires du foie de porcine).

A notre connaissance, jusqu' à ce jour, aucune étude n'avait encore été réalisée sur l'activité anti-tumorale de ces plantes médicinales.



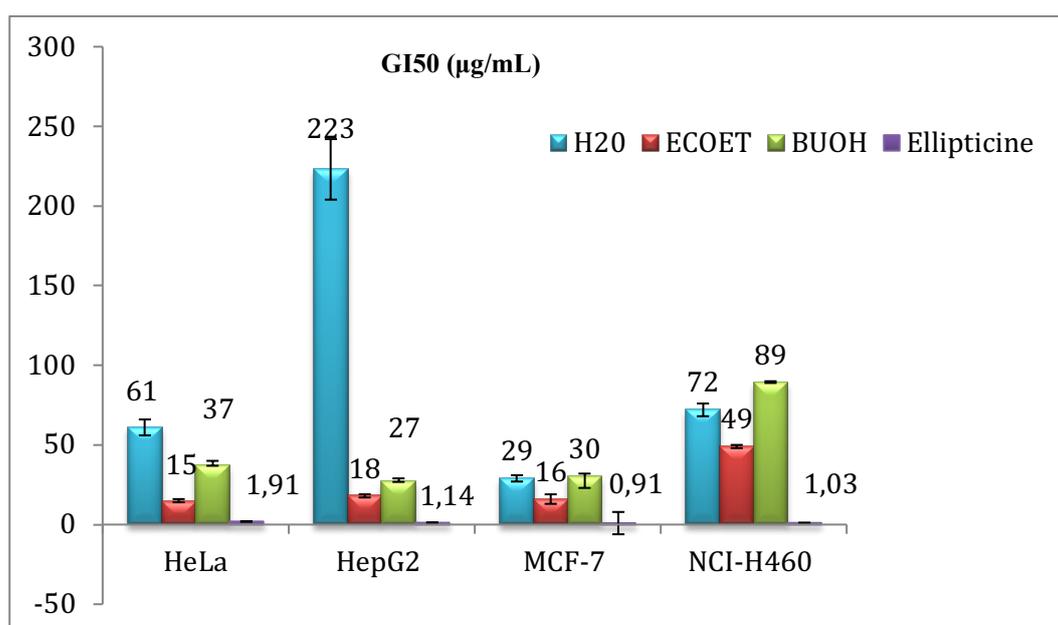
**Figure 40.** Courbes d'étalonnage de l'inhibition des lignées cellulaires par l'ellipticine (a: contre HeLa; b: HepG2; c: contre MCF-7; d: contre NCI-H60)

### V.1. *M. nivellii*

Les résultats de la cytotoxicité de l'extrait brut et de ses fractions sont résumés dans le tableau 17. Les échantillons testés présentent des propriétés cytotoxiques prometteuses vis-à-vis des lignées de cellules tumorales sélectionnées (MCF-7, NCI-H460, HeLa et HepG2). C'est la fraction acétate d'éthyle qui montre le potentiel le plus important vis-à-vis de toutes les lignées cellulaires étudiées: MCF-7 (16.12 µg/mL); NCI-H460 (49.01 µg/mL); HeLa (15.39 µg/mL) et HepG2 (17.67 µg/mL), suivie par la fraction butanolique et l'extrait aqueux brut. Cependant, tous les échantillons présentent également des effets de toxicité pour les cellules non tumorales, bien que l'acétate d'éthyle présente la toxicité la plus faible (**Figure 41**).

On a précédemment signalé que certains composés phénoliques peuvent contribuer à la protection des maladies cancéreuses, telles que l'acide ellagique, les ellagitannins et la

quercétine et ses dérivés (Kuroda *et al.*, 1996; Khanduja *et al.*, 1999; Liberal *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2016; Klimaszewska-Wisniewska *et al.*, 2017). Ces composés présentent une activité antimutagène et anticarcinogène *in vitro* et *in situ* vis-à-vis de diverses lignées de cellules tumorales humaines, telles que l'inhibition de la croissance de la tumorigénèse pulmonaire chez la souris (Khanduja *et al.*, 1999; Klimaszewska-Wisniewska *et al.*, 2017), des effets anticancérogènes contre la lignée de cellules tumorales du côlon HCT-116 (Khan *et al.*, 2016) et des effets antiprolifératifs du carcinome cervical (lignées cellulaires Caski, HeLa et Siha) (Luo *et al.*, 2016). Kuroda *et al.* (1996) ont également prouvé les effets antimutagéniques des catéchines. Liberal *et al.* (2015) ont confirmé le potentiel cytotoxique des ellagitanins sur les cellules de carcinome hépatocellulaire humain.



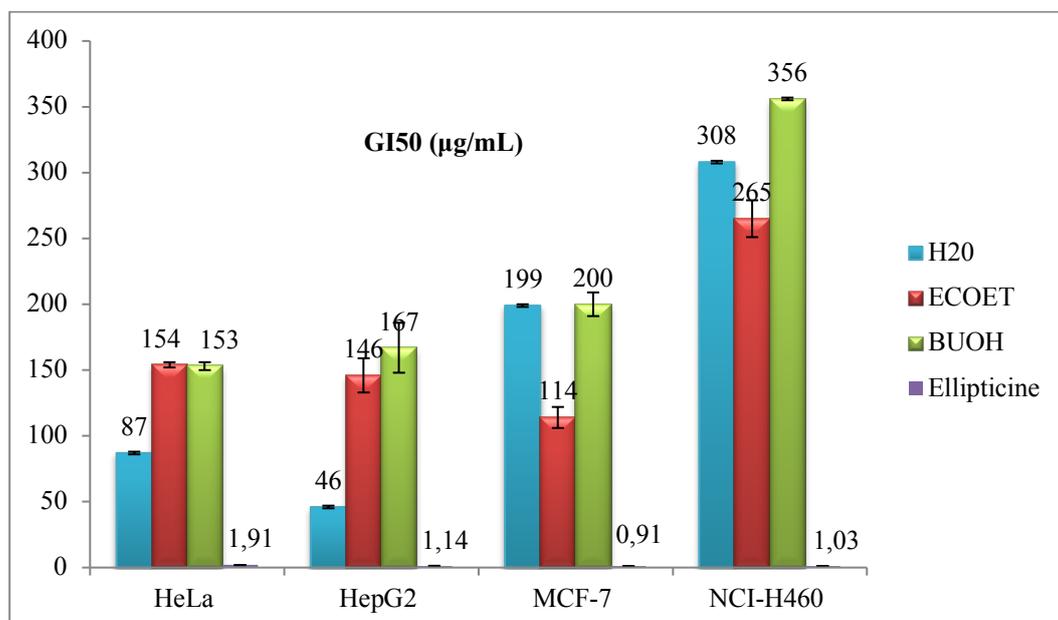
**Figure 41.** Propriétés cytotoxiques des feuilles de *M. nivellii* vis-à-vis des lignées cellulaires humaines

### V.2. *O. quadripartita*

HepG2, HeLa et MCF-7 se révèlent plus susceptibles aux extraits testés que la NCI-H460. Jusqu'aux concentrations maximales testées ( $GI_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$ ), aucun des échantillons n'a montré de toxicité sur les cellules normales (PLP2). Les effets inhibiteurs les plus élevés ont été observés avec l'extrait aqueux contre les lignées cellulaires HepG2 et HeLa ( $GI_{50} = 46 \pm 1$  et  $87 \pm 9 \mu\text{g/mL}$ , respectivement).

La fraction acétate d'éthyle présente les propriétés cytotoxiques les plus élevées pour les lignées cellulaires CMF-7 et NCI-H460 (114 et 265  $\mu\text{g/mL}$ , respectivement), ce qui pourrait être lié à une concentration plus élevée en flavan-3-ols (Tableau 17; Figure 42), comme la

catéchine et les dérivés d'épicatéchine (Rodgers et Grant, 1998; Delgado *et al.*, 2009; Haza et Morales, 2011). Cependant, cette activité ne doit pas être attribuée à des composés individuels, mais à des synergies entre molécules bioactives présentes dans l'extrait.

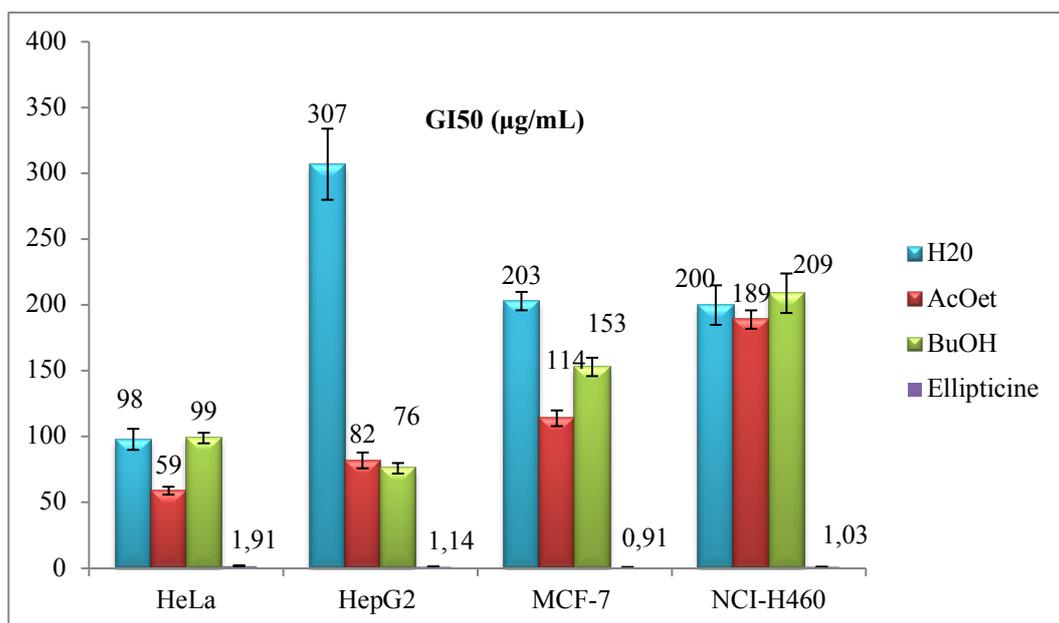


**Figure 42.** Propriétés cytotoxiques des feuilles d' *O. quadripartita* vis à vis des lignées cellulaires humaines

### V.3. *T. articulata*

L'extrait aqueux de *T. articulata* et ses fractions présentent un bon potentiel inhibiteur contre toutes les lignées de cellules tumorales (Tableau 17; Figure 43). La valeur GI50 la plus faible a été obtenue avec la fraction acétate d'éthyle, ce qui pourrait être liée à sa teneur la plus élevée en flavan-3-ols et flavonols. Kampa *et al.* (2000) ont rapporté que la catéchine, l'épicatéchine et la quercétine ont un bon effet sur l'inhibition de la prolifération de trois lignées cellulaires humaines différentes du cancer de la prostate (LNCaP, PC3 et DU145).

Par ailleurs, les flavonols rhamnosides sont connus pour leurs activités cytotoxiques remarquables comme inhibiteurs de la prolifération des lignées cellulaires tumorales humaines cultivées: A549 (poumons non petites cellules), SK-OV-3 (ovaires), SK-MEL-2 (peau), XF498 (système nerveux central) et HCT-15 (colon) (Kim, Kim *et al.*, 2004). La variation de la teneur en flavonoïdes et de la composition entre l'extrait aqueux brut et ses fractions pourrait expliquer les différences observées dans les résultats de la cytotoxicité, qui est en accord avec d'autres études (Chaudhary *et al.*, 2015; Rached *et al.*, 2016, 2017).



**Figure 43.** Propriétés cytotoxiques des feuilles de *T. articulata* vis à vis des lignées cellulaires humaines

**Tableau 17.** Propriétés cytotoxiques vis-à-vis des lignées de cellules tumorales humaines et des cellules primaires de foie non tumorales (moyenne  $\pm$  SD).

		Lignées de cellules tumorales humaines (GI, $\mu\text{g/mL}$ )				Cellules non tumorales (GI, $\mu\text{g/mL}$ )
		HeLa	HepG2	MCF-7	NCI-H460	PLP2
<i>M. nivelii</i>	H <sub>2</sub> O	61 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	223 $\pm$ 19 <sup>c</sup>	29 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	72 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	97 $\pm$ 6 <sup>b</sup>
	ACOET	15 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	18 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	16 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	49 $\pm$ 3 <sup>c</sup>	112 $\pm$ 3 <sup>a</sup>
	BuOH	37 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	27 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	30 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	89 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	71 $\pm$ 5 <sup>c</sup>
<i>O. quadripartita</i>	H <sub>2</sub> O	87 $\pm$ 9 <sup>b</sup>	46 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	199 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	308 $\pm$ 18 <sup>b</sup>	> 400
	ACOET	154 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	146 $\pm$ 13 <sup>b</sup>	114 $\pm$ 8 <sup>b</sup>	265 $\pm$ 14 <sup>c</sup>	> 400
	BUOH	153 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	167 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	200 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	356 $\pm$ 19 <sup>a</sup>	> 400
<i>T. articulata</i>	H <sub>2</sub> O	98 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	307 $\pm$ 27 <sup>a</sup>	203 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	200 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	>400
	ACOET	59 $\pm$ 3 <sup>c</sup>	82 $\pm$ 6 <sup>c</sup>	114 $\pm$ 6 <sup>c</sup>	189 $\pm$ 7 <sup>b</sup>	205 $\pm$ 8 <sup>*</sup>
	BUOH	76 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	99 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	153 $\pm$ 7 <sup>b</sup>	209 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	335 $\pm$ 19 <sup>*</sup>
Ellipticine		1.91 $\pm$ 0.06	1.14 $\pm$ 0.21	0.91 $\pm$ 0.04	1.03 $\pm$ 0.09	3.2 $\pm$ 0.7

Les valeurs de GI50 (moyenne  $\pm$  SD) correspondent à la concentration de l'échantillon atteignant 50% de l'inhibition de la croissance dans les lignées de cellules tumorales humaines ou dans la culture primaire du foie de porc. Dans chaque rangée, les différentes lettres signifient des différences significatives entre l'extrait aqueux de chaque plante et ses fractions ( $p < 0.05$ ). Lorsque seulement deux échantillons étaient présents, un test de Student ( $t$ -test) a été utilisé pour déterminer la différence significative entre deux échantillons différents, avec  $\alpha = 0.05$ : \* signifie une différence significative entre les échantillons ( $p < 0.001$ ).

## VI. Activité antibactérienne

Un antibactérien est une substance qui tue ou inhibe la croissance des microbes tels que des bactéries. Les médicaments antimicrobiens éliminent les microbes ou empêchent la croissance des microbes. Une large gamme de composés chimiques et naturels sont utilisés comme antibactériens. Les acides organiques sont également utilisés comme antimicrobiens dans des produits alimentaires, à titre d'exemple l'acide lactique, l'acide citrique et leurs sels.

Les guérisseurs traditionnels ont longtemps utilisé des plantes pour prévenir ou guérir les maladies infectieuses, beaucoup de ces plantes ont fait l'objet d'une étude scientifique pour l'activité antibactérienne dues à des composés de la plante comme les composés phénoliques et les tanins (Taguri *et al.*, 2004; Ahmad *et al.*, 2015). Pour l'évaluation du potentiel

antimicrobien de plantes, on a préféré de les tester contre plusieurs cibles. La présente étude porte sur l'activité antibactérienne de trois plantes.

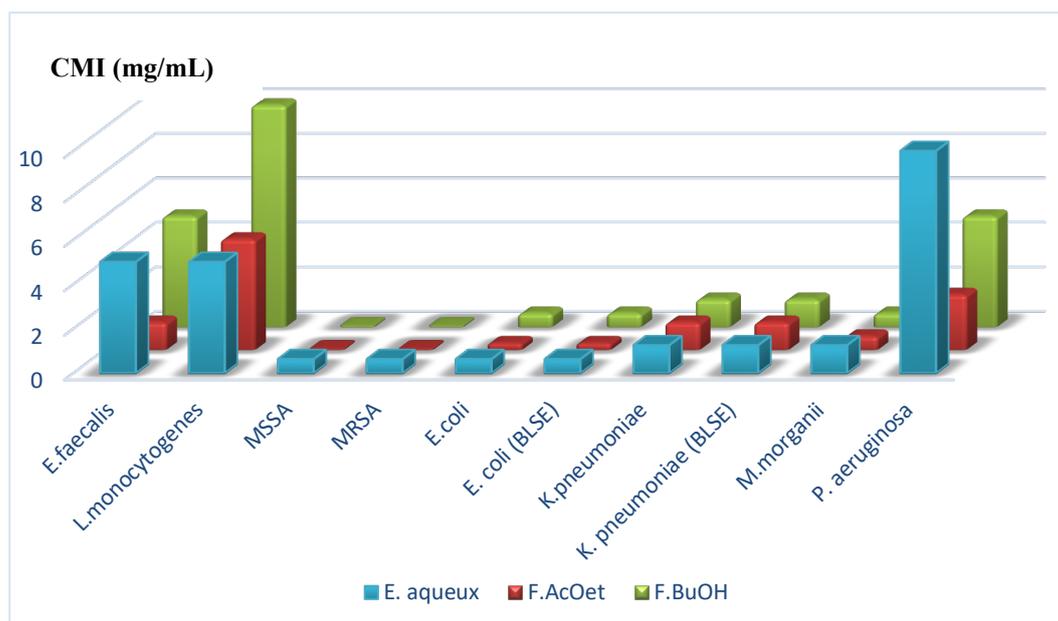
#### VI.1. *M. nivelii*

L'activité antibactérienne de l'extrait aqueux brut et de ses deux fractions est présentée dans le tableau 18. Tous les extraits ont montré une activité antibactérienne contre les dix souches bactériennes testées, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) allant de 0.078 à 10 mg/mL. Tous les extraits ont révélé une excellente activité antibactérienne dans un ordre similaire aux autres bio-activités mentionnées ci-dessus, fraction d'acétate d'éthyle > fraction butanol > extrait aqueux brut (**Figure 44**). Le MRSA et le MSSA sont les bactéries à Gram + les plus sensibles, tandis que *E. coli* et *E. coli* BLSE sont les bactéries à Gram- les plus sensibles, pour tous les échantillons testés. Il est important de souligner que tous les échantillons présentent de fortes activités bactéricides, en particulier contre MRSA et MSSA.

L'inhibition de la croissance est plus élevée dans la fraction acétate d'éthyle par rapport aux autres extraits; cette activité peut être associée aux teneurs les plus élevées de la majorité des composés phénoliques présents dans cette fraction. Mert *et al.* (2008) ont évalué le potentiel antibactérien de *M. communis*, contre *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* et *P. aeruginosa* par la méthode de diffusion du disque. Dans cette étude, la fraction acétate d'éthyle a également donné l'activité la plus forte contre *S. aureus*. La quercétine-3-*O*-rhamnoside, isolée de la fraction acétate d'éthyle des feuilles d'*Anacardium occidentale* L., a également révélé une bonne activité antimicrobienne contre toutes les souches étudiées (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. fluorescens* NCIB 3756, *S. aureus* ATCC 29213, *Bacillus subtilis* NCIB 3610, *K. pneumoniae* (stress clinique) et *Clostridium sporogens* NCIB 532) (Ajileye *et al.*, 2015).

La combinaison entre deux composés isolés, la quercétine-3-*O*-rutinoside et la quercétine-3-*O*-rhamnoside, a également révélé une activité antimicrobienne plus élevée à celle de tous les extraits, ce qui confirme l'effet synergique de ces deux molécules (Ajileye *et al.*, 2015).

Les ellagitannins sont aussi connus pour leur activité antimicrobienne élevée (Barrajón-Catalán *et al.*, 2010), ce qui peut expliquer le potentiel antibactérien élevé des échantillons étudiés dans ce travail.



**Figure 44.** Activité antibactérienne de *M. nivellii* vis-à-vis de dix souches bactériennes par la méthode de micro-dilution

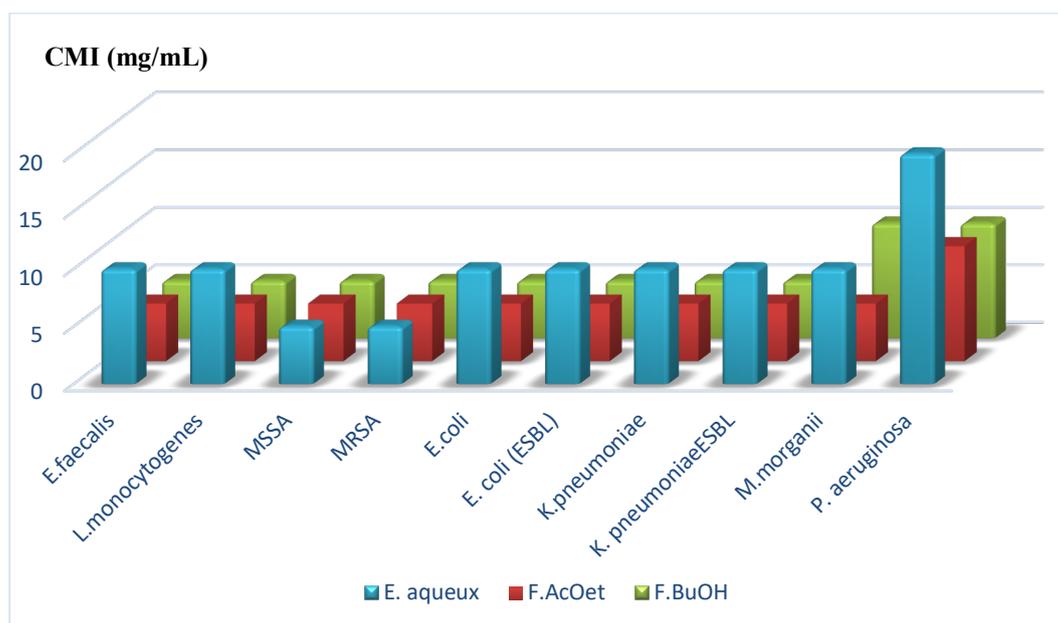
## VI.2. *O. quadripartita*

Les résultats obtenus présentés dans le tableau ci-dessous montrent que tous les extraits étudiés se sont avérés actifs contre l'ensemble des souches testées et qui ont donné des concentrations minimales inhibitrices (CMI) allant de 5 à 20 mg/mL (**Tableau 18**).

On note également une activité antibactérienne plus prononcée sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. Les résultats révèlent que les fractions organiques sont plus actives par rapport à l'extrait aqueux brut vis-à-vis toutes les souches bactériennes testées (**Figure 45**). Ce résultat pourrait être expliqué par la différence de la solubilité des composés phytochimique porteurs de l'activité antibactérienne. La sensibilité de ces souches peut être attribuée à la capacité de l'agent antibactérien d'inhiber la croissance des bactéries étudiées tels que les composés phénoliques et les tanins (**Taguri et al., 2004**). L'HPLC a révélé la présence de divers composés flavonoïdiques et non flavonoïdiques, qui sont déjà prouvés et confirmés comme des substances antibactériennes importantes, dans tous les extraits testés (**Taguri et al., 2004; Zhang et al., 2017**). Les flavones, flavonols, flavano-3-Is et les flavanones ont montré qu'ils possèdent une activité antimicrobienne élevée (**Ramos et al., 2006; Thomas, 2007; Özçelik et al., 2008; Akroum et al., 2009; Novy et al., 2011**). Il en est de même des acides phénoliques (**Thakur et al., 2015; Beydokthi et al., 2017**).

Les résultats sont en accord avec ceux Taddese *et al.* (2003) qui ont trouvé que l'extrait méthanolique des feuilles de l'*O. quadripartita* était actif contre l'*E. coli* (ATCC

25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) et *S. aureus* (ATCC 6538). Ooko (2009) a montré que les extraits aqueux et méthanolique de l'espèce de même genre; l'*O. lanceolata* ont une activité inhibitrice contre *S. aureus*. De même, Bhandari *et al.* (2017) rapporté l'activité antibactérienne des extraits d'*O. quadripartita* contre *S. aureus* et *E.coli* par la méthode de diffusion du disque. Paudel et Gyawali (2014) ont également étudié cette activité avec des extraits d'*O. wightiana* Wall vis-à-vis de plusieurs souches bactériennes (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi* et *Salmonella paratyphi*).



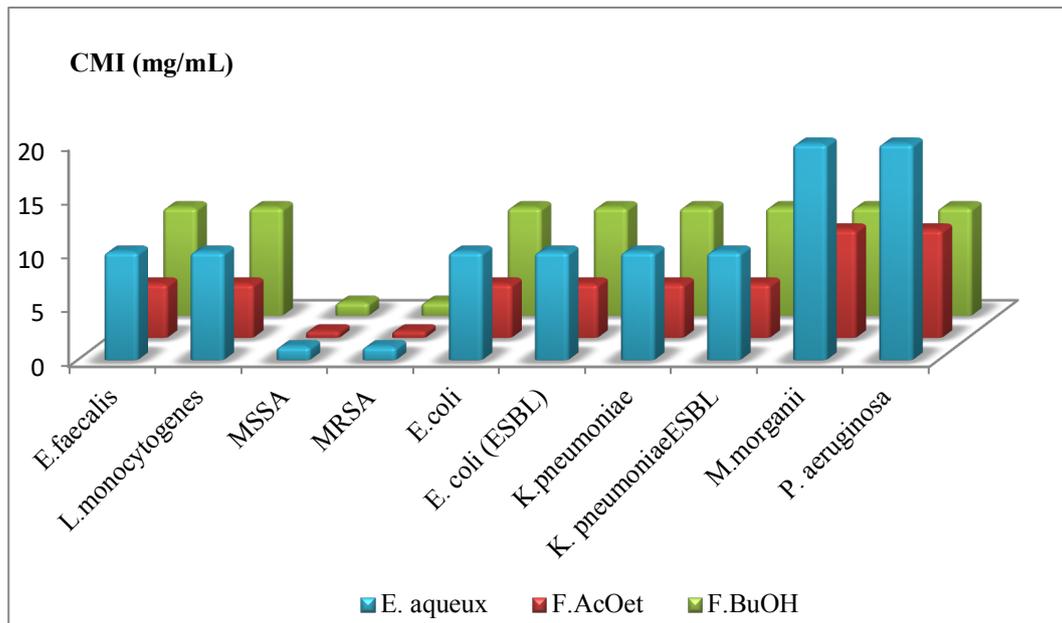
**Figure 45.** Activité antibactérienne d'*O. quadripartita* vis-à-vis de dix souches bactériennes par la méthode de micro-dilution

### VI.3. *T. articulata*

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux brut des feuilles de *T. articulata* et de ses fractions organiques contre les microorganismes pathogènes testés sont présentés dans le tableau 18. Les feuilles de cette espèce ont été utilisées dans l'ethnomédecine pour traiter les maladies infectieuses. La confirmation de cette utilisation peut être établie en raison de sa bonne activité contre les souches de bactéries sélectionnées.

La fraction acétate d'éthyle présente l'activité la plus élevée contre toutes les souches bactériennes testées, à l'exception de *M. morganii* et *P. aeruginosa*. Bien que la fraction acétate d'éthyle présente une activité inhibitrice élevée contre MRSA et MSSA avec une concentration minimale inhibitrice de 0.625 mg/mL, l'extrait aqueux brut et sa fraction butanolique ont également montré une forte activité contre ces bactéries (CMI = 1.25 mg/mL) par rapport à d'autres souches (Figure 46).

L'efficacité de ces extraits contre les souches de microorganismes pathogènes pourrait être due à leur composition phénolique. En effet, de nombreux travaux de recherche ont démontré que les flavonols végétaux peuvent contribuer à l'inhibition de la croissance bactérienne de plusieurs agents pathogènes, soulignent qu'ils sont très connus pour leurs activités bactéricides et bactériostatiques (Ahmad *et al.*, 2015). En outre, les composés phénoliques identifiés dans la fraction acétate d'éthyle pourraient être considérés comme des agents potentiels antimicrobiens. Le mécanisme d'action des flavonoïdes contre les microorganismes est bien décrit dans la littérature et pourrait être un dommage de la membrane cytoplasmique; un effet inhibiteur du métabolisme énergétique ou l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques (Dzoyem *et al.*, 2013; Ahmad *et al.*, 2015). Toutefois, la plupart des composés naturels issus des plantes exercent leur activité antibactérienne sur la paroi des microorganismes (bactéries, champignons) (Zida *et al.*, 2016). Cependant, Caturla *et al.* (2003) ont démontré que les catéchines (catéchine et épicatechine) provoquent des fuites sur des liposomes composés de membranes modèles bactériennes de l'*E. coli* encapsulant la probécarboxy fluorescéine fluorescente (CF). Chan *et al.* (2014) ont trouvé que des dérivés rhamnosides de flavonols isolés à partir de feuilles de *Calliandra tergemina* (L.) Benth. ont montré des activités antibactériennes contre le SARM. De même, Aderogba *et al.* (2013) ont montré une activité antibactérienne élevée de la formyricétine-*O*-rhamnoside et de la quercétine-*O*-rhamnoside, isolés des feuilles de *Croton menyharthii* Pax contre *E. coli*, *K. pneumoniae* et *S. aureus*, l'activité la plus forte étant enregistrée avec la fraction acétate d'éthyle par rapport à l'extrait aqueux brut et la fraction butanolique, ce qui concorde avec nos résultats. Dans une étude antérieure, Djouahri *et al.* (2014) ont montré que les extraits méthanolique, éthanolique et aqueux de *T. articulata* ont révélé un potentiel efficace contre les six souches testées (*S. enterica*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *E. coli*).



**Figure 46.** Activité antibactérienne de *T. articulata* vis-à-vis de dix souches bactériennes par la méthode de micro-dilution

**Tableau 18.** Activité antibactérienne des extraits des plantes vis-à-vis de dix souches bactériennes.

Souches bactériennes	<i>M. nivelii</i>			<i>O. quadripartita</i>			<i>T. articulata</i>		
	Extrait aqueux brut	Fraction acétate d'éthyle	Fraction butanolique	Extrait aqueux brut	Fraction acétate d'éthyle	Fraction butanolique	Extrait aqueux brut	Fraction acétate d'éthyle	Fraction butanolique
<b>Gram+</b>	MIC (mg/mL)								
<i>E. faecalis</i>	5 <sup>a</sup>	1.25 <sup>b</sup>	5 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>
<i>L. monocytogenes</i>	10 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>
MSSA	0.625 <sup>a</sup>	0.078 <sup>b</sup>	0.078 <sup>b</sup>	5 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	1,25 <sup>a</sup>	0,625 <sup>b</sup>	1,25 <sup>a</sup>
MRSA	0.625 <sup>a</sup>	0.078 <sup>b</sup>	0.078 <sup>b</sup>	5 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	1,25 <sup>a</sup>	0,625 <sup>b</sup>	1,25 <sup>a</sup>
<b>Gram-</b>	MIC (mg/mL)								
<i>E. coli</i>	0.625 <sup>a</sup>	0.3125 <sup>b</sup>	0.625 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i> BLSE	0.625 <sup>a</sup>	0.3125 <sup>b</sup>	0.625 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>
<i>K. pneumoniae</i>	1.25 <sup>a</sup>	1.25 <sup>a</sup>	1.25 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>
<i>K. pneumoniae</i> BLSE	1.25 <sup>a</sup>	1.25 <sup>a</sup>	1.25 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>
<i>M. morgani</i>	1.25 <sup>a</sup>	0.625 <sup>b</sup>	0.625 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	10 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>
<i>P. aeruginosa</i>	10 <sup>a</sup>	2.5 <sup>c</sup>	5 <sup>b</sup>	20 <sup>a</sup>	10 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>	20 <sup>a</sup>	10 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>

Les expériences ont été réalisées avec trois répétitions (n=3) et les résultats ont été soumis à l'analyse des variances (anova-one-way) selon le test de comparaison multiple de Tukey, p <0.05 est considéré significatif.

**CONCLUSIONS**

**ET**

**PERSPECTIVES**

---

Les principaux objectifs de cette thèse sont, d'une part la caractérisation phytochimique de quelques plantes médicinales d'Algérie afin d'avoir une connaissance plus approfondie des métabolites secondaires, particulièrement les composés phénoliques qu'elles recèlent et d'autre part, l'évaluation de leurs potentiels biologiques au travers quelques activités choisies pour leur pertinence.

Les plantes médicinales objets de notre étude sont: *Myrtus nivelii* (Myrtacées), *Osyris quadripartita* (Santalacées) et *Tetraclinis articulata* (Cupressacées); connues traditionnellement en Afrique du Nord pour traiter diverses pathologies comme les infections bactériennes et fongiques, le diabète, la tension artérielle, les rhumatismes, les allergies, les inflammations, etc. Ces pathologies impliquent un processus infectieux, inflammatoire et/ou un stress oxydatif, d'où le choix des bioactivités testées.

Pour chacune de ces espèces, divers types d'extraits ont été obtenus: extrait brut aqueux, acétate d'éthyle et butanolique. Ces extraits ont été évalués à l'aide de méthodes de criblage chimique préliminaire par CCM et criblage biologique par divers tests *in vitro*.

Pour toutes les plantes, l'extraction a été effectuée par l'eau sous reflux et par partage liquide-liquide avec des solvants à polarité croissante. Le criblage chimique préliminaire a mis en évidence de nombreuses substances à caractère polyphénolique: des flavonoïdes, des tanins et des acides phénoliques, selon les profils suivants:

-Prédominance des flavonols, les tanins hydrolysables et acides phénoliques chez *Myrtus nivelii*,

-Présence des flavan-3-ols, flavones, flavonols, acides phénoliques et dérivés des flavanones chez *Osyris quadripartita*,

-Contenance des Flavan-3-ols et flavonols chez *Tetraclinis articulata*.

L'utilisation de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC-DAD-ESI/MSn) a permis à la fois la séparation et l'identification en ligne simultanément des composés phénoliques dans les différents extraits. Nous avons ainsi identifié vingt-huit composés phénoliques chez *O. quadripartita*; vingt-sept composés phénoliques dans les extraits de *M. nivelii* et neuf produits phénoliques dans ceux de *T. articulata*.

Le volet biologique comporte diverses activités: activité antioxydante déterminée par quatre tests différents (test de DPPH, test de FRAP, test de blanchissement de système  $\beta$ -carotène/acide linoléique et test de TBARS), activité anti-inflammatoire, activité antibactérienne, activité anti-tumorale par utilisation de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (Hela, MCF-7, HepG2 et NCI-H460).

Nos résultats révèlent que les trois plantes médicinales étudiées possèdent des potentiels biologiques intéressants.

Quelque soit l'activité testée, la fraction acétate d'éthyle se distingue des autres fractions par des activités les plus élevées et parfois supérieures à celles des témoins positifs utilisés. Ces activités concordent avec la richesse qualitative et quantitative de cette fraction en composés phénoliques comparativement aux autres fractions et ce, chez toutes les espèces de plantes étudiées. Tout en supportant les utilisations ethnopharmacologiques des plantes étudiées, de telles activités les prédestinent à des applications potentielles dans divers secteurs tels que la pharmacologie ou l'agro-alimentaire.

Les différentes activités antioxydantes des extraits des plantes évaluées ont permis de mettre en évidence le fort pouvoir antioxydant des composés phénoliques avec une  $IC_{50}$  inférieure à celle de Trolox, et ce, dans tous les échantillons. Les molécules antioxydantes pourraient être valorisées aussi bien dans le domaine pharmacologique que dans le domaine agro-alimentaire.

La détermination de la cytotoxicité et anti-inflammatoire a révélé que l'ensemble des extraits sont actifs sur les lignées cellulaires choisies.

Le fort pouvoir antibactérien des extraits obtenus, particulièrement la fraction acétate d'éthyle de *M. nivellii*, très active sur toutes les souches bactériennes et notamment contre MRSA et MSSA suggère une application dans le domaine clinique pour le traitement des états infectieux.

Cette étude aura donc permis d'un point de vue fondamental de mieux connaître la phytochimie de ces plantes.

D'un point de vue applications potentielles, cette étude aura permis de confirmer que les substances polyphénoliques produites par les plantes évaluées peuvent être de bons candidats au remplacement des substances chimiques utilisées jusque là.

Les espèces de plantes choisies ayant fait l'objet de très peu d'études scientifiques ou pas du tout, leur profil phytochimique reste à approfondir. Des études complémentaires pourront être envisagées dans plusieurs domaines:

-Poursuite des études phytochimique et biologique des autres parties des plantes non encore testées.

-Elargissement l'étude phytochimique aux autres classes de métabolites secondaires telles que les alcaloïdes, les saponines, etc.

-Isolement des principes actifs pour chacune des activités testées par l'approche extraction guidée par tests biologiques.

-Poursuite des études biologiques par des tests *in vivo* sur des animaux modèles par utilisation des principes actifs purs.

-Des travaux devront être réalisés en vue d'élucider la structure chimique des molécules porteuses d'activités biologiques.

-Un autre prolongement de cette thèse pourrait être la détermination du mécanisme d'action par l'approche relation structure-activité.

En conclusion, cette thèse a montré l'intérêt de l'étude pluridisciplinaire combinant la chimie extractive, la chimie analytique (qualitative et quantitative), la biologie et la biochimie.

# RÉFÉRENCES

---

## BIBLIOGRAPHIQUES

Rapport-Grauit.com

## A.

1. Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaiee, A., (2004). Pesticides and oxidative stress: A review. *Medical Science Monitor*, 10, 6, 141-147.
2. Abreu, R.M., Ferreira, I.C.F.R., Calhelha, R.C., Lima, R.T., Vasconcelos, M.H., Adegas, F., Chaves, R., Chaves, R., Queiroz, M.J.R., (2011). Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno [3, 2-b] pyridine-2-carboxylate derivatives: *In vitro* evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 12, 5800-5806.
3. Aderogba, M.A., Ndhlala, A.R., Rengasamy, K.R.R., Van Staden, J., (2013). Antimicrobial and selected *in vitro* enzyme inhibitory effects of leaf extracts, flavonols and indole alkaloids isolated from *Croton menyharthii*. *Molecules*, 18, 10, 12633-12644.
4. Adjimani, J.P., Asare, P., (2015). Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators. *Toxicology Reports*, 2, 721-728.
5. Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., Lomri, A., (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases: Rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*, 74, 7, 636-643.
6. Ahmad, A., Kaleem, M., Ahmed, Z., Shafiq, H., (2015). Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections-A review. *Food Research International*, 77, 221-235.
7. Ahmadinejad, F., Geir Møller, S., Hashemzadeh-Chaleshtori, M., Bidkhor, G., Jami, M.S., (2017). Molecular mechanisms behind free radical scavengers function against oxidative stress. *Antioxidants*, 6, 3, 51.
8. Ajileye, O.O., Obuotor, E.M., Akinkunmi, E.O., Aderogba, M.A., (2015). Isolation and characterization of antioxidant and antimicrobial compounds from *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) leaf extract. *Journal of King Saud University-Science*, 27, 3, 244-252.
9. Akroum, S., Bendjedou, D., Satta, D., Lalaoui, K., (2009). Antibacterial activity and acute toxicity effect of flavonoids extracted from *Mentha longifolia*. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 4, 2, 93-96.
10. Ali, B., Al-Wabel, N.A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S.A., Anwar, F., (2015). Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5, 8, 601-611.
11. Al-Jaber, H.I., Mosleh, I.M., Mallouh, A., Abu Salim, O.M., Abu Zarga, M.H., (2010). Chemical constituents of *Osyris alba* and their antiparasitic activities. *Journal of Asian Natural Products Research*, 12, 9, 814-820.
12. Álvarez-Castro, E., Orallo Cambeiro, F., (2003). [Bioquímica] Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 22, 10, 130-140.

13. Alvarez-Suarez, J.M., Carrillo-Perdomo, E., Aller, A., Giampieri, F., Gasparri, M., González-Pérez, L., Beltrán-Ayala, P., Battino, M., (2017). Anti-inflammatory effect of Capuli cherry against LPS-induced cytotoxic damage in RAW 264.7 macrophages. *Food And Chemical Toxicology*, 102, 46-52.
  14. Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl B., Weil, J.A., (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, 4, 551-562.
  15. Ambasta, R.K., Jha, S.K., Kumar, D., Sharma, R., Jha, N.K., Kumar, P., (2015). Comparative study of anti-angiogenic activities of luteolin, lectin and lupeol biomolecules. *Journal of Translational Medicine*, 13, 1, 307.
  16. Andersen, O.M., Markham, K.R., (2005). *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRC press, London, p. 1256.
  17. Andrews, J.M., (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 1, 5-16.
  18. Antman, E.M., (2017). Evaluating the Cardiovascular Safety of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Circulation*, 135, 21, 2062-2072.
  19. Aouinty, B., Oufara, S., Mellouki, F., Mahari, S., (2006). Evaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles du ricin (*Ricinus communis* L.) et du bois de thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.) sur les larves de quatre moustiques culicidés: *Culex pipiens* (Linné), *Aedes caspius* (Pallas), *Culiseta longiareolata* (Aitken) et *Anopheles maculipennis* (Meigen). *Biotechnologie, Agronomie, Société Et Environnement*, 10, 2, 67-71.
  20. Apel, K., Hirt, H., (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.
  21. Aquila, S., Giner, R.M., Recio, M.C., Spegazzini, E.D., Ríos, J.L., (2009). Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Cayaponia tayuya* roots. *Journal of Ethnopharmacology*, 121, 2, 333-337.
  22. Azqueta, A., Collins, A., (2016). Polyphenols and DNA damage: A mixed blessing. *Nutrients*, 8, 12, 785.
- B.**
23. Bahri, S., Ali, R.B., Abidi, A., Jameleddine, S., (2017). The efficacy of plant extract and bioactive compounds approaches in the treatment of pulmonary fibrosis: A systematic review. *Biomedicine And Pharmacotherapy*, 93, 666-673.
  24. Barnes, P.M., Powell-Griner, E., McFann, K., Nahin, R.L., (2004). Complementary and alternative medicine use among adults: United States, 2002. In *Seminars in Integrative Medicine*, 2, 2, 54-71.
  25. Barnes, J., Anderson, L.A., Phillipson, J.D., (2008). "Herbal Medicines-Third Edition". *American Journal of Homeopathic Medicine*, 101, 1, 52.
  26. Barrajon-Catalán, E., Fernández-Arroyo, S., Saura, D., Guillén, E.,

- Fernández-Gutiérrez, A, Segura-Carretero, A., Micol, V., (2010). Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food And Chemical Toxicology*, 48, 8, 2273-2282.
27. Barrero, A.F., Quiñez del Moral, J.F., Lucas, R., Paya, M., Akssira, M., Akaad, S., Mellouki, F., 2003. Diterpenoids from *Tetraclinis articulata* that inhibit various human leukocyte functions. *Journal of Natural Products*, 66, 844-850.
28. Barros, L., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R., (2010). Leaves, flowers, immature fruits and leafy flowered stems of *Malva sylvestris*: A comparative study of the nutraceutical potential and composition. *Food And Chemical Toxicology*, 48, 6, 1466-1472.
29. Barros, L., Pereira, E., Calhelha, R.C., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5, 4, 1732-1740.
30. Barry, K.M., Davies, N.W., Mohammed, C.L., (2001). Identification of hydrolysable tannins in the reaction zone of *Eucalyptus nitens* wood by high performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 12, 2, 120-127.
31. Basli, A., Belkacem, N., Amrani, I., (2017). Health benefits of phenolic compounds against cancers. In phenolic compounds-biological activity. Soto-Hernandez, M., Palma-Tenango M., Garcia-Mateos, M.D.R., Eds. InTech, 193-210.
32. Batra, P., Sharma, A.K., (2013). Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech*, 3, 6, 439-459.
33. Beaudeau, J.L., Vasson, M.P., (2005). Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier, Paris, p. 45-86.
34. Bellakhdar, J., Claisse, R., Fleurentin, J., Younos, C., (1991). Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea. *Journal of Ethnopharmacology*, 35, 2, 123-143.
35. Bellakhdar, J., 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Ibis Press, Paris.
36. Ben Ghnaya, A.B., Amri, I., Hanana, M., Gargouri, S., Jamoussi, B., Romane, A., Hamrouni, L., (2016). *Tetraclinis articulata* (Vahl.) Masters essential oil from Tunisia: Chemical characterization and herbicidal and antifungal activities assessment. *Industrial Crops And Products*, 83, 113-117.
37. Berker, K.I., Güçlü, K., Tor, İ., Apak, R., (2007). Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and

- ferricyanide reagents. *Talanta*, 72, 3, 1157-1165.
38. Bessada, S.M.F., Barreira, J.C.M., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., Oliveira, M.B.P.P., 2016. Phenolic profile and antioxidant activity of *Coleostephus myconis* (L.) Rchb.f.: An underexploited and highly disseminated species. *Industrial Crops And Products*, 89, 45-51.
39. Bessah, R., Benyoussef, E.H., (2015). La filière des huiles essentielles État de l'art, impacts et enjeux socioéconomiques. *Revue des Énergies Renouvelables*, 18, 3, 513-528.
40. Beydokthi, S.S., Sendker, J., Brandt, S., Hensel, A., (2017). Traditionally used medicinal plants against uncomplicated urinary tract infections: Hexadecyl coumaric acid ester from the rhizomes of *Agropyron repens* (L.) P. Beauv. with antiadhesive activity against uropathogenic *E. coli*. *Fitoterapia*, 117, 22-27.
41. Bhandari, P.S., Bhandari, R., Sah, B.K., Gyawali, S., Bhusal, M., Shakya, S., Shrestha, S., (2017). Antibacterial activity of methanolic extract of *mangifera indica* (bark) and *osyris lanceolata* (leaves) from western region of Nepal. *World Journal of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, 6, 6, 1778-1792.
42. Blois, M.S., (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
43. Bnouham, M., Mekhfi, H., Legssyer, A. Ziyat, A., (2002). Ethnopharmacology Forum Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *International Journal of Diabetes And Metabolism*, 10, 33-50.
44. Bobinaitė, R., Viskelis, P., Bobinas, Č., Mieželienė, A., Alenčikienė, G., Venskutonis, P.R., (2016). Raspberry marc extracts increase antioxidative potential, ellagic acid, ellagitannin and anthocyanin concentrations in fruit purees. *LWT-Food Science And Technology*, 66, 460-467.
45. Boizot, N., Charpentier, J.P., (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA*, Numéro spécial 2006: Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, 79-82.
46. Boligon, A.A., Machado, M.M., Athayde, M.L., (2014). Technical evaluation of antioxidant activity. *Medicinal chemistry*, 4(7), 517-522.
47. Bors, W., Saran, M., Elstner, E.F., (1992). Screening for plant antioxidants. In *Modern methods of plant analysis - new series, Plant toxin analysis. Plant Toxin Analysis*. Linskens, H.F., Jackson, J.F., Eds. Springer, Berlin, Heidelberg, 13, p. 277-295.
48. Boscá, L., Zeini, M., Través, P.G., Hortelano, S., (2005). Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology*, 208, 2, 249-258.
49. Bouayed, J., Bohn, T., (2010). Exogenous antioxidants-double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 3, 4, 228-237.

50. Bouayed, J., Bohn, T., (2012). Nutrition, well-being and health. Dietary derived antioxidants: Implications on health. InTech, Croatia, 1-22.
51. Bourkhiss, M., Hnach, M., Bourkhiss, B., Ouhssine, M., Chaouch, A., (2007). Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc. *Afrique Science*, 3, 2, 232-242.
52. Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., Abrini, J., Dakka, N., (2017). Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 1-11.
53. Bouzabata, A., (2013). Traditional treatment of high blood pressure and diabetes in Souk Ahras District. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 5, 1, 12-20.
54. Bouzabata, A., Bazzali, O., Cabral, C., Gonçalves, M.J., Cruz, M.T., Bighelli, A., Cavaleiro, C., Casanova, J., Salgueiro, L., Tomi, F., (2013). New compounds, chemical composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential oil from *Myrtus nivellei* Batt. & Trab., an endemic species of Central Sahara. *Journal of Ethnopharmacology*, 149, 3, 613-620.
55. Bouzabata, A., (2016). Les médicaments à base de plantes en Algérie: Réglementation et enregistrement. *Phytothérapie*, 1-8.
56. Bouzid, W., Yahia, M., Abdeddaim, M., Aberkane, M.C., Ayachi, A., (2011). Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'Aubepine Monogyne. *Lebanese Science Journal*, 12, 1, 59-69.
57. Braca, A., Sortino, C., Politi, M., Morelli, I., Mendez, J., (2002). Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 3, 379-381.
58. Brango-Vanegas, J., Costa, G.M., Ortmann, C.F., Schenkel, E.P., Reginatto, F.H., Ramos, F.A., Arévalo-Ferro, C., Castellanos, L., (2014). Glycosyl flavonoids from *Cecropia pachystachya* Trécul are quorum sensing inhibitors. *Phytomedicine*, 21, 5, 670-675.
59. Bremer, B., Bremer, K., Chase, M., Fay, M., Reveal, J., Soltis, D. Soltis P., Stevens, P., (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, 105-121.
60. Brown, J.E., Khodr, H., Hider R.C., Rice-Evans, C.A., (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with  $cu^{2+}$  ions: Implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal*, 330, 3, 1173-1178.
61. Bruneton, J., (1995). *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants*. UER des Sciences d'Angers, Angers, p.227-788.
62. Bruneton, J., 2009. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Lavoisier, Paris, p. 173-176.

63. Buhagiar, J.A., Podesta, M.T., Wilson, A.P., Micallef, M.J., Ali, S., (1999). The induction of apoptosis in human melanoma, breast and ovarian cancer cell lines using an essential oil extract from the conifer *Tetraclinis articulata*. *Anticancer Research*, 19, 6, 5435-5443.
64. Bureau, L., (2016). Plantes, compléments alimentaires et nutraceutiques, une réglementation complexe. *Actualités Pharmaceutiques*, 55, 561, 34-38.
65. Bylka, W., Matlawska, I., Pilewski, N.A., (2004). Natural flavonoids as antimicrobial agents. *Jana*, 7, 2, 9-16.
- C.**
66. Cai, S.Q., Wang, R.F., Yang, X.W., Shang, M.Y., Ma, C.M., Shoyama, Y., (2006). Antiviral flavonoid-type C-glycosides from the flowers of *Trollius chinensis*. *Chemistry And Biodiversity*, 3, 343-348.
67. Cao, T.W., Geng, C.A., Jiang, F.Q., Ma, Y.B., He, K., Zhou, N.J., Zhang X-M, Zhou J., Chen J.J., 2013. Chemical constituents of *Swertia yunnanensis* and their anti-hepatitis B virus activity. *Fitoterapia*, 89, 175-182.
68. Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R., (2013a). The role of phenolic compounds in the fight against cancer—a review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 13, 8, 1236-1258.
69. Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R., (2013b). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food And Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
70. Carocho, M., Barros, L., Bento, A., Santos-Buelga, C., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R., (2014). *Castanea sativa* Mill. flowers amongst the most powerful antioxidant matrices: A phytochemical approach in decoctions and infusions. *Biomed Research International*, 2014, 1-7.
71. Carte, B.K., Carr, S., DeBrosse, C., Hemling, M.E., MacKenzie, L., Offen, P., Berry, D.E., (1991). Aciculatin, a novel flavone-C-glycoside with DNA binding activity from *Chrysopogon aciculatis*. *Tetrahedron*, 47, 10, 1815-1822.
72. Catarino, M.D., Talhi, O., Rabahi, A., Silva, A.M.S., Cardoso, S.M., (2016). The Antiinflammatory Potential of Flavonoids: Mechanistic Aspects. *Studies In Natural Products Chemistry*, 48, 65-99.
73. Caturla, N., Vera-Samper, E., Villalaín, J., Mateo, C.R., Micol, V., (2003). The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Radical Biology And Medicine*, 34, 6, 648-662.
74. Cazarolli, L.H., Cazarolli, L.H., Kappel, V.D., Pereira, D.F., Moresco, H.H., Brighente, I.M.C., Pizzolatti, M.G., Silva, F.R.M.B., (2012). Anti-hyperglycemic action of apigenin-6-C- $\beta$ -fucopyranoside from *Averrhoa carambola*. *Fitoterapia*. 83, 7, 1176-1183.
75. Çelik, S.E., Özyürek, M., Güçlü, K., Apak R., (2010). Solvent effects

- on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods. *Talanta*, 81, 4, 1300-1309.
76. Césarini, J.P., (2004). Le sélénium: actualités. John Libbey Eurotext, Paris, p.10-13.
77. Chabosseau, S., Derbré, S., (2016). Cancer du sein: recommandations sur l'usage de la phytothérapie. *Actualités Pharmaceutiques*, 55, 552, 45-49.
78. Chan, E.W.L., Gray, A.I., Igoli, J.O., Lee, S.M., Goh, J.K., (2014). Galloylated flavonol rhamnosides from the leaves of *Calliandra tergemina* with antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytochemistry*, 107, 148-154.
79. Chand, K., Hiremathad, A., Singh, M., Santos, M.A., Keri, R.S., (2017). A review on antioxidant potential of bioactive heterocycle benzofuran: Natural And Synthetic Derivatives. *Pharmacological Reports*, 69, 2, 281-295.
80. Chao-Chin, H., Jau-Tien, L., Fung-Jou, L., Fen-Pi, C., Deng-Jye, Y., (2008). Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chemistry*, 109, 439-446.
81. Chapman, J.L., Porsch, L., Vidaurre, R., Backhaus, T., Sinclair, C., Jones, G., Boxall, A.B., (2017). Three methods for integration of environmental risk into the benefit-risk assessment of veterinary medicinal products. *Science of the Total Environment*, 605, 692-701.
82. Chaudhary, S., Chandrashekar, K.S., Pai, K.S.R., Setty, M.M., Devkar, R.A., Reddy, N.D., Shoja, M.H., (2015). Evaluation of antioxidant and anticancer activity of extract and fractions of *Nardostachys jatamansi* DC in breast carcinoma. *BMC Complementary And Alternative Medicine*, 15, 1, 50.
83. Chen, Y.G., Li, P., Li, P., Yan, R., Zhang, X.Q., Wang, Y., Zhang, X.T., Ye, W.C., Zhang, Q.W., (2013).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory effect and simultaneous quantification of three major flavonoid glycosides in *Microctis folium*. *Molecules*, 18, 4221-4232.
84. Chen, Y.H., Zhang, W.J., Li, D., Ai, J.J., Meng, Y.H., Ying, X.X., Kang, T.G., (2013). Hepatic and gastrointestinal first-pass effects of vitexin 4''-O-glucoside in rats. *Journal of Pharmacy And Pharmacology*, 65, 1500-1507.
85. Chen, Z., Bertin, R., Froldi, G., (2013). EC<sub>50</sub> estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry*, 138, 1, 414-420.
86. Cheng, L., Ren, Y., Lin, D., Peng, S. A., Zhong, B., Ma, Z., (2017). The anti-inflammatory properties of *Citrus wilsonii* Tanaka extract in LPS-induced RAW 264.7 and primary mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Molecules*, 22, 7, 1213.
87. Cheynier, V., Sarni-Manchado, P., Quideau, S., (2012). Recent advances in polyphenol research. John Wiley and Sons, West Sussex, 3, p. 364.
88. Chhabra, S.C., Mahunnah, R.L.A., Mshiu, E.N., (1991). Plants used in traditional medicine in Eastern

- Tanzania. V. Angiosperms (Passifloraceae to Sapindaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 33, 1, 2, 143-157.
89. Choi, J.S., Islam, M.N., Ali, Y., Kim, Y.M., Park, H.J., Sohn, H.S., Jung, H.A., (2014a). The effects of C-glycosylation of luteolin on its antioxidant, anti-Alzheimer's disease, anti-diabetic, and antiinflammatory activities. *Archives of Pharmacal Research*, 37, 10, 354-363.
90. Choi, J.S., Islam, M.N., Ali, M.Y., Kim, E.J., Kim, Y.M., Jung, H.A., (2014b). Effects of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of apigenin. *Food And Chemical Toxicology*, 64, 27-33.
91. Choo, C.Y., Sulong, N.Y., Man, F., Wong, T.W., (2012). Vitexin and isovitexin from the leaves of *Ficus deltoidea* with *in-vivo*  $\alpha$ -glucosidase inhibition. *Journal of Ethnopharmacology*, 142, 3, 776-781.
92. Chung, Y.C., Chang, C.T., Chao, W.W., Lin, C.F., Chou, S.T., (2002). Antioxidative activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 50, 8, 2454-2458.
93. Ci, X., Zhou, J., Lv, H., Yu, Q., Peng, L., Hua, S., (2017). Betulin exhibits anti-inflammatory activity in LPS-stimulated macrophages and endotoxin-shocked mice through an AMPK/AKT/Nrf2-dependent mechanism. *Cell Death And Disease*, 8, 5, e2798.
94. Cillard, J., Cillard, P., (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oleagineux, Corps Gras, Lipides*, 13, 1, 24-29.
95. Cimanga, K., Ying, L., De Bruyne, T., Apers, S., Cos, P., Hermans, N., Bakana, P., Tona, L., Kambu, K., Kalenda, D.T., Pieters, L., Vanden Berghe, D., Vlietinck, A.J., (2001). Radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity of phenolic compounds from *Bridelia ferruginea* stem bark. *Journal of Pharmacy And Pharmacology*, 53, 5, 757-761.
96. Collin, S. et Crouzet, J., (2011). Polyphénols et procédés: Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire. Lavoisier, Paris, p. 337.
97. Craft, B.D., Kerrihard, A.L., Amarowicz, R., Pegg, R.B., (2012). Phenol-based antioxidants and the *in vitro* methods used for their assessment. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, 11, 2, 148-173.
98. Cruz, F.F., Rocco, P.R.M., Pelosi, P., (2017). Anti-inflammatory properties of anesthetic agents. *Critical Care*, 21, 1, 67.
99. Cueto, M., Farroni, A., Schoenlechner, R., Schleining, G., Buera, P., (2017). Carotenoid and color changes in traditionally flaked and extruded products. *Food Chemistry*, 229, 640-645.
100. uevas-Valenzuela, J., Vergara-Salinas, J.R., Pérez-Correa, J.R., (2016). Advances in Technologies for Producing Food-Relevant Polyphenols. CRC Press, Boca Raton, p. 335.
101. ushnie, T.T., Lamb, A.J., (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal*

- of Antimicrobial Agents, 26, 5, 343-356.
102. ushnie, T.T., Lamb, A.J., (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38, 2, 99-107.
103. uyckens, F., Claeys, M., (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 1, 1-15.
- D.**
104. da Silva Morrone, M., de Assis, A.M., da Rocha, R.F., Gasparotto, J., Gazola, A.C., Costa, G.M., (2013). *Passiflora manicata* (Juss.) aqueous leaf extract protects against reactive oxygen species and protein glycation *in vitro* and *ex vivo* models. *Food And Chemical Toxicology*, 60, 45-51.
105. Dahle, L.K., Hill, E.G., Holman, R.T., (1962). The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Archives of Biochemistry And Biophysics*, 98, 2, 253-261.
106. Dar'ya, S.R., Gütschow, M., Grinstein, S., Canton, J., (2018). Differential ability of proinflammatory and anti-inflammatory macrophages to perform macropinocytosis. *Molecular Biology of the Cell*, 29, 1, 53-65.
107. Delgado, M.E., Haza, A.I., García, A., Morales, P., (2009). Myricetin, quercetin, (+)-catechin and (-)-epicatechin protect against N-nitrosamines-induced DNA damage in human hepatoma cells. *Toxicology In Vitro*, 23, 7, 1292-1297.
108. de Pascual-Teresa, S.C., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C., (2000). Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 48, 11, 5331-5337.
109. de Rijke E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer C., Brinkman U.A.T., (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112, 31-63.
110. Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Boloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., Lele, R.D., (2004). Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. *JAPI*, 52, 10, 794-804.
111. Dhimi, N., Mishra, A.D., (2015). Phytochemical variation: how to resolve the quality controversies of herbal medicinal products?. *Journal of Herbal Medicine*, 5, 2, 118-127.
112. Dhar, P., Dhar, D. G., Rawat, A. K. S., Srivastava, S., (2017). Medicinal chemistry and biological potential of *Cyperus rotundus* Linn.: An overview to discover elite chemotype (s) for industrial use. *Industrial Crops And Products*, 108, 232-247.
113. Didier, D.S., Emmanuel, M.M., Alfred, N., France, K.M., Lagarde, B.J., (2011). Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales de Douala, Cameroun. *Journal of Applied Biosciences*, 37, 2496-2507.

114. Djahra, A.B., Bordjiba, O., Benkherara, S., (2012). Activité antibactérienne des flavonoides d'une plante médicinale spontanée *Marrubium vulgare* L. de la région d'El Tarf (Nord-Est Algérien). Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie, 24, 29-37.
115. Djouahri, A., Boudarene, L., 2012. Antioxidant and anti-inflammatory activity of methanolic, chloroform and ethyl acetate extracts of leaves *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters Algerian. International Journal of Research In Phytochemistry And Pharmacology, 2, 1, 7-11.
116. Djouahri, A., Saka, B., Boudarene, L., Benseradj, F., Aberrane, S., Aitmousa, S., Chelghoum, C., Lamari, L., Sabaou, N., Baaliouamer, A., (2014). *In vitro* synergistic/antagonistic antibacterial and anti-inflammatory effect of various extracts/essential oil from cones of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters with antibiotic and anti-inflammatory agents. Industrial Crops And Products, 56, 60-66.
117. Doat, S., Cénéé, S., Trétarre, B., Rebillard, X., Lamy, P.J., Bringer, J.P., Iborra, F., Murez, T., Sanchez, M., Menegaux, F., (2017). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and prostate cancer risk: results from the EPICAP study. Cancer Medicine, 6, 10, 2461-2470.
118. Dou, J., Lee, V.S., Tzen, J.T., Lee, M.R., (2007). Identification and comparison of phenolic compounds in the preparation of oolong tea manufactured by semifermentation and drying processes. Journal of Agricultural And Food Chemistry, 55, 18, 7462-7468.
119. Duan, X.J., Zhang, W.W., Li, X.M., Wang, B.G., (2006). Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. Food Chemistry, 95, 1, 37-43.
120. Duquesne, S., Petit, V., Peduzzi, J., Rebuffat, S., (2007). Structural and functional diversity of microcins, gene-encoded antibacterial peptides from *enterobacteria*. Journal Of Molecular Microbiology And Biotechnology, 13, 4, 200-209.
121. Dzoyem, J.P., Hamamoto, H., Ngameni, B., Ngadjui, B.T., Sekimizu, K., (2013). Antimicrobial action mechanism of flavonoids from *Dorstenia* species. Drug Discoveries And Therapeutics, 7, 2, 66-72.
- E.**
122. El-Alfy, T.S., El-Gohary, H., Sokkar, N.M., Hosny, M., Al-Mahdy, D.A., (2011). A new flavonoid C-glycoside from *Celtis australis* L. and *Celtis occidentalis* L. leaves and potential antioxidant and cytotoxic activities. Scientia Pharmaceutica, 79, 4, 963-975.
123. El Jemli, M., Kamal, R., Marmouzi, I., Zerrouki, A., Cherrah, Y., Alaoui, K., (2016). Radical-scavenging activity and ferric reducing ability of *Juniperus thurifera* (L.), *J. oxycedrus* (L.), *J. phoenicea* (L.) and *Tetraclinis articulata* (L.). Advances In Pharmacological Sciences, 2016.
124. El-Toumy, S.A., Omara, E.A., Nada, S.A., Bermejo, J., (2011). Flavone C-glycosides from *Montanoa bipinnatifida*

- stems and evaluation of hepatoprotective activity of extract. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 8, 1291-1296.
125. Epifano, F., Genovese, S., Menghini, L., Curini, M., (2007). Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*, 68, 7, 939-953.
- F.**
126. Fair, R.J., Tor, Y., (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21<sup>st</sup> century. Perspectives In Medicinal Chemistry, 6, 25.
127. Fankam, A.G., Kuate, J.R., Kuete, V., (2017). Antibacterial and antibiotic resistance modulatory activities of leaves and bark extracts of *Recinodindron heudelotii* (Euphorbiaceae) against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *BMC Complementary And Alternative Medicine*, 17, 1, 168.
128. Fantini, M., Benvenuto, M., Masuelli, L., Frajese, G.V., Tresoldi, I., Modesti, A., Bei, R., (2015). *In vitro* and *in vivo* antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: perspectives on cancer treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 5, 9236-9282.
129. Fecka, I., (2009). Qualitative and quantitative determination of hydrolysable tannins and other polyphenols in herbal products from meadowsweet and dog rose. *Phytochemical Analysis*, 20, 3, 177-190.
130. Feliachi, K., (2006). Rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture. INRAA.
131. Fern, K., Fern, A, Morris, R., 2016. Useful Tropical Plants Database. Available on line at <http://tropical.theferns.info/> (consulée en janvier 2016).
132. Fernandez, M.T., Mira, M.L., Florencio, M.H., Jennings, K.R., (2002). Iron and copper chelation by flavonoids: An electrospray mass spectrometry study. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 92, 2, 105-111.
133. Fernando, I.S., Nah, J.W., Jeon, Y.J., (2016). Potential anti-inflammatory natural products from marine algae. *Environmental Toxicology And Pharmacology*, 48, 22-30.
134. Ferreres, F., Silva, B.M., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Ferreira, M.A., (2003). Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: Application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). *Phytochemical Analysis*, 14, 6, 352-390.
135. Ferreres, F., Grosso C., Gil-Izquierdo, A., Valentão, P., Azevedo, C., Andrade, P.B., (2014). HPLC-DAD-ESI/MS analysis of phenolic compounds for quality control of *Grindelia robusta* Nutt. and bioactivities. *Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 94, 163-172.
136. Firestein, G.S., McInnes, I.B., (2017). Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity*, 46, 2, 183-196.
137. Flora, S.J., (2009). Structural, chemical and

- biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2, 4, 191-206.
138. Fracassetti, D., Costa, C., Moulay, L., Tomás-Barberán, F.A., (2013). Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). *Food Chemistry*, 139, 1-4, 578-588.
139. Fraga, C.G., (2007). Plant polyphenols: how to translate their *in vitro* antioxidant actions to *in vivo* conditions. *International Union of Biochemistry And Molecular Biology Life*, 59, 4, 5, 308-315.
140. Francisco, V., Figueirinha, A., Costa, G., Liberal, J., Lopes, M.C., García-Rodríguez, C., Geraldes, C.F.G.C., Cruz, M.T., Batista M.T., (2014). Chemical characterization and anti-inflammatory activity of luteolin glycosides isolated from lemongrass. *Journal of Functional Foods*, 10, 436-443.
- G.**
141. Gardi, C., Bauerova, K., Stringa, B., Kuncirova, V., Slovak, L., Ponist, S., Drafi, F., Bezakova, L., Tedesco, I., Acquaviva, A., Bilotto, S., Russo, G.L., (2015). Quercetin reduced inflammation and increased antioxidant defense in rat adjuvant arthritis. *Archives of Biochemistry And Biophysics*, 583, 150-157.
142. Geyid, A., Abebe, D., Debella, A., Makonnen, Z., Aberra F., Teka F., Kebede T., Urga K., Yersaw, K., Biza, T., Mariam, B.H., Guta, M., (2005). Screening of some medicinal plants of Ethiopia for their anti-microbial properties and chemical profiles. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 3, 421-427.
143. Ghedira, K., (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3, 4, 162-169.
144. Girma, S., Giday, M., Erko, B., Mamo, H., (2015). Effect of crude leaf extract of *Osyris quadripartita* on *Plasmodium berghei* in Swiss albino mice. *BMC Complementary And Alternative Medicine*, 15, 1, 184.
145. Gómez, M.E., Ayuso, M.J., Toro, M.V., (1995). Activity of *Osyris quadripartita* salzm. methanol extract on capillary permeability in rats. *Phytotherapy Research*, 9, 7, 528-530.
146. Goupy, P., Dufour, C., Loonis, M., Dangles, O., (2003). Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 51, 3, 615-622.
147. Green, S.J., Meltzer, M.S., Hibbs, J.B., Nacy, C.A. (1990). Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine dependent killing mechanism". *Journal of Immunology*, 144, 1, 278-283.
148. Griess, P. (1879). Bemerkungen zu der abhandlung der hh. Weselsky und benedikt „ueber einige azoverbindungen". *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 12, 1, 426-428.

149. Grollier, G., Le Moal, G., Robert, R., (2004). Infections dues aux bactéries anaérobies de la flore endogène (*Clostridium difficile* et *Actinomyces* exclus). EMC-Maladies Infectieuses, 1, 4, 262-280.
150. Grosser, T., Theken, K.N., Fitz-Gerald, G.A., (2017). Cyclooxygenase inhibition: Pain, inflammation and the cardiovascular system. Clinical Pharmacology And Therapeutics, 102, 4, 611-622.
151. Grotto, D., Maria, L.S., Valentini, J., Paniz, C., Schmitt, G., Garcia, S.C., Pomblum, V.J., Rocha, J.B.T.; Farina, M., (2009). Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. Quimica Nova, 32, 1, 169-174.
152. Guo, Y., Sakulnarmrat, K., Konczaka, I., (2014). Anti-inflammatory potential of native Australian herbs polyphenols. Toxicology Reports, 1, 385-390.
- H.**
153. Halliwell, B., (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. Journal of Neurochemistry, 59, 5, 1609-1623.
154. Halliwell, B., Murcia, M.A., Chirico, S., Aruoma, O.I., (1995). Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: What they do and how they work. Critical Reviews in Food Science And Nutrition, 35, 1, 2, 7-20.
155. Halliwell, B., (2000). The antioxidant paradox. The Lancet, 355, 1179-1180.
156. Halliwell, B., (2003). Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem?. FEBS Letters, 540, 1-3, 3-6.
157. Halliwell, B., (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiology, 141, 2, 312-322.
158. Halliwell, B., (2007). Biochemistry of oxidative stress. Biochemical Society Transactions, 35, 5, 1147-1150.
159. Halliwell, B., (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?. Archives of Biochemistry And Biophysics, 476, 2, 107-112.
160. Halliwell, B., Gutteridge, J.M., (2015). Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford, p. 905.
161. Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., Moilanen, E., (2007). Anti-inflammatory effects of flavonoids: Genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- $\kappa$ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- $\kappa$ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. Mediators of Inflammation, 2007.
162. Hammiche, V., Maiza, K., (2006). Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. Journal of Ethnopharmacology, 105, 3, 358-367.
163. Hanáková, Z., Hošek, J., Kutil, Z., Temml, V., Landa, P., Vaněk, T., Schuster, D., Dall'Acqua, S., Cvačka, J., Polanský, O., Šmejkal, K., (2017). Anti-inflammatory activity of natural geranylated flavonoids:

- Cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitory properties and proteomic analysis. *Journal of Natural Products*, 80, 4, 999-1006.
164. **Hartmann, T.**, (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68, 22, 2831-2846.
165. **Hawas, U.W., Soliman, G.M., El-Kassem, A.L.T., Farrag, A.R.H., Mahmoud, K., León, F.**, (2013). A new flavonoid C-glycoside from *Solanum elaeagnifolium* with hepatoprotective and curative activities against paracetamol-induced liver injury in mice. *Z Naturforsch*, 68, 19-28.
166. **Hayder, N., Skandrani, I., Kilani, S., Bouhlel, I., Abdelwahed, A., Ben Ammar R., Mahmoud, A., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L.**, (2008a). Antimutagenic activity of *Myrtus communis* L. using the *Salmonella* microsome assay. *South African Journal of Botany*, 74,1, 121-125.
167. **Hayder, N., Bouhlel, I., Skandrani, I., Kadri, M., Steiman, R., Guiraud, P., Mariotte, A.M., Ghedira, K., Dijoux-Franca, M.G., Chekir-Ghedira, L.**, (2008b). *In vitro* antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-*O*-galactoside and myricetin-3-*O*-rhamnoside from *Myrtus communis*: Modulation of expression of genes involved in cell defense system using cDNA microarray. *Toxicology In Vitro*, 22, 3, 567-581.
168. **Haza, A.I., Morales, P.**, (2011). Effects of (+)-catechin and (-)-epicatechin on heterocyclic amines-induced oxidative DNA damage. *Journal of Applied Toxicology*, 31, 1, 53-62.
169. **Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J.**, (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 10, 572-584.
170. **Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F.**, (2007). Plantes sédatives: Évaluation pharmacologique et clinique. *Médecine du Sommeil*, 4, 13, 4-14.
171. **Herzi, N., Bouajila, J., Camy, S., Romdhane, M., Condoret, J.S.**, (2013a). Comparison of different methods for extraction from *Tetraclinis articulata*: Yield, chemical composition and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 141, 4, 3537-3545.
172. **Herzi, N., Camy, S., Bouajila, J., Destrac, P., Romdhane, M., Condoret, J.S.**, (2013b). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Tetraclinis articulata*: Chemical composition, antioxidant activity and mathematical modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, 82, 72-82.
173. **Heywood, V.H.**, (2011). Ethnopharmacology, food production, nutrition and biodiversity conservation: Towards a sustainable future for indigenous peoples. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 1, 1-15.
174. **Hollman, P.C. H., Katan, M.B.**, (1997). Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 51, 8, 305-310.

175. Holser, R.A., (2012). Principal Component Analysis of Phenolic Acid Spectra. *ISRN Spectroscopy*, 2012, 493-497.
176. Hu, H.B., Fan, J., (2008). Structural identification and antibacterial activity of chemical constituents of *Acanthopanax brachypus* Harms. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 28, 1344-1347.
177. Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 53, 6, 1841-1856.
178. Huang, Q., Liu, X., Zhao, G., Hu, T., Wang, Y., (2017). Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. *Animal Nutrition*, 2018, in press.
- I.**
179. Ighodaro, O.M., Akinloye, O.A., (2017). First line defense antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defense grid. *Alexandria Journal of Medicine*.
180. Iloki-Assanga, S.B., Lewis-Luján, L.M., Lara-Espinoza, C.L., Gil-Salido, A.A., Fernandez-Angulo, D., Rubio-Pino, J.L., Haines, D.D., (2015). Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*. *BioMed Central (BMC) Research Notes*, 8, 1, 396.
181. Iwashina, T., López-Saéz, J.A., Kitajima, J., (2008). Flavonoids from *Osyris alba*. *Biochemical Systematics And Ecology Journal*, 36, 146-147.
- J.**
182. Jadot, G., (1994). Antioxydants et vieillissement. *John Libbey Eurotext*, Paris, p. 300.
183. Javadi, B., Sahebkar, A., (2017). Natural products with anti-inflammatory and immunomodulatory activities against autoimmune myocarditis. *Pharmacological Research*, 124, 34-42.
184. Jayaweera, J.A.A.S., Kumbukgolla, W.W., (2017). Antibiotic resistance patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from livestock and associated farmers in Anuradhapura, Sri Lanka. *Germs*, 7, 3, 132.
185. Jiang, W., Qu, H.Q., Yuan, D.H., Yang, G.D., An, F., Wang, S.H., (2012). Protection of orientin and vitexin from flowers and flower buds of *Trollius chinensis* on brain injury in aging mice induced by D-galactose. *Chinese Traditional And Herbal Drugs*, 43, 1376-1380.
186. Jokar, N.K., Noorhosseini, S.A., Allahyari, M.S., Damalas, C.A., (2017). Consumers' acceptance of medicinal herbs: an application of the technology acceptance model (TAM). *Journal of Ethnopharmacology*, 207, 203-210.
187. Jung, I.H., Lee, H.E., Park, S.J., Ahn, Y.J., Kwon, G., Woob, H., Lee, S.Y., Kim, J.S., Jo, Y.W., Jang, D.S., Kang, S.S., Ryu, J.H., (2014). Ameliorating effect of spinosin, a C-glycoside flavonoid, on scopolamine-induced memory

- impairment in mice. *Pharmacology Biochemistry And Behavior*, 120, 88-94.
- K.**
188. Kajdžanoska, M., Gjamovski, V., Stefova, M., (2010). HPLC-DAD-ESI-MSn identification of phenolic compounds in cultivated strawberries from Macedonia. *Macedonian Journal of Chemistry And Chemical Engineering*, 29, 2, 181-194.
189. Kampa, M., Hatzoglou, A., Notas, G., Damianaki, A., Bakogeorgou, E., Gemetzi, C., Kouroumalis, E., Martin, P., Castanas, E., (2000). Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutrition And Cancer*, 37, 2, 223-233.
190. Kanadaswami, C., Lee, L.T., Lee, P.P.H., Hwang, J.J., Ke, F.C., Huang, Y.T., Lee, M.T., (2005). The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo (Brooklyn)*, 19, 5, 895-909.
191. Kato, S., Aoshima, H., Saitoh, Y., Miwa, N., (2009). Highly hydroxylated or  $\alpha$ -cyclodextrin-bicapped water-soluble derivative of fullerene: The antioxidant ability assessed by electron spin resonance method and  $\beta$ -carotene bleaching assay. *Bioorganic And Medicinal Chemistry Letters*, 19, 18, 5293-5296.
192. Kaur, M., Agarwal, C., Agarwal, R., (2009). Anticancer and cancer chemopreventive potential of grape seed extract and other grape-based products. *The Journal of Nutrition*, 139, 9, 1806-1812.
193. Khan, I., Paul, S., Jakhar, R., Bhardwaj, M., Han, J., Kang, S.C., (2016). Novel quercetin derivative TEF induces ER stress and mitochondria-mediated apoptosis in human colon cancer HCT-116 cells. *Biomedicine And Pharmacotherapy*, 84, 789-799.
194. Khanduja, K.L., Gandhi, R.K., Pathania, V., Syal, N., (1999). Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. *Food And Chemical Toxicology*, 37, 4, 313-318.
195. Khiralla, A., Mohamed, I., Thomas, J., Mignard, B., Spina, R., Yagi, S., Laurain-Mattar, D.A., (2015). A pilot study of antioxidant potential of endophytic fungi from some Sudanese medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8, 9, 701-704.
196. Khoddami, A., Wilkes, M.A., Roberts, T.H., (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18, 2328-2375.
197. Kim, H.J., Woo, E.R., Shin, C.G., Park, H., (1998). A new flavonol glycoside gallate ester from *Acer okamotoanum* and its inhibitory activity against Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) integrase. *Journal of Natural Products*, 61, 145-148.
198. Kim, H.K., Jeon, W.K., Ko, B.S., (2001). Flavanone glycosides from *Citrus junos* and their anti-influenza virus activity. *Planta Medica*, 67, 548-549.
199. Kim, I., Chin, Y.W., Lim, S.W., Kim, Y.C., Kim, J., (2004). Norisoprenoids and hepatoprotective flavone glycosides from the aerial parts

- of *Beta vulgaris* var. cicla. Archives of Pharmacal Research, 27, 6, 600-603.
200. Kim, Y.K., Kim, Y.S., Choi, S.U., Ryu, S.Y., (2004). Isolation of flavonol rhamnosides from *Loranthus tanakae* and cytotoxic effect of them on human tumor cell lines. Archives of Pharmacal Research, 27, 1, 44-47.
201. Kirschweng, B., Tátraaljai, D., Földes, E., Pukánszky, B., (2017). Natural antioxidants as stabilizers for polymers. Polymer Degradation And Stability, 145, 25-40.
202. Klimaszewska-Wiśniewska, A., Hałas-Wiśniewska, M., Izdebska, M., Gagat, M., Grzanka, A., Grzanka, D., (2017). Antiproliferative and antimetastatic action of quercetin on A549 non-small cell lung cancer cells through its effect on the cytoskeleton. Acta Histochemica, 119, 2, 99-112.
203. Koleva, I.I., van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., de Groot, A., Evstatieva, L.N., (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. Phytochemical Analysis 13, 1, 8-17.
204. Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R., (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food And Bioproducts Processing, 89, 3, 217-233.
205. Kuete, V., Ango, P.Y., Fotso, G.W., Kapche, G.D., Dzoyem, J.P., Wouking, A.G., Ngadjui B.T., Abegaz, B.M., (2011). Antimicrobial activities of the methanol extract and compounds from *Artocarpus communis* (Moraceae). BMC Complementary And Alternative Medicine, 11, 1, 42.
206. Kulkarni, A.P., Aradhya, S.M., Divakar, S., (2004). Isolation and identification of radical scavenging antioxidant-punicalagin from the pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. Food Chemistry, 87, 4, 551-557.
207. Kumar, S., (2011). Free radicals and antioxidants: human and food system. Advances In Applied Science Research, 2, 1, 129-135.
208. Kumara, N.T.R.N., Lim, A., Lim, C.M., Petra, M.I., Ekanayake, P., (2017). Recent progress and utilization of natural pigments in dye sensitized solar cells: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 78, 301-317.
209. Kunwar, R.M., Adhikari, N., (2005). Ethnomedicine of Dolpa district, Nepal: the plants, their vernacular names and uses. Lyonia, 8, 1, 43-49.
210. Kuroda, Y., (1996). Bio-antimutagenic activity of green tea catechins in cultured Chinese hamster V79 cells. Mutation Research/Environmental Mutagenesis And Related Subjects, 361, 2, 3, 179-186.
211. Kwon, Y.S., Kim, S.S., Sohn, S.J., Kong, P.J., Cheong, I.Y., Kim, C.M., Chun, W., (2004). Modulation of suppressive activity of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by glycosidation of flavonoids. Archives of pharmacal research, 27, 7, 751-756.
- L.**
212. Laguerre, M., López-Giraldo, L.J., Lecomte, J., Pina, M., Villeneuve, P., (2007). Outils

- d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 14,5, 278-292.
213. Lahsissene, H., Kahouadji, A., Hseini, S., (2009). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc Occidental). *Lejeunia, Revue de Botanique*, 1-26.
214. Lai, C.Y., Pan, S.L., Chen, C.C., Teng, C.M., (2011). Aciculatin, a C-glycosidic flavonoid, induces p53-dependent cell cycle arrest and apoptosis in HCT116 colorectal cancer cells. *FASEB Journal*, 25, 621-627.
215. Lai, C.Y., Tsai, A.C., Chen, M.C., Chang, L.H., Sun, H.L., Chang, Y.L., Chen, C.C., Teng, C. M., Pa, S.L., (2012). Aciculatin induces p53-dependent apoptosis via MDM2 depletion in human cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *PLoS ONE*, 7, 8, 42192.
216. Le Floch, R., Naux, E., Arnould, J. F., (2015). L'infection bactérienne chez le patient brûlé. *Annals of Burns And Fire Disasters*, 28, 2, 94.
217. Leonoudakis, D., Rane, A., Angeli, S., Lithgow, G.J., Andersen, J.K., Chinta, S.J., (2017). Anti-Inflammatory and neuroprotective role of natural product securinine in activated glial cells: Implications for Parkinson's disease. *Mediators of Inflammation*, 2017, 1-11.
218. Li, H., Song, F., Xing, J., Tsao, R., Liu, Z., Liu, S., (2009). Screening and structural characterization of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from hawthorn leaf flavonoids extract by ultrafiltration LC-DAD-MSn and SORI-CID FTICR MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20, 8, 1496-1503.
219. Li, S.H., Zhao, Q., Cheng, Y., Liu, F., (2013). Antimicrobial activities of vitexin from *Alsophila spinulosa*. *Food Research And Development*, 34, 14, 4-6.
220. Li, J., Xin, Z., Zhang, Y., Chen, J., Yan, J., Li, H., Hu, H., (2017). Long-term manure application increased the levels of antibiotics and antibiotic resistance genes in a greenhouse soil. *Applied Soil Ecology*, 121, 193-200.
221. Li, K.K., Peng, J.M., Zhu, W., Cheng, B.H., Li, C.M., (2017). Gallocatechin gallate (GCG) inhibits 3T3-L1 differentiation and lipopolysaccharide induced inflammation through MAPK and NF- $\kappa$ B signaling. *Journal of Functional Foods*, 30, 159-167.
222. Liao, W., Ning, Z., Chen, L., Wei, Q., Yuan, E., Yang, J., and Ren, J., (2014). Intracellular antioxidant detoxifying effects of diosmetin on 2,2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidative stress through inhibition of reactive oxygen species generation. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 62, 34, 8648-8654.
223. Liberal, J., Costa, G., Carmo, A., Vitorino, R., Marques, C., Domingues, M.R., Domingues, P., Goncalves, A.C., Alves, R., Sarmiento-Ribeiro, A.B., (2015). Chemical characterization and cytotoxic potential of an ellagitannin-enriched fraction from *Fragaria vesca* leaves. *Arabian Journal of Chemistry*.
224. Lin, C.N., Kuo, S.H., Chung, M.I., (1997). A new flavone C-

- glycoside and antiplatelet and vasorelaxing flavones from *Gentiana arisanensis*. *Journal of Natural Products*, 60, 8, 851-853.
225. Lodovici, M., Guglielmi, F., Casalini, C., Meoni, M., Cheynier, V., Dolara, P., (2001). Antioxidant and radical scavenging properties *in vitro* of polyphenolic extracts from red wine. *European Journal of Nutrition*, 40, 2, 74-77.
226. Losada-Barreiro, S., Bravo-Díaz, C., (2017). Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 133, 379-402.
227. Lü, J.M., Lin, P.H., Yao, Q., Chen, C., (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular And Molecular Medicine*, 14, 4, 840-860.
228. Luo, C.I., Liu, Y.Q., Wang, P., Song, C.H., Wang, K.J., Dai, L.P., Zhang J.Y., Ye, H., (2016). The effect of quercetin nanoparticle on cervical cancer progression by inducing apoptosis, autophagy and anti-proliferation via JAK2 suppression. *Biomedicine And Pharmacotherapy*, 82, 595-605.
229. Lutge, U., Kluge, M., Bauer, G., (2002). *Botanique: Technique et documentation*. Lavoisier, Paris, 3, p. 211.
- M.**
230. Ma, S.C., But, P.P.H., Ooi, V.E.C., He, YH., Lee, S.H.S., Lee, S.F., Lin, R.C.H., (2001). Antiviral amentoflavone from *Selaginella sinensis*. *Biological And Pharmaceutical Bulletin*, 24, 311-2.
231. MacGowan, A., Macnaughton, E., (2017). Antibiotic resistance. *Medicine*, 45, 10, 622-628.
232. Macheix, J.J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR Presses polytechniques, Lausanne, p. 192 .
233. Magalhães, L., Segundo, M., Reis, S. Lima-Jose, L.F.C., (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta.*, 613, 1-19.
234. Magwaza, L.S., Opara, U.L., Cronje, P.J., Landahl, S., Ortiz, J.O., Terry, L.A., (2016). Rapid methods for extracting and quantifying phenolic compounds in *Citrus rinds*. *Food Science And Nutrition*, 4, 1, 4-10.
235. Malik, J., Tauchen, J., Landa, P., Kutil, Z., Marsik, P., Kloucek, P., Havlik J., Kokoska, L., (2017). *In vitro* antiinflammatory and antioxidant potential of root extracts from Ranunculaceae species. *South African Journal of Botany*, 109, 128-137.
236. Marinovic, M.P., Morandi, A.C., Otton, R., (2015). Green tea catechins alone or in combination alter functional parameters of human neutrophils via suppressing the activation of TLR-4/NFκB p65 signal pathway. *Toxicology In Vitro*, 29, 7, 1766-1778.
237. Marouf, A., et Reynaud, J., (2007). *La botanique de A à Z*. Dunod, Paris, p.177.
238. Martini, N.D., Katerere, D.R., Eloff, J.N., Jäger, A.K., Van-Staden, J., (2004). Seven flavonoids with antibacterial

- activity isolated from *Combretum erythrophyllum*. South African Journal of Botany, 70, 2, 310-312.
239. Martins, N., Barros, L., Henriques, M., Silva, S., Ferreira, I.C.F.R., (2015). *In vivo* anti-Candida activity of phenolic extracts and compounds: future perspectives focusing effective clinical interventions. BioMed Research International, 2015.
240. Martins, N., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., (2016). *In vivo* antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. Trends in Food Science And Technology, 48, 1-12.
241. Masevhe, N.A., McGaw, L.J., Eloff, J.N., (2015). The traditional use of plants to manage candidiasis and related infections in Venda, South Africa. Journal of Ethnopharmacology, 168, 364-372.
242. Máthé, Á., (2015). Medicinal and aromatic plants of the world: Scientific, production, commercial and utilization aspects. Springer, New York, p. 1-5.
243. Matsumura, E., Matsuda, M., Sato, F., Minami, H., Ramawat, K.G., Mérillon, J.M., (2013). Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes. Springer-Verlag, Berlin.
244. Meng, D., Zhang, P., Zhang, L., Wang, H., Ho, C.T., Li, S., Shahidi F., Zhao, H., (2017). Detection of cellular redox reactions and antioxidant activity assays. Journal of Functional Foods, 37, 467-479.
245. Mert, T., Fafal, T., Kivçak, B., Öztürk, H.T., (2008). Antimicrobial and cytotoxic activities of *Myrtus communis* L. Journal of the Faculty of Pharmacy of Ankara University, 37, 3, 191-199.
246. Merzouki, A., Ed-Derfoufi, F., Molero-Mesa, J., (2000). Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. II. Folk medicine in Ksar Lakbir district (NW Morocco). Fitoterapia, 71, 3, 278-307.
247. Messaoud, C., Laabidi, A., Boussaid, M., (2012). *Myrtus communis* L. infusions: The effect of infusion time on phytochemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. Journal of Food Science, 77, 9, 941-947.
248. Middleton, E., Kandaswami, C., (1992). Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. Biochemical Pharmacology, 43, 6, 1167-1179.
249. Michel, F., Bonnefont-Rousselot, D., Mas, E., Draï, J., Théron, P., (2008). Biomarkers of lipid peroxidation: Analytical aspects. Annales de Biologie Clinique, 66, 6, 605-620.
250. Modaressi, M., Shahsavari, R., Ahmadi, F., Rahimi-Nasrabadi, M., Abiri, R., Mikaeli, A., Batoli, H., (2013). The evaluation of antibacterial, antifungal and antioxidant activity of methanolic extract of *Mindium Laevigatum* (Vent.) Rech. F., from central part of Iran. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, 8, 1, 34.
251. Moein, S., (2015). Polyphenols and cancer: A review. Molecular Medicine Journal, 1, 1, 6-12.
252. Montoro, P., Braca, A., Pizza, C., De Tommasi, N., (2005).

- Structure-antioxydant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chemistry*, 92, 2, 349-355.
253. Munné-Bosch, S., Pintó-Marijuan, M., (2017). Free radicals, oxidative stress and antioxidants. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 2, 16-19.
254. Murakami, Y., Kawata, A., Ito, S., Katayama, T., Fujisawa, S., (2015). Radical-scavenging and anti-inflammatory activity of quercetin and related compounds and their combinations against RAW264.7 cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. Relationships between anti-inflammatory activity and quantum chemical Parameters. *In Vivo*, 29, 6, 701-710.
- N.**
255. Nenadis, N., Wang, L.F., Tsimidou, M., Zhang, H.Y., 2004. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS+ assay. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 52, 15, 4669-4674.
256. Novy, P., Urban, J., Leuner, O., Vadlejch, J., Kokoska, L., (2011). *In vitro* synergistic effects of baicalin with oxytetracycline and tetracycline against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 6, 1298-1300.
- O.**
257. Obmann, A., Tsendayush, D., Thalhammer, T., Zehl, M., Vo, T.P.N., Purevsuren, S., Natsagdorj, D., Narantuya, S., Kletter, C., Glasl, S., (2010). Extracts from the Mongolian traditional medicinal plants *Dianthus versicolor* Fisch. And *Lilium pumilum* Delile stimulate bile flow in an isolated perfused rat liver model. *Journal of Ethnopharmacology*, 131, 3, 555-561.
258. Odontuya, G., Hoult, J.R.S., Houghton, P.J., (2005). Structure-activity relationship for anti-inflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. *Phytotherapy Research*, 19, 9, 782-786.
259. O.M.S. (Organisation Mondiale De la santé), (2002). Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. Genève, p. 78.
260. O.M.S., (2013). Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014-2023. Genève, p. 75.
261. Ooko, E.A.O., (2009). Evaluation of anti-microbial activity of *Osyris lanceolata* (East African Sandalwood). In: Muchiri, M.N., Kamondo, B., Ochieng, D., Tuwei, P. and Wanjiku, J. Recent advances in forestry research for environmental conservation, improved livelihood and economic development. Proceedings of the 4th KEFRI Scientific Conference, KEFRI Headquarters, Muguga, Kenya, 6 to 9 October 2008, 166-171.
262. Osman, A.M., (2011). Multiple pathways of the reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) with (+)-catechin: Evidence for the formation of a covalent adduct between DPPH and the oxidized form of the polyphenol. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 412, 3, 473-478.
263. Özçelik, B., Orhan, D.D., Özgen, S., Ergun, F., (2008). Antimicrobial activity of flavonoids against extended-

- spectrum  $\beta$ -lactamase (ES $\beta$ L)-producing *Klebsiella pneumoniae*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 7, 4, 1151-1157.
264. Ozenda P., (1958). Flore du Sahara. CNRS, Paris.
265. Ozgen, S., Kilinc, O.K., Selamoğlu, Z., (2016). Antioxidant activity of quercetin: A mechanistic review. Turkish Journal of Agriculture-Food Science And Technology, 4, 12, 1134-1138.
266. Ozsoy, N., Can, A., Yanardag, R., Akev, N., (2008). Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. Food Chemistry, 110, 571-583.
- P.**
267. Pacifico, S., Galasso, S., Piccolella, S., Kretschmer, N., Pan, S.P., Nocera, P., Lettieri, A., Bauer, R., Monaco, P., (2015). Winter wild fennel leaves as a source of anti-inflammatory and antioxidant polyphenols. Arabian Journal of Chemistry, 1-12.
268. Park, S.H., Kim, J.H., Lee, D.H., Kang, J.W., Song, H.H., Oh, S.R., Yoon, D.Y., (2013). Luteolin 8-C- $\beta$ -fucopyranoside inhibits invasion and suppresses TPA-induced MMP-9 and IL-8 via ERK/AP-1 and ERK/NF-kB signaling in MCF-7 breast cancer cells. Biochimie, 95, 11, 2082-90.
269. Paudel, P.N., Gyawali, R., (2014). Phytochemical screening and antimicrobial activities of some selected medicinal plants of Nepal. International Journal of Pharmaceutical And Biological Archives, 5, 3, 84-92.
270. Pereira, P., Cebola, M.J., Oliveira, M.C., Bernardo-Gil, M.G., (2016). Supercritical fluid extraction vs conventional extraction of myrtle leaves and berries: Comparison of antioxidant activity and identification of bioactive compounds. The Journal of Supercritical Fluids, 113, 1-9.
271. Peng, X.F., Zheng, Z.P., Cheng, K.W., Shan, F., Ren, G.X., Chen, F., Wang, M., (2008). Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation end products. Food Chemistry, 106, 475-481.
272. Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C., (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. International Journal of Biomedical Science: IJBS, 4, 2, 89-96.
273. Piccinelli, A.L., García Mesa, M., Armenteros, D.M., Alfonso, M.A., Arevalo, A.C., Campone, L., Rastrelli, L., (2008). HPLC-PDA-MS and NMR characterization of C-glycosyl flavones in a hydroalcoholic extract of *Citrus aurantifolia* leaves with antiplatelet activity. Journal of Agricultural And Food Chemistry, 56, 5, 1574-1581.
274. Pietta, P.G., (2000). Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products, 63, 7, 1035-1042.
275. Piwowarski, J.P., Granica, S., Zwierzyńska, M., Stefańska, J., Schopohl, P., Melzig, M.F., Kiss, A.K., (2014). Role of human gut microbiota metabolism in the anti-inflammatory effect of traditionally used ellagitannin-rich plant materials. Journal of Ethnopharmacology, 155, 1, 801-809.
276. Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino,

- F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A., (2017). Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2017.
277. Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Solmajer, T., Jerala, R., (2003). Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 306, 2, 530-536.
278. Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M.H., (2001). *Antioxidants in food: Practical applications*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, New York, p. 108-109.
279. Polunin, O., Huxley, A., (1971). *Fleurs du Bassin méditerranéen*. Fernand Nathan, Paris.
280. Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., Valko, M., (2017). Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends In Pharmacological Sciences*, 38, 7, 592-607.
- Q.**
281. Qiao, M., Ying, G.G., Singer, A.C., Zhu, Y.G., 2018. Review of antibiotic resistance in China and its environment. *Environment International*, 110, 160-172
282. Quezel, P., Santa, S., (1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. CNRS, Paris.
- R.**
283. Rached, W., Benamar, H., Bennaceur, M., Marouf, A., (2010). Screening of the antioxidant potential of some Algerian indigenous plants. *Journal of Biological Sciences*, 10, 316-324.
284. Rached, W., Calhelha, R.C., Fernandes, A., Carvalho, A.M., Bennaceur, M., Marouf, A., Barros, L., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., (2016). Phytochemical characterization and bioactive properties of *Osyris quadripartita* Salzm. ex Decne. leaves from Algeria. *RSC Advances*, 6, 76, 72768-72776.
285. Rached, W., Bennaceur, M., Barros, L., Calhelha, R.C., Heleno, S.A., Alves, M.J., Carvalho, A.M., Marouf, A., Ferreira, I.C.F.R., (2017). Detailed phytochemical characterization and bioactive properties of *Myrtus nivellii* Batt & Trab. *Food And Function*, 8, 9, 3111-3119.
286. Raghu, R., Lu, K.H., Sheen, L.Y., (2012). Recent Research Progress on Garlic (大蒜 dà suàn) as a potential anticarcinogenic agent against major digestive cancers. *Journal of Traditional And Complementary Medicine*, 2, 3, 192-201.
287. Rahman, K., (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions In Aging*, 2, 2, 219.
288. Ramdane, F., Mahammed, M.H., Ould Hadj, M.D., Chanai, A., Hammoudi, R., Hillali, N., Mesrouk, H., Bouafia, I., Bahaz, C., (2015). Ethnobotanical study of some medicinal plants from Hoggar, Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9, 820-827.
289. Ramos, F.A., Takaishi, Y., Shirotori, M., Kawaguchi, Y., Tsuchiya, K., Shibata, H., Higuti, T., Tadokoro, T., Takeuchi, M., (2006). Antibacterial and

- antioxidant activities of quercetin oxidation products from yellow onion (*Allium cepa*) skin. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 54, 10, 3551-3557.
290. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology And Medicine*, 20, 7, 933-956.
291. Rodgers, E.H., Grant, M.H., (1998). The effect of the flavonoids, quercetin, myricetin and epicatechin on the growth and enzyme activities of MCF7 human breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, 116, 3, 213-228.
292. Rodrigues, R.A.F., Carvalho, J.E.D., Sousa, I.M.D.O., Antônio, M.A., Pizão, P.E., Kohn, L.K., Amaral, M.C.E., Bittrich, V., Foglio, M.A., (2011). Antiproliferative activity, isolation and identification of active compound from *Gaylussacia brasiliensis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21, 4, 622-626.
293. Roginsky, V., Lissi, E.A., (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92, 2, 235-254.
294. Romani, A., Pinelli, P., Mulinacci, N., Vincieri, F.F., Tattini, M., (1999). Identification and quantification of polyphenol in leaves of *Myrtus communis*. *Chromatographia*, 49, 1, 17-20.
295. Romani, A., Coinu, R., Carta, S., Pinelli, P., Galardi, C., Vincieria, F.F., Franconi, F., (2004). Evaluation of antioxidant effect of different extracts of *Myrtus communis* L. *Free Radical Research*, 38, 1, 97-103.
296. Romani, A., Campo, M., Pinelli, P., (2012). HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical activity of hydrolyzable tannins from different vegetal species. *Food Chemistry*, 130, 1, 241-221.
297. Roosta, R.A., Moghaddasi, R., Hosseini, S.S., (2017). Export target markets of medicinal and aromatic plants. *Journal of Applied Research on Medicinal And Aromatic Plants*, 7, 84-88.
298. Russo, G.L., Tedesco, I., Spagnuolo, C., Russo, M., (2017). Antioxidant polyphenols in cancer treatment: Friend, foe or foil?. In *Seminars In Cancer Biology*, Academic Press.
- S**
299. Saeidnia, S., Abdollahi, M., (2013). Antioxidants: Friends or foe in prevention or treatment of cancer: The debate of the century. *Toxicology And Applied Pharmacology*, 271, 1, 49-63.
300. Sahki, A., Sahki, R., (2004). *Le Hoggar: Promenade botanique*. Atelier Ésope. Chamonix, p. 110.
301. Sala, A., Recio, M.C., Schinella, G.R., Máñez, S., Giner, R. M., Cerdá-Nicolás, M., Ríos, J.L., (2003). Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *European Journal of Pharmacology*, 461, 1, 53-61.
302. Salah, N., Miller, N.J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G.P., Rice-Evans, C., (1995). Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of*

- Biochemistry And Biophysics, 322, 2, 339-346.
303. Salminen, J.P., (2003). Effects of sample drying and storage, and choice of extraction solvent and analysis method on the yield of birch leaf hydrolyzable tannins. *Journal of Chemical Ecology*, 29, 6, 1289-1305.
304. Santos, S.A.O., Freire, C., S.R., Domingues, M.R.M., Silvestre, A.J.D., Neto, C.P., (2011). Characterization of phenolic components in polar extracts of *Eucalyptus globulus* Labill. bark by High-Performance Liquid ChromatographyMass Spectrometry. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 59, 9386-9393.
305. Santos-Buelga, C., Scalbert, A., (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds—nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food And Agriculture*, 80, 7, 1094-1117.
306. Santos-Buelga, C., García-Viguera, C., Tomás-Barberán, F.A., (2003). On-line identification of flavonoids by HPLC coupled to diode array detection. In: *Methods in polyphenol analysis*. Santos-Buelga, C., Williamson, G. Eds. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, p. 92-127.
307. Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M., (2014). Strategies in the analysis of flavonoids. In *Handbook of chemical and biological plant analytical methods*. Hostettmann, K., Stuppner, H., Marston A., Chen, S., Eds., John Wiley and Sons, Ltd., 1<sup>st</sup> ed., p. 543-568.
308. Sanz, M., Cadahia, E., Esteruelas, E., Muñoz, A.M., Simon, B.F., Hernandez, T., Estrella, I., (2010). Phenolic compounds in chestnut (*Castanea sativa* Mill.) heartwood. Effect of toasting at cooperage. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 58, 17, 9631-9640.
309. Sarangarajan, R., Meera, S., Rukkumani, R., Sankar, P., Anuradha, G., (2017). Antioxidants: Friend or foe?. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 1-6
310. Seabrooks, L., Hu, L., (2017). Insects: an underrepresented resource for the discovery of biologically active natural products. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7, 4, 409-426.
311. Seigue, A, (1985). La forêt circumméditerranéenne et ses problèmes [The circum-Mediterranean forest and its problems]. In: “Techniques agricoles et productions méditerranéennes (Coste R ed). Maisonneuve et Larose, Paris, 5, p. 230-232.
312. Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y.S.R., De, B., (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review And Research*, 3, 1, 91-100.
313. Serafini, M., Peluso, I., Raguzzini, A., (2010). Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69,3, 273-278.
314. Shahidi, F., Zhong, Y., (2005). Lipid oxidation:

- Measurement methods. *Bailey's Industrial Oil And Fat Products*, 2005, 6, 7.
315. Shang, X., Tao, C., Miao, X., Wang, D., Wang, Y., Yang, Y., Pan, H., (2012). Ethno-veterinary survey of medicinal plants in Ruoergai region, Sichuan province, China. *Journal of Ethnopharmacology*, 142, 2, 390-400.
316. Shen, S.C., Lee, W.R., Lin, H.Y., Huang, H.C., Ko, C.H., Yang, L.L., Chen, Y.C., (2002). *In vitro* and *in vivo* inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E2 production. *European Journal of Pharmacology*, 446, 1, 3, 187-194.
317. Shibano, M., Kakutani, K., Taniguchi, M., Yasuda, M., Baba, K., (2008). Antioxidant constituents in the dayflower (*Commelina communis* L.) and their  $\alpha$ -glucosidase-inhibitory activity. *Journal of Natural Medicines*, 62, 3, 349.
318. Shikov, A.N., Pozharitskaya, O.N., Makarov, V.G., Wagner, H., Verpoorte, R., Heinrich, M., (2014). Medicinal plants of the Russian pharmacopoeia; their history and applications. *Journal of Ethnopharmacology*, 154, 3, 481-536.
319. Shin, J.S., Hong, Y., Lee, H.H., Ryu, B., Cho, Y.W., Kim, N.J., Jang, D.S., Lee, K.T., (2015). Fulgidic acid isolated from the rhizomes of *Cyperus rotundus* suppresses LPS-Induced iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , and IL-6 expression by AP-1 inactivation in RAW264.7 macrophages. *Biological And Pharmaceutical Bulletin*, 38, 7, 1081-1086.
320. Shinmoto, H., Dosako, S., Nakajima, I., (1992). Antioxidant activity of bovine lactoferrin on iron/ascorbate induce lipid peroxidation. *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry*, 56, 12, 2079-2080.
321. Shyaula, S.L., Manandhar, M.D., Choudhary, M., (2013). Lignans from the Nepalese sandal wood *Osyris wightiana* Wall ex Wight. *Journal of Nepal Chemical Society*, 28, 24-28.
322. Si, W., Chen, Y.P., Zhang, J., Chen, Z.Y., Chung, H.Y., (2018). Antioxidant activities of ginger extract and its constituents toward lipids. *Food Chemistry*, 239, 1117-1125.
323. Singh, D.H., Batish, D. et Kohli, R.K., (2005). *Handbook of sustainable weed management*. Haworth Press, Binghamton, New York, p. 721.
324. Singh, R., Singh, S., Kumar, S., Arora, S., (2007). Evaluation of antioxidant potential of ethyl acetate extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. *Food And Chemical Toxicology*, 45, 7, 1216-1223.
325. Singh, A., Zhao, K., (2017). Herb-drug interactions of commonly used Chinese medicinal herbs. *International Review of Neurobiology*, Academic Press, 197-232.
326. Singh, B., Kaur, A., (2018). Control of insect pests in crop plants and stored food grains using plant saponins: A review. *LWT-Food Science And Technology*, 87, 93-101.
327. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T.,

- Bokesch, H., Kenney S., Boyd M.R., (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 82, 13, 1107-1112.
328. Sofowora, A., 2010. *Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique*. Karthala, Amazon, France p. 5-29.
329. Soto, C., Recoba, R., Barron, H, Alvarez, C., Favari, L., (2003). Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. *Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology And Pharmacology*, 136, 3, 205-212.
330. Spichiger, R.E., Savolainen, V.V., Figeat, M., Jeanmonod, D., (2002). *Botanique systématique des plantes à fleurs: une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales*. PPUR presses polytechniques, , Lausanne, 3 ed., p. 413.
331. Sporn, M.B., (1976). Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Research*, 36, 7, 2, 2699-2702.
332. Srinivasan, R., Natarajan, D., Shivakumar, M.S., (2015). Antioxidant compound quercetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucose (rutin) isolated from ethyl acetate leaf extracts of *Memecylon edule* Roxb (Melastamataceae). *Free Radicals And Antioxidants*, 5, 1, 35-42.
- T.**
333. Taddese, S., Asres, K., Gebre-Mariam, T., (2003). *In vitro* antimicrobial activities of some selected topically applied medicinal plants of Ethiopia. *Ethiopia Pharmcology Journal*, 21, 39-46.
334. Taguri, T., Tanaka, T., Kouno, I., (2004). Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological And Pharmaceutical Bulletin*, 27, 12, 1965-1969.
335. Tak, P.P., Firestein, G.S., (2001). NF- $\kappa$ B: A key role in inflammatory diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 107, 1, 7-11.
336. Tao, J., Wei, Y., Hu, T., (2016). Flavonoids of *Polygonum hydropiper* L. attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory injury via suppressing phosphorylation in MAPKs pathways. *BMC Complementary And Alternative Medicine*, 16, 1, 25.
337. Taofiq, O., Calhelha, R.C., Heleno, S., Barros, L., Martins, A., Santos-Buelga, C., Queiroz M.J.R.P., Ferreira, I.C.F.R., (2015). The contribution of phenolic acids to the anti-inflammatory activity of mushrooms: Screening in phenolic extracts, individual parent molecules and synthesized glucuronated and methylated derivatives. *Food Research International*, 76, 821-827.
338. Taofiq, O., Martins, A., Barreiro, M.F., Ferreira, I.C.F.R., (2016). Anti-inflammatory potential of mushroom extracts and isolated metabolites. *Trends In Food Science And Technology*, 50, 193-210.
339. Tareau, M.A., Palisse, M., Odonne, G., (2017). As vivid as a weed... Medicinal and cosmetic plant uses amongst the urban youth in French Guiana. *Journal*

- of Ethnopharmacology, 203, 200-213.
340. Tasioula-Margari, M., Tsabolatidou, E., (2015). Extraction, separation, and identification of phenolic compounds in virgin olive oil by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Antioxidants*, 4, 3, 548-562.
341. Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A., (2005). Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. *Journal of Food Engineering*, 66, 4, 447-454.
342. Terao, J., (2009). Dietary flavonoids as antioxidants. In *Food factors for health promotion*. Karger, 61, 87-94.
343. Thakur, K., Kalia, S., Sharma, N., Pathania, D., (2015). Laccase-mediated biografting of *p*-coumaric acid for development of antibacterial and hydrophobic properties in coconut fibers. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, 289-295.
344. Thomas, T., (2007). Isolation, purification and characterization of antibacterial principle from *Drynaria quercifolia*. (Doctoral dissertation, Mahatma Gandhi University Kottayam).
345. Torres-Cuevas, I, Parra-Llorca, A, Sánchez-Illana, A, Nuñez-Ramiro, A, Kuligowski, J, Cháfer-Pericás, C, Cernada, M, Escobar, J, Vento, M., (2017). Oxygen and oxidative stress in the perinatal period. *Redox Biology*, 12, 674-681.
346. Touaibia, M., Chaouch, F.Z., (2014). Evaluation of the antioxidant activity of aqueous, methanolic and ethanolic extracts of the Sahara-endemic species *Myrtus nivellei* Batt and Trab.(Myrtaceae). *International Journal of Innovation And Applied Studies*, 6, 3, 407.
347. Touaibia, M., Chaouch, F.Z., Chaouia, C., Cherif, H., (2014). Caractérisation phytochimique de l'espèce saharo-endémique *Myrtus nivellei* Batt & Trab (Myrtaceae). *Algerian Journal of Natural Products*, 2, 27-34.
348. Touaibia, M., Chaouch, F.Z., (2015). Anti-inflammatory effect of *Myrtus nivellei* Batt & Trab (Myrtaceae) methanolic extract. *Journal of Fundamental And Applied Sciences*, 7, 1, 77-82.
349. Touaibia, M., Chaouch, F.Z., (2017). Propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de *Myrtus nivellei* Batt et Trab. obtenus *in situ* et *in vitro*. *Phytothérapie*, 15, 1, 16-22.
350. Tripathy, V., Basak, B.B., Varghese, T.S., Saha, A., (2015). Residues and contaminants in medicinal herbs-A review. *Phytochemistry Letters*, 14, 67-78.
351. Tsai, S.H., Lin-Shiau, S.Y., Lin, J.K., 1999. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFκB in macrophages by resveratrol. *British Journal of Pharmacology*, 126, 3, 673-680.
352. Tsikas, D., (2007). Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B*, 851, 1, 2, 51-70.

353. Tsuchiya, H, Iinuma, M., (2000). Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine*, 7, 161-5.
354. Turhan, A.B., Bör, Ö., (2016). Use of herbs or vitamin/mineral/nutrient supplements by pediatric oncology patients. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 23, 69-74.
- U.**
355. Umesalma, S., Sudhandiran, G., (2010). Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF- $\kappa$ B, iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , and IL-6 in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Basic And Clinical Pharmacology And Toxicology*, 107, 2, 650-655.
- V.**
356. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry And Cell Biology*, 39, 1, 44-84.
357. Velandar, P., Wu, L., Henderson, F., Zhang, S., Bevan, D.R., Xu, B., (2017). Natural product-based amyloid inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, 139, 40-55.
358. Venkatesha, S.H., Berman, B.M., Moudgil, K.D., (2011). Herbal medicinal products target defined biochemical and molecular mediators of inflammatory autoimmune arthritis. *Bioorganic And Medicinal Chemistry*, 19, 1, 21-29.
359. Vichai, V., Kirtikara, K., (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1, 3, 1112-1116.
360. Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J.A., Fernandez-Lopez, J., (2011). Identification of flavonoid content and chemical composition of the essential oils of Moroccan Herbs: Myrtle (*Myrtus communis* L.), Rockrose (*Cistus ladanifer* L.) and Montpellier cistus (*Cistus monspeliensis* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 23, 2, 1-9.
- W.**
361. Wada, S., He, P., Hashimoto, I., Watanabe, N., Sugiyama, K., (2000). Glycosidic flavonoids as rat-liver injury preventing compounds from green tea. *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry*, 64, 10, 2262-2265.
362. Wang, Y., Chen, M., Zhang, J., Zhang, X.L., Huang, X.J., Wu, X., Zhang, Q.W., Li Y.L., Ye, W.C., (2012). Flavone C-glycosides from the leaves of *Lophatherum gracile* and their *in vitro* antiviral activity. *Planta Medica*, 78, 1, 46-51.
363. Wang, Y.C., Huang, K.M., (2013). *In vitro* anti-inflammatory effect of apigenin in the Helicobacter pylori-infected gastric adenocarcinoma cells. *Food And Chemical Toxicology*, 53, 376-383.
364. Wang, S., Moustaid-Moussa, N., Chen, L., Mo, H., Shastri, A., Su, R., Bapat, P., Kwun, I., Shene, C.L., (2014). Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25, 1, 1-18.

365. Wang, Y., Chen, P., Tang, C., Wang, Y., Li, Y., Zhang, H., (2014). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and two isolated flavonoids of *Carthamus tinctorius* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 151, 2, 944-950.
366. Wang, W., Asimakopoulos, A.G., Abualnaja, K.O., Covaci, A., Gevao, B., Johnson-Restrepo, B., Johnson-Restrepo, B., Kumosani, T.A., Malarvannan, G. Minh, T.B., Moon, H.B., Nakata, H., Sinha, R.K., Kannan, K., (2016a). Synthetic phenolic antioxidants and their metabolites in indoor dust from homes and microenvironments. *Environmental Science And Technology*, 50, 1, 428-434.
367. Wang, W., Kannan, P., Xue, J., Kannan, K., (2016b). Synthetic phenolic antioxidants, including butylated hydroxytoluene (BHT), in resin-based dental sealants. *Environmental Research*, 151, 339-343.
368. Wang, S., Cao, M., Xu, S., Zhang, J., Wang, Z., Mao, X., Yao, X., Liu, C., (2017). Effect of luteolin on inflammatory responses in RAW264. 7 macrophages activated with LPS and IFN- $\gamma$ . *Journal of Functional Foods*, 32, 123-130.
369. Watson, R.R., (2014). Polyphenols in plants: isolation, purification and extract preparation. Academic Press, Tucson, AZ, p. 360.
370. Wiesner, J., Knöss, W., (2017). Herbal medicinal products in pregnancy-which data are available?. *Reproductive Toxicology*, 72, 142-152.
371. Wu, Q., Yang, Y., Simon, J.E., (2007). Qualitative and quantitative HPLC/MS determination of proanthocyanidins in Areca Nut (*Areca catechu*). *Chemistry And Biodiversity*, 4, 12, 2817-2826.
372. Wu, X.A., Qing, F., Du, M.Q., (2012). The QSAR study on anti-inflammatory activities of C-glycosylflavones. *Lishizhen Medicine And Materia Medica Research*, 23, 632-633.
373. Wyrepkowski, C.C., Costa, D.L., Sinhorin, A.P., Vilegas, W., De Grandis, R.A., Resende, F.A., Varanda, E.A., dos Santos, L.C., (2014). Characterization and quantification of the compounds of the ethanolic extract from *Caesalpinia ferrea* Stem Bark and evaluation of their mutagenic activity. *Molecules*, 19, 10, 16039-16057.
- X.**
374. Xia, Z., Triffitt, J.T., (2006). A review on macrophage responses to biomaterials. *Biomedical Materials*, 1, 1, 1.
375. Xiao, J., Capanoglu, E., Jassbi, A.R., Miron, A., (2016). Advance on the flavonoid C-glycosides and health benefits. *Critical Reviews In food Science And Nutrition*, 56, 1, 29-45.
- Y.**
376. Yagi, K., Nishigaki, I., Ohama, H., (1968). Measurement of serum TBA-value. *Vitamins*, 37, 1, 105.
377. Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.T., Newmark, H.L., (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 21, 1, 381-406.
378. Yanishlieva-Maslarova, N.V., (2001). Inhibiting oxidation. In: *Antioxidants in food: Practical*

- applications. Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M.H., Eds. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, p. 22-70.
379. Yeboah, E.M., Majinda, R.R., Kadziola, A., Muller, A., (2010). Dihydro- $\beta$ -agarofuran sesquiterpenes and pentacyclic triterpenoids from the root bark of *Osyris lanceolata*. *Journal of Natural Products*, 73, 6, 1151-1155.
380. Yeboah, E.M., Majinda, R.R., (2013). Five new agarofuran sesquiterpene polyesters from *Osyris lanceolata*. *Phytochemistry Letters*, 6, 4, 531-535.
381. Yoshikawa, T., 2009. *Food Factors for Health Promotion*. Karger, Basel, p. 61.
382. Yuan, L., Wang, J., Xiao, H.F., Xiao, C.X., Wang, Y.T., Liu, X.B., (2012). Isoorientin induces apoptosis through mitochondrial dysfunction and inhibition of PI3K/Akt signalling pathway in HepG2 cancer cells. *Toxicology And Applied Pharmacology*, 265, 1, 83-92.
383. Yuan, L., Wang, J., Xiao, H.F., Wu, W.Q., Wang, Y.T., Liu, X.B., (2013). MAPK signaling pathways regulate mitochondrial-mediated apoptosis induced by isoorientin in human hepatoblastoma cancer cells. *Food And Chemical Toxicology*, 53, 62-68.
384. Yuan, L., Wei, S.P., Wang, J., Liu, X.B., (2014). Isoorientin induces apoptosis and autophagy simultaneously by reactive oxygen species (ROS)-related p53, PI3K/Akt, JNK, and p38 signaling pathways in HepG2 cancer cells. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 62, 23, 5390-5400.
- Z.**
385. Zacchino, S.A., Butassi, E., Di Liberto, M., Raimondi, M., Postigo, A., Sortino, M., (2017). Plant phenolics and terpenoids as adjuvants of antibacterial and antifungal drugs. *Phytomedicine*, 37, 27.
386. Zampelas, A., Micha, R., (2015). *Antioxidants in health and disease*. CRC Press, Taylor And Francis Group, Boca Raton, p., 320.
387. Zeng, L., Hu, D., Choonara, I., Mu, D., Zhang, L., Li, X., Zhang, Z., Hu, Z., Quan, S., (2017). A prospective study of the use of antibiotics in the Emergency department of a Chinese university hospital. *International Journal of Pharmacy Practice*, 25, 89-92.
388. Zhang, X.W., Shang, P.P., Qin, F., Zhou, Q., Gao, B.Y., Huang, H.Q., Yang, H.S., Shi, H.M., Yu, L.A.L., (2013). Chemical composition and antioxidative and anti-inflammatory properties of ten commercial mung bean samples. *LWT- Food Science And Technology*, 54, 171-178.
389. Zhang, H., Tsao, R., (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion In Food Science*, 8, 33-42.
390. Zhang, Y.N., Yin, H.M., Zhang, Y., Zhang, D.J., Su, X., Kuang, H.X., (2017). Cocrystals of kaempferol, quercetin and myricetin with 4, 4'-bipyridine: Crystal structures, analyses of intermolecular interactions and antibacterial properties. *Journal of Molecular Structure*, 1130, 199-207.

391. Zhao, J.W., Chen, D.S., Deng, C.S., Wang, Q., Zhu, W., Lin, L., (2017). Evaluation of anti-inflammatory activity of compounds isolated from the rhizome of *Ophiopogon japonicas*. BMC Complementary And Alternative Medicine, 17, 1, 7.
392. Zhu, D.X., An, F., Wang, S.H., (2012). Effects of orientin from *Trollius chinensis* on cell growth and apoptosis of EC-109 cells. Chinese Traditional Patent Medicine, 34, 2055-2059.
393. Zhuang, T., Li, F., Huang, L.R., Liang, J.Y., Qu, W., (2015). Secondary metabolites from the plants of the family Saururaceae and their biological properties. Chemistry And Biodiversity, 12, 2, 194-220.
394. Zida, A., Bamba, S., Yacouba, A., Ouedraogo-Traore, R., Guiguemdé, R.T., (2017). Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology, 27, 1, 1-19.
395. Zidane, A., Tits, M., Angenot, L., Wauters, J.N., Frederich, M., Dib, I., Mekhfi, H., Aziz, M., Bnouham, M., Legssyer, A., Ziyyat, A., (2014). Phytochemical analysis of *Tetraclinis articulata* in relation to its vasorelaxant property. Journal of Materials And Environmental Science, 5, 5, 1368-1375.
396. Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M., Benjelloun, W., (1997). Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. Journal of Ethnopharmacology, 58, 1, 45-54.



Cite this: *Food Funct.*, 2017, **8**, 3111

## Detailed phytochemical characterization and bioactive properties of *Myrtus nivelii* Batt & Trab

Wahiba Rached,<sup>a,b,c,d</sup> Malika Bennaceur,<sup>a,e</sup> Lillian Barros,<sup>id</sup>\*<sup>b</sup> Ricardo C. Calhelha,<sup>b</sup> Sandrina Heleno,<sup>id</sup>\*<sup>b,f</sup> Maria José Alves,<sup>b</sup> Ana Maria Carvalho,<sup>b</sup> Abderrazak Marouf<sup>e</sup> and Isabel C. F. R. Ferreira<sup>id</sup>\*<sup>b</sup>

The endemic Algerian myrtle, *Myrtus nivelii* Batt & Trab., was evaluated for its bioactive properties, such as antioxidant, anti-inflammatory, cytotoxic and antibacterial activities, and correlated with the individual phenolic compounds identified in its crude aqueous extract and subsequent organic fractions (ethyl acetate and butanol). Flavonols, such as myricetin, kaempferol and quercetin glycoside derivatives, were the major phenolic compounds found, along with the presence of ellagitannins. The ethyl acetate fraction contained the highest amount of phenolic compounds, followed by the butanol fraction and, finally, the crude aqueous extract. In general, all samples exhibited an excellent bioactivity, namely the ethyl acetate fraction that presented strong antioxidant activity, when compared to the standard trolox, strong cytotoxicity and antibacterial activity, especially against MRSA and MSSA. The present study revealed that the ethyl acetate fraction of *M. nivelii* could be used as a source of bioactive compounds in the food and pharmaceutical industries.

Received 19th May 2017,

Accepted 10th July 2017

DOI: 10.1039/c7fo00744b

rs.c.li/food-function

### 1. Introduction

Plants are able to produce a great number of secondary metabolites, among them are terpenoids, alkaloids and phenolic compounds. These last molecules, mainly flavonoids, phenolic acids, lignans, tannins and stilbenes, are very common in different plant parts, and widely exploited and used in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. Phenolic compounds are not only present in the most commonly consumed products, such as fruits and vegetables, but they are also present in medicinal herbs.<sup>1</sup> Polyphenols are widely studied in the medicinal field, where they are recognized for their bio-

activities, such as antioxidant, anti-inflammatory<sup>2</sup> and antifungal<sup>3</sup> activities. They also have positive effects on obesity<sup>4</sup> and cancer.<sup>5</sup> In particular, these molecules are strong inhibitors of oxidative stress, hence they contribute to reactive oxygen species (ROS) scavenging,<sup>6</sup> preventing oxidation effects by activating the endogenous antioxidant defense system,<sup>7</sup> and also protecting against the lipid oxidation phenomenon, which is responsible for the development of oxidative diseases.<sup>6</sup> Moreover, phenolic compounds, such as phenolic acids, flavonoids and tannins, have been isolated from different plant sources and have inhibited various pathogenic bacteria<sup>8</sup> and fungi.<sup>3</sup>

Myrtaceae is a widespread plant family in the Mediterranean area, especially in Algeria, where a great number of species from the genus of this family can be found. In this family, there are numerous endemic species that are used in traditional therapy, in order to cure or prevent a diverse number of pathologies.<sup>2,9</sup> These bioactivities have been correlated with a wide variety of secondary metabolites, such as hydroxybenzoic acid derivatives and flavonoids.<sup>9</sup>

The *Myrtus* herba commonly named Myrtle is considered the most famous genus used to treat diabetes, hypertension and respiratory tract diseases.<sup>10</sup> This is due to the presence of bioactive compounds with innumerable biological activities reported in the literature such as antioxidant, hypotensive, antimicrobial, anti-inflammatory, hypoglycemic, and anti-cancer activities.<sup>11</sup> The most abundant compounds present in

<sup>a</sup>Laboratory of Plant Biochemistry and Natural Products, Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Oran 1, Ahmed Ben Bella, 1524EL M Naouer 31000 Oran, Algeria

<sup>b</sup>Centro de Investigação de Montanha (CIMO), ESA, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal. E-mail: iferreira@ipb.pt, lillian@ipb.pt; Fax: +351-273-325405; Tel: +351-273-303219, +351-273-303285

<sup>c</sup>Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Mostaganem, BP 188/227 Mostaganem 2700, Algeria

<sup>d</sup>Department of Nature and Life Sciences, Institute of Science and Technology, Center University Salhi Ahmed, BP 66, 45000 Naama, Algeria

<sup>e</sup>Laboratory of Research in Arid Areas (LRZA), Faculty of Biological Sciences, PO Box 32, El Alia Bab-Ezzouar, Algiers 16111, Algeria

<sup>f</sup>Laboratory of Separation and Reaction Engineering—Laboratory of Catalysis and Materials (LSRE-LCM), Polytechnic Institute of Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal

these species, mostly in the leaves, are phenolic compounds, such as flavonoids (myricetin and quercetin glycoside derivatives, and flavan-3-ol derivatives) and phenolic acids (gallic, caffeic and ellagic acids).<sup>10</sup>

In Algeria, there are two characteristic species of Myrtle: *Myrtle communis* L., the most known and common species in the Mediterranean area, being more abundant in the north of Algeria; and *Myrtle nivelii* Batt. & Trab., which is found in the desert, in the south of Algeria, and is much less explored. The common name of this species is Saharan myrtle (Rihan Esahraa in Algerian), an endemic plant found in the mountains (in altitude above 1500 to 2000 m), in the central Sahara, being widespread in the Hoggar and Tassili N'Ajjer mountains in Algeria, the Tibesti mountains in Chad and Lybia. This plant species is well known in southern Algeria for its therapeutic properties; its leaves are collected throughout the year and prepared as decoctions that are taken orally for the treatment of liver problems, gastrointestinal disorders, diarrhea, fever, diabetes, respiratory infections, rheumatism, allergies, and fungal infections,<sup>12</sup> while leaf infusions also used against blennorrhoea. The antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities of aqueous and methanol extracts obtained from *M. nivelii* were previously reported,<sup>13–15</sup> but only correlated with total compounds,<sup>15</sup> without a clear identification of individual bioactive molecules.

The aim of the present work was to investigate the individual phenolic compounds of *Myrtle nivelii* Batt. & Trab. (crude aqueous extract, and acetyl acetate and butanol fractions), as well as to evaluate its biological activities (antioxidant, cytotoxic, anti-inflammatory and antibacterial).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

The leaves of *Myrtle nivelii* Batt & Trab. (Saharan myrtle; local name: “Targui”: tafeltest and “arabe”: rihan Sahraa) were collected at Tamanrasset (south of Algeria) in November 2013. The taxonomic identification of the plant material was confirmed by Dr Rabéa Sahki, researcher in the National Institute for Forest Research of Tamanrasset, Algeria.

The plant material was dried under air circulation conditions (oven-dried at 40 °C for 48 h) and then ground to a fine powder (~40 mesh).

### 2.2. Standards and reagents

HPLC-grade acetonitrile and ethyl acetate (99.8%) were from Fisher Scientific (Lisbon, Portugal). Butanol (99%) was from Lab-Scan analytical sciences (Gliwice, Germany). Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), acetic acid, formic acid, ellipticine, sulforhodamine B (SRB), trypan blue, trichloroacetic acid (TCA) and Tris were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Phenolic compound standards were purchased from Extrasynthèse (Genay, France). 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was obtained from Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA). Foetal bovine serum (FBS),

L-glutamine, Hank's balanced salt solution (HBSS), trypsin-EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), penicillin/streptomycin solution (100 U mL<sup>-1</sup> and 100 mg mL<sup>-1</sup>, respectively), RPMI-1640 and DMEM media were from Hyclone (Logan, Utah, USA). The culture media Muller Hinton Broth (MHB) and Tryptic Soy Broth (TSB) were obtained from Biomerieux (Marcy l'Etoile, France), as well as the blood agar with 7% sheep blood and Mac Conkey agar plates. The dye *p*-iodonitrotetrazolium chloride (INT) was purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) and it was used as a microbial growth indicator. The water was treated in a Milli-Q water purification system (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, USA).

### 2.3. Extraction procedure

The crude aqueous extract of *M. nivelii* was obtained under heat reflux extraction with distilled water 10% (w/v) for 30 min, three times. Subsequently, each extract was filtered and lyophilized (Gardiner, NY, USA) to dryness. The obtained lyophilized extracts were solubilized in distilled water (100 mL) and successive partitions were performed by liquid–liquid extraction by using increasing polarity solvents (chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol). The crude aqueous extract and its ethyl acetate and butanol fractions were used in the subsequent assays. The crude aqueous extract and fractions were dissolved in water and water/methanol (80 : 20, v : v), respectively, at 5 mg mL<sup>-1</sup>, in order to obtain the phenolic compounds profile; water and methanol, respectively (5 mg mL<sup>-1</sup>), for antioxidant activity evaluation; in the medium (20 mg mL<sup>-1</sup>) for antibacterial assays; and in water (8 mg mL<sup>-1</sup>) for anti-inflammatory and cytotoxicity tests. For bioactivity evaluation assays, the stock solutions were further diluted and tested.

### 2.4. Phenolic compounds' characterization

The phenolic compounds profile was determined by using an LC-DAD-ESI/MSn (Dionex Ultimate 3000 UPLC, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA), as previously described by Bessada *et al.*<sup>16</sup> For the double online detection, 280 and 370 nm were used as the preferred wavelengths for DAD and in a mass spectrometer (MS). MS detection was performed in negative mode, using a Linear Ion Trap LTQ XL mass spectrometer (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) equipped with an ESI source. The identification of the phenolic compounds was performed using standard compounds, when available, by comparing their retention times, UV-vis and mass spectra; and also, comparing the obtained information with available data reported in the literature giving a tentative identification. For quantitative analysis, a calibration curve for each available phenolic standard was constructed based on the UV signal. For the identified phenolic compounds for which a commercial standard was not available, the quantification was performed through the calibration curve of the most similar available standard. The results were expressed as mg g<sup>-1</sup> of the extract.

### 2.5. *In vitro* antioxidant activity assays

The antioxidant activity was assessed by using four different methodologies, DPPH radical-scavenging, reducing power,

inhibition of  $\beta$ -carotene bleaching and TBARS inhibition assays.<sup>17</sup> The results were expressed as  $EC_{50}$  values ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), sample concentration providing 50% of antioxidant activity or 0.5 of absorbance in the reducing power assay. Trolox was used as the positive control.

### 2.6. *In vitro* anti-inflammatory assays

The evaluation of the anti-inflammatory properties was performed according to the previously described method by Sobral *et al.*<sup>18</sup> For the determination of nitric oxide, a Griess Reagent System kit was used, which contains sulfanilamide, NED and nitrite solutions. The nitrite produced was determined by measuring the optical density at 515 nm, using an ELX800 microplate reader (Bio-Tek Instruments, Inc; Winooski, VT, USA) and was compared to the standard calibration curve. The results were expressed in percentages of inhibition of NO production in comparison with the negative control (100%) and  $EC_{50}$  values (sample concentration providing 50% of inhibition of NO production) were also estimated. Dexamethasone was used as the positive control.

### 2.7. Cytotoxicity assays

Four human tumor cell lines were tested: MCF-7 (breast adenocarcinoma), NCIH460 (non-small cell lung carcinoma), HeLa (cervical carcinoma) and HepG2 (hepatocellular carcinoma). Sulforhodamine B assay was performed according to a procedure previously described by the authors, Barros *et al.*<sup>17</sup> For evaluation of the cytotoxicity in non-tumor cells, a cell culture (assigned as PLP2) was prepared from a freshly harvested porcine liver obtained from a local slaughterhouse, according to a procedure established by the authors, Abreu *et al.*;<sup>19</sup> ellipticine was used as the positive control and the results were expressed in  $GI_{50}$  values (concentration that inhibited 50% of the net cell growth).

### 2.8. Antibacterial activity

The antibacterial activity was evaluated against clinical isolates obtained from patients hospitalized in the Local Health Unit of Bragança and Hospital Centre of Trás-os-Montes and Alto-Douro-Vila Real, Northeast of Portugal. The bacterial strains studied were six Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *E. coli* ESBL, *Klebsiella pneumoniae* and *K. pneumoniae* ESBL, *Morganella morganii*, and *Pseudomonas aeruginosa*), and four Gram-positive bacteria (MRSA – methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MSSA – methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecalis*). MIC determinations were performed by the micro-dilution method using the *p*-iodonitrotetrazolium chloride (INT) colorimetric assay according to Dias *et al.*<sup>20</sup> MBC concentrations were calculated by adding 10  $\mu\text{L}$  of the MIC and higher concentrations to fresh culture medium to see if the bacteria were able to grow. After 24 h of incubation at 37 °C, the bactericidal concentrations were registered. The antibiotic susceptibility profile of Gram-negative and Gram-positive bacteria was previously described by Dias *et al.*<sup>20</sup>

### 2.9. Statistical analysis

Three crude extracts and three of each one of the fractions were used and all assays were performed in triplicate. The results were expressed as mean values and standard deviations (SD). The results obtained were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's HSD test with  $\alpha = 0.05$ . In the case of phenolic composition, a Student's *t*-test was also used to determine significant differences when the number of cases for a determined condition was less than 3, with  $\alpha = 0.05$ . This treatment was carried out using the SPSS v. 23.0 program (IBM Corp., Armonk, New York, USA).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Phenolic compounds

The characterization of phenolic compounds in *M. nivellii* crude aqueous extract and acetyl acetate and butanol fractions is shown in Table 1, and an example of the profile is presented in Fig. 1. To the authors' best knowledge, this is the first report on the identification and quantification of individual phenolic compounds present in *M. nivellii*. Twenty-seven different compounds were identified, comprising hydrolysable tannins (gallotannin and ellagitannin derivatives), flavonoids (myricetin, quercetin, kaempferol and catechin derivatives) and a phenolic acid (ellagic acid). The ethyl acetate fraction revealed the presence of 25 compounds (Fig. 1), while the butanol fraction and the crude aqueous extract revealed only 19 and 17 compounds, respectively.

Peaks 1, 2, 4, 5, 7, 9, 10, 14, 16 and 18 showed UV spectra coherent with galloyl hexahydroxydiphenoyl (HHDP) derivatives (peaks 1, 2, 4, 7, 10 and 14) or gallotannins composed of trimeric and tetrameric galloyl moieties linked to glucose (peaks 5, 9, 16 and 18). According to the literature, the main characteristic in the mass spectra of these compounds is the deprotonated molecule  $[M - H]^-$  and the loss of one or more gallic acid (170 mu) and/or galloyl groups (152 mu).<sup>21</sup> Mass characteristics of peaks 1 and 2 ( $[M - H]^-$  at  $m/z$  633; fragment ions at  $m/z$  463 and 301) coincided with a galloyl-HHDP-glucose, whereas peaks 4, 7 and 10 ( $[M - H]^-$  at  $m/z$  785; fragment ions at  $m/z$  633, 615, 483, 419, 301) correspond to digalloyl-HHDP-glucoside, while peak 14 ( $[M - H]^-$  at  $m/z$  937; fragment ions at  $m/z$  767, 635, 465 and 301) was coherent with a trigalloyl-HHDP-glucose.<sup>22</sup> Compounds 5 and 9 (the  $[M - H]^-$  ion at  $m/z$  635) revealed a typical fragmentation pattern of a trigalloylglucoside, while compounds 16 and 18 (the  $[M - H]^-$  ion at  $m/z$  787) presented a fragmentation pattern characteristic of tetragalloylglucoside.<sup>21</sup>

Peak 3 ( $[M - H]^-$  at  $m/z$  495) was identified as digalloylquinic acid, releasing three  $MS^2$  fragment ions at  $m/z$  343 (release of the first galloyl group  $[M - 152-H]^-$ ),  $m/z$  191 (release of the second galloyl group  $[M - 152-H]^-$ ) and  $m/z$  169 (release of the quinic acid with the formation of the deprotonated gallic acid).<sup>23</sup> Similarly, peak 8 ( $[M - H]^-$  at  $m/z$  647) was identified as trigalloylquinic acid. Peak 12 ( $[M - H]^-$  at  $m/z$  469) was identified as a valoneic acid dilactone, taking into account the

**Table 1** Retention time ( $R_t$ ), wavelengths of maximum absorption in the visible region ( $\lambda_{\max}$ ), mass spectral data, identification and quantification of phenolic compounds in *M. nivellii* leaves (mean  $\pm$  SD)

Peak	$R_t$ (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	$[M - H]^-$ ( $m/z$ )	$MS^2$ ( $m/z$ )	Tentative identification	Quantification (mg g <sup>-1</sup> extract)			Student's <i>t</i> -test
						Crude aqueous extract	Ethyl acetate fraction	Butanol fraction	
1	4.43	267	633	463(100), 301(62)	Galloyl-HHDP-glucoside <sup>1</sup>	nd	nd	10.1 $\pm$ 0.4	—
2	5.09	266	633	463(100), 301(51)	Galloyl-HHDP-glucoside <sup>1</sup>	29.0 $\pm$ 0.5	nd	17.4 $\pm$ 0.2	<0.001
3	5.32	273	495	343(00), 191(86), 169(60)	Digalloylquinic acid <sup>2</sup>	nd	6.41 $\pm$ 0.07	14.3 $\pm$ 0.2	<0.001
4	5.63	274	785	633(38), 615(23), 483(93), 419(21), 301(100)	Digalloyl-HHDP-glucoside <sup>1</sup>	14.5 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	19.28 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	26.7 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	—
5	6.5	269	635	483(19), 465(100), 421(80), 313(52), 295(28), 169(32)	Trigalloylglucoside <sup>2</sup>	3.0 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	7.1 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	6.18 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	—
6	6.85	256	953	909(5), 785(50), 765(15), 633(100), 615(3), 483(53), 419(10), 301(20)	Rugosin B <sup>1</sup>	5.4 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	7.0 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	9.4 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	—
7	7.77	265	785	633(21), 615(8), 483(100), 419(12), 301(72)	Digalloyl-HHDP-glucoside <sup>1</sup>	8.9 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	20.72 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	16.9 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	—
8	8.67	276	647	495(100), 477(18), 343(80), 325(43), 191(20), 173(13), 169(47)	Trigalloylquinic acid <sup>2</sup>	11.2 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	22.2 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	31.3 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	—
9	9.9	276	635	483(18), 465(100), 421(6), 313(80), 295(12), 169(24)	Trigalloylglucoside <sup>2</sup>	nd	12.3 $\pm$ 0.1	12.2 $\pm$ 0.3	0.589
10	10.23	270	785	633(17), 615(12), 483(99), 419(18), 301(100)	Digalloyl-HHDP-glucoside <sup>2</sup>	7.22 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	11.1 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	6.6 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	—
11	10.61	273	915	457(100), 331(58), 305(26), 169(98)	Gallocatechin-gallate-dimer <sup>3</sup>	10.9 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	35.6 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	13.2 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	—
12	12.6	258 364	469	425(100), 301(75)	Valoneic acid dilactone <sup>1</sup>	nd	9.5 $\pm$ 0.2	8.47 $\pm$ 0.01	0.005
13	14.04	356	631	479(100), 317(63)	Myricetin-hexosyl-gallate <sup>4</sup>	13.4 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	37.0 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	17.8 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	—
14	14.78	276	937	767(100), 635(17), 465(56), 301(37)	Trigalloyl-HHDP-glucoside <sup>1</sup>	4.63 $\pm$ 0.05	17.1 $\pm$ 0.4	nd	<0.001
15	15.15	357	479	317(100)	Myricetin-3- <i>O</i> -glucoside <sup>4</sup>	8.48 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>	19.88 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	23.6 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	—
16	15.5	273	787	635(27), 617(100), 301(15)	Tetragalloylglucose <sup>1</sup>	nd	16.3 $\pm$ 0.1	nd	—
17	16.01	260	1105	1061(100), 937(87), 785(29), 767(84), 635(14), 465(61), 419(21), 301(41)	Rugosin A <sup>1</sup>	4.9 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	9.7 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	7.8 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	—
18	16.4	277	787	635(15), 617(100), 301(25)	Tetragalloylglucose <sup>1</sup>	4.02 $\pm$ 0.02	13.2 $\pm$ 0.5	nd	<0.001
19	17.13	352	615	463(100), 301(66)	Quercetin-hexosyl-gallate <sup>5</sup>	1.88 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	10.54 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	1.99 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	—
20	17.83	356	463	317(100)	Myricetin-3- <i>O</i> -rhamnoside <sup>4</sup>	11.3 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	85.75 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	12.4 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	—
21	18.75	354	463	301(100)	Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside <sup>5</sup>	1.64 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	3.1 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	2.18 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	—
22	19.17	251 366	301	284(15), 245(20), 185(12), 173(5), 157(3)	Ellagic acid <sup>1</sup>	nd	27.1 $\pm$ 0.1	6.4 $\pm$ 0.4	<0.001
23	19.61	356	599	447(100), 285(28)	Kaempferol-hexosyl-gallate <sup>6</sup>	4.3 $\pm$ 0.4	8.34 $\pm$ 0.07	nd	<0.001
24	21.52	351	447	285(100)	Kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside <sup>6</sup>	nd	3.3 $\pm$ 0.1	nd	—
25	22.8	348	447	301(100)	Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnoside <sup>5</sup>	nd	3.2 $\pm$ 0.2	nd	—
26	25.05	370	317	299(18), 289(29), 273(12), 245(14)	Myricetin <sup>4</sup>	nd	5.5 $\pm$ 0.1	nd	—
27	27.93	316	625	479(100), 317(32)	Myricetin-coumaroylhexoside <sup>4</sup>	nd	2.12 $\pm$ 0.04	nd	—
					Total hydrosable tannins	93 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	172 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	167.5 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	—
					Total phenolic acids	—	27.08 $\pm$ 0.08	6.4 $\pm$ 0.4	<0.001
					Total flavonoids	45 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	200 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	62.9 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	—
					Total phenolic compounds	138 $\pm$ 3 <sup>c</sup>	398 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	236.8 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	—

nd – not detected. Standard calibration curves: (1) ellagic acid ( $y = 26719x - 317255$ ,  $R^2 = 0.9986$ ); (2) gallic acid ( $y = 208604x + 173056$ ,  $R^2 = 0.9999$ ); (3) catechin ( $y = 84950x - 23200$ ,  $R^2 = 0.9999$ ); (4) myricetin-3-*O*-glucoside ( $y = 23287x - 581708$ ,  $R^2 = 0.9988$ ); (5) quercetin-3-*O*-glucoside ( $y = 34843x - 160173$ ,  $R^2 = 0.9998$ ); (6) kaempferol-3-*O*-glucoside ( $y = 11117x + 30861$ ,  $R^2 = 0.9999$ ). In each row, different letters mean significant differences between *M. nivellii* extract and fractions ( $p < 0.05$ ). When only two samples were present a Student's *t*-test was used to determine the significant difference between two different samples, with  $\alpha = 0.05$ .

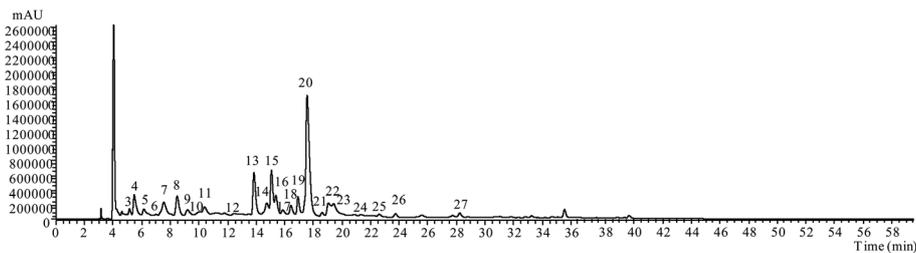


Fig. 1 Phenolic compounds profile of *M. nivellii* ethyl acetate fraction, recorded at 280 nm. Peak numbering corresponds to the molecules identified in Table 1.

fragmentation pattern and UV-Vis spectra presented in ref. 23. Similarly, peaks 6 ( $[M - H]^-$  at  $m/z$  953) and 17 ( $[M - H]^-$  at  $m/z$  1105) were identified as rugosins A and B, respectively, taking into account all the MS characteristics discussed by the author Fecka.<sup>24</sup>

Compound 22 (ellagic acid) was positively identified according to its retention, mass and UV-vis characteristics by comparison with a commercial standard.

The remaining compounds correspond to flavonols (peaks 13, 15, 19–21, 23–27) and to one flavan-3-ol (peak 11). This last peak ( $[M - H]^-$  at  $m/z$  915) was tentatively identified as a dimer of gallic acid, presenting a fragment pattern with the fragments at  $m/z$  457 (gallic acid) and  $m/z$  169 (gallate), previously reported by Fracassetti *et al.*<sup>25</sup> The detected flavonols were derived from quercetin ( $\lambda_{\max}$  around 350 nm, MS<sup>2</sup> fragment at  $m/z$  301), kaempferol ( $\lambda_{\max}$  around 348 nm, MS<sup>2</sup> fragment at  $m/z$  285) and myricetin ( $\lambda_{\max}$  around 354 nm, MS<sup>2</sup> fragment at  $m/z$  317) (Table 1). Myricetin-3-*O*-glucoside (peak 15), quercetin-3-*O*-glucoside (peak 21), kaempferol-3-*O*-glucoside (peak 24) and myricetin (peak 26) were positively identified according to their retention, mass and UV-vis characteristics by comparison with commercial standards. The flavonoid myricetin-3-*O*-glucoside has been previously reported in the leaves of *Myrtus communis* L.<sup>11,26</sup> Compounds 20 ( $[M - H]^-$  at  $m/z$  463) and 25 ( $[M - H]^-$  at  $m/z$  447) presented an MS<sup>2</sup> fragment at  $m/z$  317 (myricetin) and  $m/z$  301 (quercetin) corresponding to the loss of a rhamnosyl (–146 u) moiety. These compounds were assumed as myricetin-3-*O*-rhamnoside and quercetin-3-*O*-rhamnoside, due to their previous identification in the leaves of *M. communis* by Romani *et al.*<sup>27</sup> and Messaoud *et al.*<sup>11</sup> Furthermore, peaks 13, 19 and 23 were identified as hexosyl derivatives of myricetin, quercetin and kaempferol that also appeared to be attached to a gallic acid moiety, yielding deprotonated ions at  $m/z$  631 (peak 13), consistent with myricetin-hexosyl-gallate,  $m/z$  615 (peak 19) with quercetin-hexosyl-gallate, and  $m/z$  599 (peak 23) with kaempferol-hexosyl-gallate. Finally, peak 27 ( $[M - H]^-$  at  $m/z$  625) was identified as a myricetin-coumaroylhexoside, due to the fragmentation of the product ion at  $m/z$  479 (loss of the *p*-coumaroyl residue, –146 u) and  $m/z$  317 (loss of the hexosyl moiety). This peak was identified as a flavonol glycoside linked to a phenolic acid due to its late elution time, since the presence of the hydroxycinnamoyl residue implies a decrease in polarity, as also due to its UV-Vis spectra ( $\lambda_{\max}$  316 nm).

The highest phenolic content was found in the ethyl acetate fraction (398 mg g<sup>-1</sup> of extract, Table 1), myricetin glycoside derivatives being the most abundant compounds (total of 136 mg g<sup>-1</sup>), especially myricetin-3-*O*-rhamnoside and myricetin-hexosyl-gallate, respectively. These derivatives accounted for 34% of the total phenolic compounds in this fraction and were three fold higher than that in the butanol fraction (46 mg g<sup>-1</sup>) and four fold higher than that in the crude extract (26 mg g<sup>-1</sup>). The compound gallic acid was also mainly present in the ethyl acetate fraction (35.6 mg g<sup>-1</sup>), being three times higher than the one in the crude aqueous extract (10.9 mg g<sup>-1</sup>) and in its butanol fraction (13.2 mg g<sup>-1</sup>).

Hydrolysable tannins were also relevant constituents in all samples, although presenting a higher concentration in the ethyl acetate fraction (172 mg g<sup>-1</sup>, Table 1). Nevertheless, this fraction did not reveal the presence of galloyl-HHDP-glucosides (peaks 1 and 2), which were the most abundant compounds in the crude aqueous extract, while trigalloylquinic acid (peak 8) was the most abundant compound in the butanol fraction and the most abundant hydrolysable tannin in the ethyl acetate fraction.

The results obtained in this study showed that there are two main groups of polyphenolic compounds in the studied Algerian desert myrtle extracts: flavonols and hydrolysable tannins. This is in agreement with previous studies on this genus, especially on the leaves of *M. communis*, in which the main phenolic compounds are also flavonols (myricetin 3-*O*-galactoside, myricetin-3-*O*-rhamnoside and quercetin-3-*O*-glucoside), flavan-3-ols (catechin, gallic acid and epigallocatechin) and hydrolysable tannins.<sup>26,27</sup>

### 3.2. Antioxidant activity

The antioxidant activity was evaluated by using four methodologies, representing different mechanisms, such as DPPH radical scavenging activity, reducing power,  $\beta$ -carotene bleaching inhibition and inhibition of lipid peroxidation through the TBARS assay; the results are presented in Table 2. This genus has been shown to have interesting antioxidant capacity, which can be related to its antiproliferative properties, particularly associated with the presence of flavonoids and hydrolysable tannins.<sup>27</sup>

The very low EC<sub>50</sub> value presented by the ethyl acetate fraction (3.27  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) indicates the highest DPPH scavenging activity, when compared to the butanol fraction and crude

**Table 2** Antioxidant activity and NO formation inhibition capacity of *M. nivellii* leaves

	Crude aqueous extract	Ethyl acetate fraction	Butanol fraction	Positive control <sup>a</sup>
<b>Antioxidant activity (EC<sub>50</sub> values, µg mL<sup>-1</sup>)</b>				
DPPH scavenging activity	7.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	3.27 ± 0.05 <sup>c</sup>	4.6 ± 0.2 <sup>b</sup>	42 ± 1
Reducing power	6.23 ± 0.04 <sup>a</sup>	3.15 ± 0.01 <sup>c</sup>	3.93 ± 0.03 <sup>b</sup>	41 ± 1
β-Carotene bleaching inhibition	112 ± 3 <sup>a</sup>	82 ± 2 <sup>c</sup>	92.9 ± 0.2 <sup>b</sup>	18 ± 1
TBARS inhibition	0.87 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.74 ± 0.06 <sup>b</sup>	23 ± 1
<b>Anti-inflammatory activity (EC<sub>50</sub> values, µg mL<sup>-1</sup>)</b>				
Nitric oxide (NO) production	149 ± 8 <sup>a</sup>	104 ± 6 <sup>c</sup>	127 ± 12 <sup>b</sup>	16 ± 1

<sup>a</sup> Trolox and dexamethasone for antioxidant and anti-inflammatory activities, respectively. The antioxidant activity was expressed as EC<sub>50</sub> values (mean ± SD), which means that higher values correspond to lower reducing power or antioxidant potential. EC<sub>50</sub>: extract concentration corresponding to 50% of antioxidant activity or 0.5 of absorbance in reducing power assay. The results of anti-inflammatory activity are expressed in EC<sub>50</sub> values: sample concentration providing 50% of inhibition of nitric oxide (NO) production. In each row, different letters mean significant differences between *M. nivellii* extract and fractions ( $p < 0.05$ ).

aqueous extract (EC<sub>50</sub> values of 4.6 and 7.1 µg mL<sup>-1</sup>, respectively). The reducing power methodology measures the ability of an antioxidant to donate electrons to Fe(III) resulting in the transformation of the Fe<sup>3+</sup>/ferricyanide complex to the Fe<sup>2+</sup> complex. In fact, the extracts presented a great reducing power, ranging from 3.14 to 6.22 µg mL<sup>-1</sup>. Once again, ethyl acetate revealed the highest ability to reduce Fe(III) followed by the butanol fraction and the crude aqueous extract. The β-carotene bleaching inhibition method is based on the discoloration of β-carotene due to its reaction with radicals, which are formed by linoleic acid oxidation in an emulsion. The bleaching inhibition of β-carotene can be delayed in the presence of antioxidants which have the ability to neutralize free radicals and inhibit the lipid peroxidation. All the extracts demonstrated strong antioxidant properties, displaying that the ethyl acetate fraction has the greatest inhibition effect (3.30 µg mL<sup>-1</sup>), followed by the butanol fraction (3.72 µg mL<sup>-1</sup>) and the crude aqueous extract (4.49 µg mL<sup>-1</sup>). The capacity of the extracts to inhibit the formation of the complex MDA-TBA (malondialdehyde-thiobarbituric acid) was measured using porcine brain tissue homogenates (Table 2). All samples showed high capacity against lipid peroxidation, the ethyl acetate fraction again being the most efficient when compared to the butanol fraction and crude aqueous extract (EC<sub>50</sub> values of 0.46, 0.74 and 0.87 µg mL<sup>-1</sup>, respectively).

Overall, the ethyl acetate fraction exhibited the highest antioxidant activity, followed by the butanol fraction and the crude aqueous extract in all the methods (Table 2). With the exception of β-carotene bleaching inhibition, all samples presented higher antioxidant activity than the standard trolox (used as a reference compound).

Moreover, the antioxidant activity presented by the two fractions and by the crude aqueous extract could be correlated with the phenolic composition, especially with flavonol and hydrolysable tannin contents. These phenolic groups have been previously reported to show a high antioxidant activity.<sup>28</sup> The considerable higher levels of myricetin-hexosyl-gallate, myricetin-3-O-rhamnoside, galocatechin-gallate-dimer, digalloyl and trigalloyl-HHDP-glucoside, tetragalloylglucoside, and

of the quercetin and kaempferol derivatives, in the ethyl acetate fraction (Table 1), may be considered the main factor contributing to its higher antioxidant capacity. This is also in accordance with the findings reported by several authors.<sup>29,30</sup> Pereira *et al.*<sup>31</sup> showed that myricetin-3-O-galactoside and myricetin-3-O-rhamnoside isolated from *M. communis* demonstrated a strong antioxidant activity. These results could also confirm the highest antioxidant activity of the ethyl acetate in comparison with the other fraction and with the crude extract.

In fact, many reports indicate the antioxidant effect of polyphenolic components including myricetin, quercetin, kaempferol, catechin and their derivatives.<sup>32</sup> Similarly, the relationship between the antioxidant activity and phenolic content of *M. nivellii* could also be established in this study.

### 3.3. Anti-inflammatory activity

Murine macrophage-like RAW 264.7 cells are commonly used in anti-inflammatory response studies. Nitric oxide (NO) is an important oxidative and inflammatory mediator produced by macrophages and used as an indicator of inflammation induced by LPS (lipopolysaccharide). Table 2 presents the results obtained for the anti-inflammatory activity of the ethyl and butanol fractions and of the crude aqueous extract. The results reveal that all extracts suppressed the production of NO with EC<sub>50</sub> = 104, 127 and 149 µg mL<sup>-1</sup>, for ethyl acetate and butanol fractions and, finally, the crude aqueous extract, respectively. The ethyl acetate fraction was the most active in the suppression of NO, whereas the butanol fraction and the crude aqueous extract reduced less the NO production. These results were in agreement with Touaibia & Chaouch,<sup>14</sup> who demonstrated the anti-inflammatory effectiveness, by the inhibition of paw edema, of the methanol extract of *M. nivellii* by using an *in vivo* test with carrageenan paw edema from male Swiss mouse.

The NO inhibition potential of the extracts could be attributed to the presence of bioactive compounds like flavonols, ellagitannins and phenolic acids, the main molecules found in this species, which are known for their *in vivo* and *in vitro* anti-inflammatory effect.<sup>33</sup> The differences between the samples

could be attributed to the different biomolecules' distribution in fractions and crude extract.

### 3.4. Cytotoxic properties

The results of cytotoxicity of the crude extract and its fractions are summarized in Table 3. All tested samples showed promising cytotoxic properties towards the selected tumor cell lines (MCF-7, NCI-H460, HeLa and HepG2). The ethyl acetate fraction showed a significant higher potential against all the studied cell lines: MCF-7 ( $16.12 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); NCI-H460 ( $49.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); HeLa ( $15.39 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and HepG2 ( $17.67 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), followed by the butanol fraction and the crude aqueous extract. However, all samples also presented toxicity effects for non-tumor cells, although the ethyl acetate presented the lowest toxicity.

It has been previously reported that certain phenolic compounds can contribute to the protection of cancer disease, such as ellagic acid, ellagitannins and quercetin and its derivatives.<sup>34–37</sup> These compounds have exhibited antimutagenic and anticarcinogenic activity *in vitro* and *in situ* in various human tumor cell lines, such as growth inhibition of lung tumorigenesis in mice,<sup>37</sup> anticarcinogenic effects against the colon tumor cell line HCT-116<sup>35</sup> and antiproliferative effects of cervical carcinoma (Caski, HeLa and Siha cell lines).<sup>36</sup> Liberal *et al.*<sup>34</sup> confirmed the cytotoxic potential of ellagitannins on human hepatocellular carcinoma cells.

Therefore, the inhibition effects exhibited by the studied extracts are related to their contents in bioactive molecules, which can be considered promising cytotoxic phytochemicals.

### 3.5. Antibacterial activity

The antibacterial activity of the crude aqueous extract and of its two fractions is shown in Table 4. All extracts exhibited antibacterial activity against the ten tested bacteria strains, with minimal inhibitory concentrations (MICs) ranging between 0.078 and 10 mg mL<sup>-1</sup>. All extracts revealed an excellent antibacterial activity and in a similar order to the other bioactivities mentioned above, ethyl acetate fraction > butanol fraction > crude aqueous extract. MRSA and MSSA were the most susceptible Gram-positive bacteria, while *E. coli* and ESBL *E. coli* were the most sensitive Gram-negative bacteria, for all tested

**Table 4** Antibacterial activity of *M. nivellii* leaves

Bacterial strains	Crude aqueous extract	Ethyl acetate fraction	Butanol fraction
<b>Gram-positive</b>			
MIC/MBC (mg mL <sup>-1</sup> )			
<i>Enterococcus faecalis</i>	5/20	1.25/2.5	5/10
<i>Listeria monocytogenes</i>	10/20	5/10	10/20
MSSA	0.625/1.25	0.078/0.156	0.078/0.156
MRSA	0.625/1.25	0.078/0.156	0.078/0.156
<b>Gram-negative</b>			
MIC/MBC (mg mL <sup>-1</sup> )			
<i>Escherichia coli</i>	0.625/2.5	0.3125/0.625	0.625/1.25
<i>E. coli</i> ESBL	0.625/2.5	0.3125/0.625	0.625/1.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.25/5	1.25/2.5	1.25/2.5
<i>K. pneumoniae</i> ESBL	1.25/5	1.25/2.5	1.25/2.5
<i>Morganella morganii</i>	1.25/5	0.625/1.25	0.625/1.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10/20	2.5/5	5/10

MRSA – methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; MSSA – methicillin susceptible *S. aureus*; MIC – minimal inhibitory concentration; MBC – minimal bactericidal concentration; ESBL – spectrum extended producer of  $\beta$ -lactamases.

samples. It is important to highlight that all the samples presented strong bactericidal concentrations, especially against MRSA and MSSA.

Nevertheless, the inhibition growth was higher with the ethyl acetate fraction in comparison with the other samples and this activity can be associated with the highest levels of the majority of phenolic compounds present in this fraction. Similarly, Mert *et al.*<sup>38</sup> also tested the antibacterial potential of *M. communis*, against *E. coli*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* by the disc diffusion method. In this study, the ethyl acetate fraction also gave the strongest activity against *S. aureus*. Quercetin-3-O-rhamnoside, isolated from the ethyl acetate fraction of *Anacardium occidentale* L. leaves, also revealed a good antimicrobial activity against all studied strains (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *P. fluorescence* NCIB 3756, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus subtilis* NCIB 3610, *Klebsiella pneumoniae* (clinical strain) and *Clostridium sporogens* NCIB 532).<sup>39</sup> The combination between two isolated compounds, quercetin-3-O-rutinoside and quercetin-3-O-rhamnoside, also revealed a higher antimicrobial activity than all extracts, which confirms

**Table 3** Cytotoxic properties of *M. nivellii* leaves in human tumor cell lines and non-tumor liver primary cells

	Crude aqueous extract	Ethyl acetate fraction	Butanol fraction	Ellipticine
<b>Human tumor cell lines (GI<sub>50</sub> values. <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>				
MCF-7 (breast carcinoma)	29 ± 2 <sup>a</sup>	16 ± 1 <sup>b</sup>	30 ± 2 <sup>a</sup>	0.91 ± 0.04
NCI-H460 (non-small cell lung cancer)	72 ± 4 <sup>b</sup>	49 ± 3 <sup>c</sup>	89 ± 7 <sup>a</sup>	1.03 ± 0.09
HeLa (cervical carcinoma)	61 ± 5 <sup>a</sup>	15 ± 1 <sup>c</sup>	37 ± 3 <sup>b</sup>	1.91 ± 0.06
HepG2 (hepatocellular carcinoma)	223 ± 19 <sup>c</sup>	18 ± 1 <sup>b</sup>	27 ± 2 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.2
<b>Non-tumor cells (GI<sub>50</sub> values. <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>				
PLP2 (porcine liver primary cells)	97 ± 6 <sup>b</sup>	112 ± 3 <sup>a</sup>	71 ± 5 <sup>c</sup>	3.2 ± 0.7

GI<sub>50</sub> values (mean ± SD) correspond to the sample concentration achieving 50% of growth inhibition in human tumor cell lines or in liver primary culture PLP2. In each row, different letters mean significant differences between *M. nivellii* extract and fractions ( $p < 0.05$ ).

the synergistic effect of these two compounds.<sup>39</sup> Ellagitannins have been also reported to present high antimicrobial activity,<sup>40</sup> which can explain the high antibacterial potential of the herein studied samples.

Overall, the differences found in the bioactive properties of the aqueous extract and the organic fractions can be related to the different profiles and quantities of phenolic compounds present in each sample. To the authors' best knowledge, the current study is the first report on the individual phenolic profile of *M. nivellii* leaves and evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, cytotoxic and antibacterial activities. The present study also confirms the traditional medicinal use of *M. nivellii*, highlighting the bioactive potential of ellagitannin and flavonoid derivatives.

## Acknowledgements

The authors are grateful to the Foundation for Science and Technology (FCT, Portugal) and FEDER under Programme PT2020 for financial support to CIMO (UID/AGR/00690/2013), L. Barros contract and S. Heleno (SFRH/BPD/101413/2014) grant. We greatly acknowledge the MESRS of Algeria for the financial support that allowed us to complete the internship period at the IPB in the PNE program. The authors are also grateful to the Interreg España-Portugal for financial support through the project 0377\_Iberphenol\_6\_E).

## References

- 1 S. Pacifico, S. Galasso, S. Piccolella, N. Kretschmer, S. P. Pan, P. Nocera, A. Lettieri, R. Bauer and P. Monaco, *Arabian J. Chem.*, 2015, DOI: 10.1016/j.arabjc.2015.06.026.
- 2 Y. Guo, K. Sakulnarmrat and I. Konczak, *Toxicol. Rep.*, 2014, **1**, 385–390.
- 3 N. Martins, L. Barros, M. Henriques, S. Silva and I. C. F. R. Ferreira, *BioMed Res. Int.*, 2015, **2015**, 1–14.
- 4 S. Wang, N. Moustaid-Moussa, L. Chen, H. Mo, A. Shastri, R. Su, P. Bapat, I. S. Kwun and C. L. Shen, *J. Nutr. Biochem.*, 2014, **25**, 1–18.
- 5 M. Carocho and I. C. F. R. Ferreira, *Anticancer Agents Med. Chem.*, 2013, **13**, 1236–1258.
- 6 M. Carocho and I. C. F. R. Ferreira, *Food Chem. Toxicol.*, 2013, **51**, 15–25.
- 7 N. Martins, L. Barros and I. C. F. R. Ferreira, *Trends Food Sci. Technol.*, 2016, **48**, 1–12.
- 8 T. P. Cushnie and A. J. Lamb, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2011, **38**, 99–107.
- 9 N. Simas Frauches, T. Oliveira do Amaral, C. Bekman Diniz Largueza, A. Junger Teodoro, D. Wang and B. Ravishankar, *Br. J. Pharm. Res.*, 2016, **12**, 1–15.
- 10 A. Bouaziz, S. khennouf, M. A. Zarga, S. Abdalla, A. Baghiani and N. Charef, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2015, **5**, 19–28.
- 11 C. Messaoud, A. Laabidi and M. Boussaid, *J. Food Sci.*, 2012, **77**, 941–947.
- 12 F. Ramdane, M. H. Mahammed, M. Didi, O. Hadj, A. Chanai, R. Hammoudi, N. Hillali, H. Mesrouk, I. Bouafia and C. Bahaz, *J. Med. Plants Res.*, 2015, **9**, 820–827.
- 13 W. Rached, H. Benamar, M. Bennaceur and A. Marouf, *J. Biol. Sci.*, 2010, **10**, 316–324.
- 14 M. Touaibia and F. Chaouch, *J. Fundam. Appl. Sci.*, 2015, **7**, 77.
- 15 M. Touaibia and F. Z. Chaouch, *Phytotherapie*, 2017, **15**, 16–22.
- 16 S. M. F. Bessada, J. C. M. Barreira, L. Barros, I. C. F. R. Ferreira and M. B. P. P. Oliveira, *Ind. Crops Prod.*, 2016, **89**, 45–51.
- 17 L. Barros, E. Pereira, R. C. Calhella, M. Dueñas, A. M. Carvalho, C. Santos-Buelga and I. C. F. R. Ferreira, *J. Funct. Foods*, 2013, **5**, 1732–1740.
- 18 F. Sobral, A. Sampaio, S. Falcão, M. J. R. P. Queiroz, R. C. Calhella, M. Vilas-Boas and I. C. F. R. Ferreira, *Food Chem. Toxicol.*, 2016, **94**, 172–177.
- 19 R. M. V. Abreu, I. C. F. R. Ferreira, R. C. Calhella, R. T. Lima, M. H. Vasconcelos, F. Adegas, R. Chaves and M. J. R. P. Queiroz, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**, 5800–5806.
- 20 M. I. Dias, L. Barros, P. Morales, M. Cámara, M. J. Alves, M. B. P. P. Oliveira, C. Santos-Buelga and I. C. F. R. Ferreira, *Food Funct.*, 2016, **7**, 4523–4532.
- 21 M. Sanz, E. Cadahia, E. Esteruelas, A. M. Muñoz, B. F. De Simon, T. Hernandez and I. Estrella, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 9631–9640.
- 22 M. Carocho, L. Barros, A. Bento, C. Santos-Buelga, P. Morales and I. C. F. R. Ferreira, *BioMed Res. Int.*, 2014, **2014**, 232956.
- 23 C. C. Wyrepkowski, D. L. M. G. Da Costa, A. P. Sinhoro, W. Vilegas, R. A. De Grandis, F. A. Resende, E. A. Varanda and L. C. Dos Santos, *Molecules*, 2014, **19**, 16039–16057.
- 24 I. Fecka, *Phytochem. Anal.*, 2009, **20**, 177–190.
- 25 D. Fracassetti, C. Costa, L. Moulay and F. A. Tomás-Barberán, *Food Chem.*, 2013, **139**, 578–588.
- 26 M. Viuda-martos, E. Sendra, J. A. Pérez-Alvarez, J. Fernández-López, M. Amensour and J. Abrini, *J. Essent. Oil Res.*, 2011, **23**, 1–9.
- 27 A. Romani, M. Campo and P. Pinelli, *Food Chem.*, 2012, **130**, 214–221.
- 28 R. Bobinaite, P. Viskelis, Č. Bobinas, A. Mieželiene, G. Alenčikiene and P. R. Venskutonis, *LWT – Food Sci. Technol.*, 2016, **66**, 460–467.
- 29 X. J. Duan, W. W. Zhang, X. M. Li and B. G. Wang, *Food Chem.*, 2006, **95**, 37–43.
- 30 W. Rached, R. C. Calhella, Â. Fernandes, A. M. Carvalho, M. Bennaceur, A. Marouf, L. Barros, C. Santos-Buelga, I. C. F. R. Ferreira, A. Acquaviva, S. Bilotto and G. L. Russo, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 72768–72776.
- 31 P. Pereira, M.-J. Cebola, M. C. Oliveira and M. G. Bernardo-Gil, *J. Supercrit. Fluids*, 2016, **113**, 1–9.
- 32 L. Wang, Y. C. Tu, T. W. Lian, J. T. Hung, J. H. Yen and M. J. Wu, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 9798–9804.
- 33 K. K. Li, J. M. Peng, W. Zhu, B. H. Cheng and C. M. Li, *J. Funct. Foods*, 2017, **30**, 159–167.

- 34 J. Liberal, G. Costa, A. Carmo, R. Vitorino, C. Marques, M. R. Domingues, P. Domingues, A. C. Gonçalves, R. Alves, A. B. Sarmento-Ribeiro, H. Girão, M. T. Cruz and M. T. Batista, *Arabian J. Chem.*, 2015, DOI: 10.1016/j.arabjc.2015.11.014.
- 35 I. Khan, S. Paul, R. Jakhar, M. Bhardwaj, J. Han and S. C. Kang, *Biomed. Pharmacother.*, 2016, **84**, 789–799.
- 36 C. Lin Luo, Y. Qiong Liu, P. Wang, C. Hua Song, K. Juan Wang, L. Ping Dai, J. Ying Zhang and H. Ye, *Biomed. Pharmacother.*, 2016, **82**, 595–605.
- 37 A. Klimaszewska-Wiśniewska, M. Hałas-Wiśniewska, M. Izdebska, M. Gagat, A. Grzanka and D. Grzanka, *Acta Histochem.*, 2017, **119**, 99–112.
- 38 T. Mert, T. Fafal, B. Kivçak and H. T. Öztürk, *J. Fac. Pharm.*, 2008, **37**, 191–199.
- 39 O. O. Ajileye, E. M. Obuotor, E. O. Akinkunmi and M. A. Aderogba, *J. King Saud. Univ., Sci.*, 2015, **27**, 244–252.
- 40 E. Barrajon-Catalán, S. Fernández-Arroyo, D. Saura, E. Guillén, A. Fernández-Gutiérrez, A. Segura-Carretero and V. Micol, *Food Chem. Toxicol.*, 2010, **48**, 2273–2282.

## RÉSUMÉ

Dans ce travail, trois plantes ont été étudiées, à savoir *Myrtusniveleii*, *Osyrisquadripartia* et *Tetraclinisarticulata*. Elles sont connues pour leurs propriétés thérapeutiques en Algérie et dans certains pays d'Afrique. Ce travail se concentre sur l'évaluation du potentiel biologique et la caractérisation phytochimique des extraits bruts aqueux et des fractions organiques d'acétate d'éthyle et de *n*-butanol, de chacune de ces plantes. L'activité antioxydante est testée à l'aide de quatre différentes méthodes (DPPH, FRAP,  $\beta$ -carotène et TBARS). L'activité anti-inflammatoire est évaluée sur des macrophages de souris RAW 264.7 stimulée par LPS par la méthode de Griess. L'activité cytotoxique est réalisée sur des lignées cellulaires cancéreuses (Hela, MCF-7, HepG2 et NCI-H460) par la méthode de sulforhodamine B (SRB). L'activité antimicrobienne des extraits est évaluée sur de souches bactériennes à Gram<sup>+</sup> et à Gram<sup>-</sup> (la méthode de micro-dilution en milieu liquide). Parallèlement, la caractérisation des composés phénoliques est effectuée par la technique de la chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrettes de diodes et à la spectrométrie de masse par ionisation par électrospray (HPLC-DAD-ESI / MS). L'ensemble des résultats obtenus montre que les espèces étudiées présentent un grand potentiel bioactif, avec une contribution significative des composés phénoliques.

### Mots clés:

*Myrtusniveleii*; *Osyrisquadripartia*; *Tetraclinisarticulata*; Antioxydante; Anti-inflammatoire; Antibactérienne; Cytotoxicité; Polyphénols; Flavonoïdes; HPLC-DAD-ESI/MS.