

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Ibn Khaldoun-Tiaret
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master académique

Domaine : **Sciences de la Nature et de la Vie**

Filière : **Sciences Biologiques**

Spécialité : **Toxicologie et sécurité alimentaire**

THÈME

**Etudes des activités antioxydants et
antimicrobiennes *d'Asplénium ceterach***

Présenté par

BRAHIM Amina

BRAIKI Djahida

MEBROUK Sarah

Soutenu publiquement le 29/06/2020

DEVANT LE JURY D'EXAMEN COMPOSÉ DE

Président: **Dr.DAHMANI Oualid**

MCB Univ. Tiaret

Examineur: **Dr.ABBAS.M**

MCA Univ. Tiaret

Promoteur: **Dr.NEGADIM**

MCB Univ. Tiaret

Année Universitaire : 2019/2020

REMERCIEMENT

*Nous tenons à remercier Allah de nous avoir donnés
la santé, la volonté, la foi et le courage pour réaliser ce travail.
Nous tenons à remercier également toutes les personnes qui nous ont
aidés et soutenus en particulier :*

*Notre promoteur : Monsieur : Mohamed Negadi ; pour avoir accepté
de diriger notre travail par ses conseils, sa disponibilité et ses
orientations.*

*Monsieur : Dr. DAHMANI Oualid ,pour avoir acceptée de présider
le jury.*

*Monsieur : Dr.ABBAS.M ,pour avoir accepté d'examiner notre
travail.*

*Madame : Hamed Djahira ; Ingénieure de laboratoire (LMBAFS) de
l'université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem , Qui nous a
vraiment aidées dans notre travail en termes de conseils et
d'orientation Merci.*

*Enfin toute notre sympathie et nos remerciements vont également à
tous
ceux et celles, qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de
ce mémoire.*

Dédicaces

*A laide d'Allah le tout puissant, qui ma tracée le chemin de ma vie,
j'ai pu réaliser ce travail que je dédie:*

*A mes chers Parents : **Abdelkader** et **Malika Routel** ; sans qui, je n'en serais pas là aujourd'hui. Merci pour tout leur amour et leur soutien depuis toujours. Ils ont su me donner toutes les chances pour réussir. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, la conséquence de leurs efforts ainsi que l'expression de me plus affectueuse gratitude.*

A mes chers grands - parents : qui m'ont toujours soutenus par leur mots et prières et encourages à aller plus loin.

A toute ma chère famille :

*Mes frères : **Bilal**, **Ayoub**, **Mohamed**, **Moamine***

*Mes sœurs : **Hadjer**, **Chaïmaa***

qui m'ont soutenue et étaient toujours avec moi.

A Mes oncles , tantes , cousins et cousines ; Merci.

*A mes adorables amies : **Lakhdari Samiha** , **Iness Rayan** , **Hebri Saadia** , **Madani Hakima** , **Harizi Ahlem** .*

*Mes collègues **Amina** et **Djahida**.*

*A tous mes professeurs que ce soit du primaire , du moyen , du secondaire ou de l'enseignement supérieur surtout **M. Mohamed NEGADI** pour lui encadrement et **Madame HAMED Djahira** .*

*Et a toutes les étudiantes de la spécialité **Toxicologie et Sécurité Alimentaire**.*

(promotion 2019-2020)

سنكون يوما ما نريد

لا الرحلة ابتدأت ولا الدرب انتهى محمود درويش



Sarah Mebrouk

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à :

Mes très chers parents

Mon père, mon héros

Et ma reine mère

*Mon grand-père **Amar** mon deuxième papa rabi yarhimou,*

qui m'a toujours encouragé

Ma grand-mère, c'est la sagesse en soi

Mes chers frères.

*Ma seule sœur **Dhoha**,*

*Mes oncles, mes tantes particulièrement **DJAHIRA Hamed***

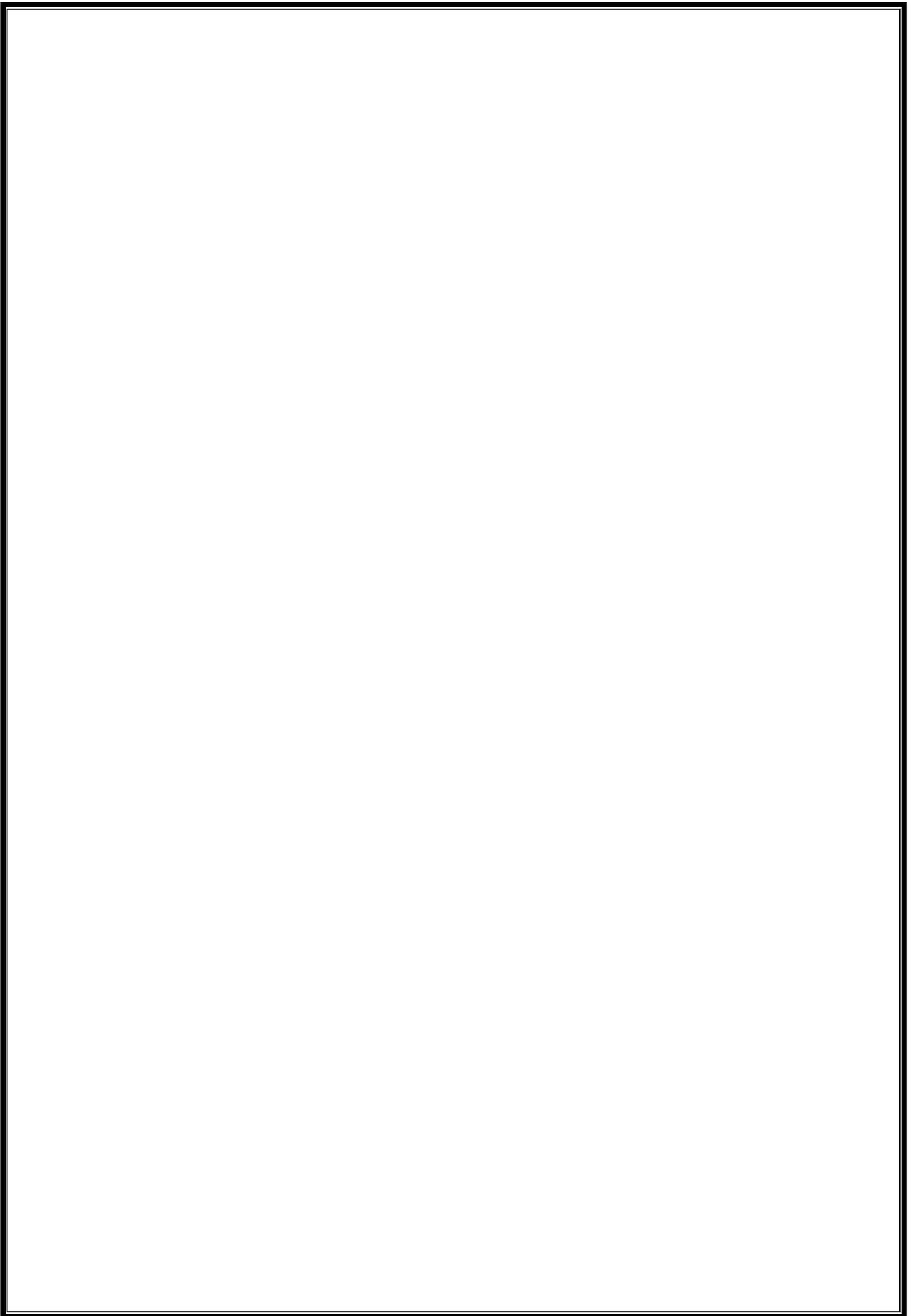
*Mes collègues **Djahida** et **Sarah***

Enfin à tous qui me sont chers.

Sans oublier la promotion de toxicologie et sécurité alimentaire 2019/2020



Amína BRAHIM



Dédicaces

Ce mémoire représente l'aboutissement de soutien et des encouragements que tout mes proches n'ont prodiguer je le dédie

spécialement :

*A mes cher parents mon père **Braïki Adda** rabi yrhmo et ma mère que dieu elle protège*

A mes très chères sœurs qui ont partager mes joies et mes stress durant la réalisation de ce mémoire

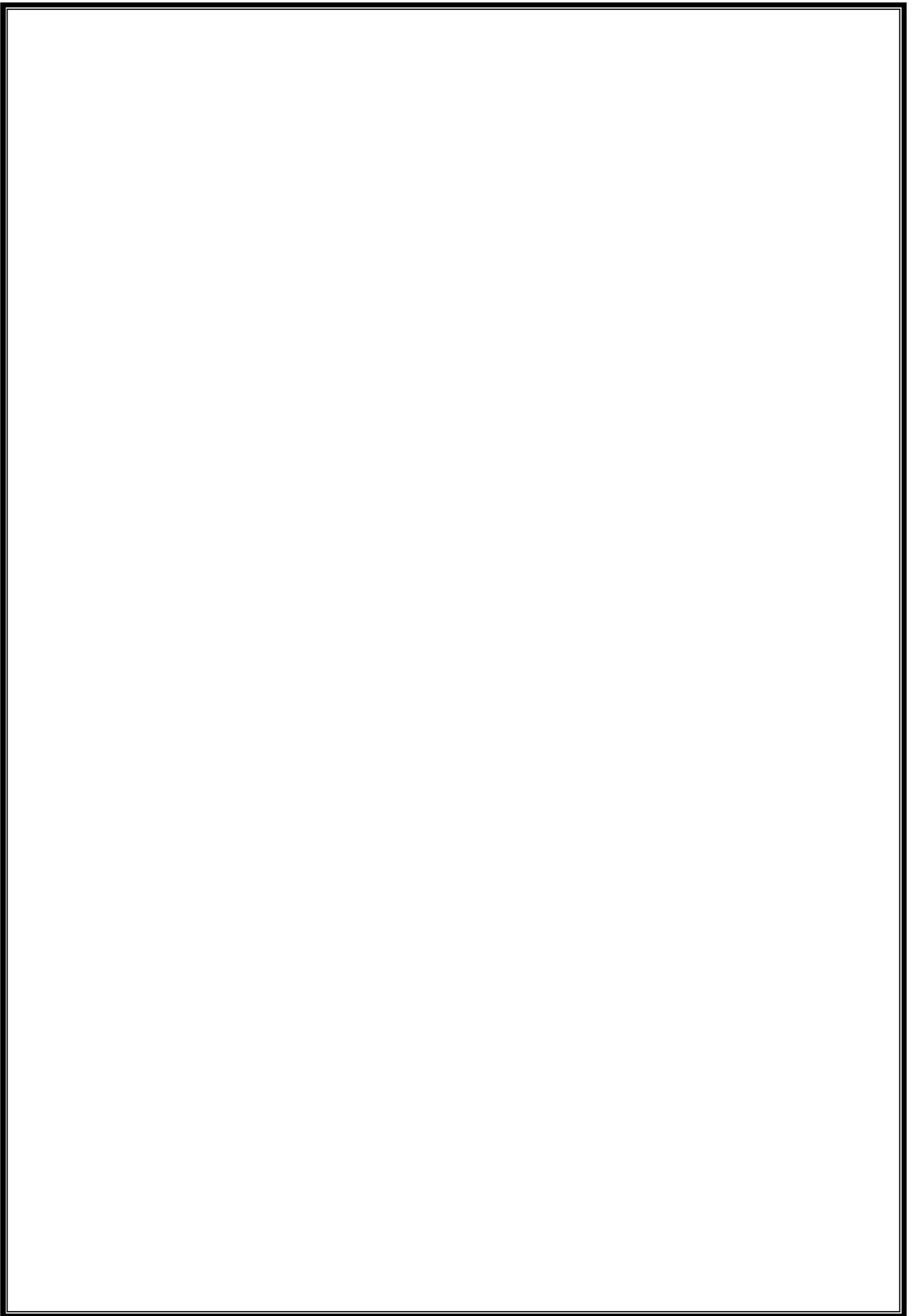
*A ma famille et mes amies surtout ma chère **BRAHIM Amina** et **SARAH Mebrouk***

Enfin à tous qui me sont chers chaqu'un a son nom

Merci de faire partie de ma vie



Djahida BRAIKI



الملخص

يعرف نبات *Asplénium ceterach* بأنه نبتة طبية تنتمي إلى عائلة، *Aspleniaceae* تنتشر هذه النبتة المعروفة باسم " العشب الذهبي " بصفة خاصة في منطقة الشمال الجزائري. تم الحصول على المستخلصات العضوية بواسطة النقع و ذلك باستعمال مذيب عضوي الميثانول فكان المردود 8% تم تحديد المحتوى الفينولي الكلي في المستخلصات باستعمال طريقة كاشفFolin - Ciocalteu وكانت النتيجة: 167,9 µg. EqAG /mg

تم تقدير الفلافونويدات باستعمال طريقة $AlCl_3$ كان تركيزها 57,07 µgEqQ/mg قدرت النشاطية المضادة للأكسدة باستعمال تقنية ارجاع الجذر الحر DPPH و كانت IC_{50} للمستخلص 492 µg/ml. حددت النشاطية المضادة للميكروبات والتركيز الأدنى للتثبيط لسبعة سلالات بكتيرية بطريقة الثقوب فكانت النتائج كما يلي: التركيز الأدنى للتثبيط (CMI) لسلالة *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 قدر بـ 0,39 mg/µl ، 1,56 mg/µl لكل من السلالتين *Proteus mirabilis* ATCC 35659 و *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 ، 3,125 mg/µl لكل من السلالتين *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 و *Escherichia coli* ATCC 25922 ، 25 mg/µl لكل من السلالتين *Candida albicans* ATCC 10231 و *Bacillus cereus* ATCC 10876. المستخلص كان مؤثرا على كل السلالات.

الكلمات المفتاحية: *Aspleniaceae* ، المستخلصات العضوية، المركبات الفينولية، النشاطية المضادة للأكسدة، النشاطية المضادة للميكروبات.

Résumé:

Asplénium ceterach est une plante médicinale appartenant à la famille des *Aspleniaceae*, cette espèce connue sous le nom de «Herbe dorée », est très répandue dans le nord algérien. Les extraits organiques ont été obtenus par macération en utilisant le méthanol comme solvant. Le rendement de cette extraction est de 8%. La teneur totale en composés phénolique a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de 167,9 µg.EqAG/mg. Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode $AlCl_3$, leur teneur est de 57,07 µg.EqQ/mg. L'activité antioxydant a été évaluée en utilisant la méthode de réduction de radical libre DPPH le IC_{50} a été estimée à 492 µg/ml. L'activité antimicrobienne a été déterminée sur six souches bactériennes et une levure, selon la méthode de diffusion en puits AWDT. La concentration minimale inhibitrice (CMI) la plus importante et celle du *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 est de 0,39 mg/µl, sur *Proteus mirabilis* ATCC 35659 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 sont de 1,56 mg/µl, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 et *Escherichia coli* ATCC 25922 sont de 3,125 mg/µl, *Candida albicans* ATCC 10231 et *Bacillus cereus* ATCC 10876 sont de 25 mg/µl. Notre extrait a montré un effet sur tous les microorganismes testés.

Mots clés : *Asplénium ceterach*, Extraits organiques, Composés phénoliques, Activité antioxydant, Activité antimicrobienne.

Abstract

Asplénium ceterach is a medicinal plant belonging to the Aspleniaceae family, this species known as «Golden Grass», is widespread in northern Algeria. Organic extracts were obtained by maceration using methanol as a solvent. The efficiency of this extraction is 8%. The total content of phenolic compounds was determined using the Folin-Ciocalteu reagent, it is 167.9 µg.EqAG/mg. The flavonoids were evaluated using the AlCl₃ method, their content is 57.07 µg.EqQ/mg. Antioxidant activity was evaluated using the free radical reduction method IC₅₀ DPPH was estimated to be 492 µg/ml. Antimicrobial activity was determined on six bacterial strains and one yeast, using the AWDT well diffusion method. The highest minimum inhibitory concentration (MIC) and that of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 is 0.39 mg/µl, on *Proteus mirabilis* ATCC 35659 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 are 1.56 mg/µl, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 and *Escherichia coli* ATCC 25922 are 3,125 mg/µl, *Candida albicans* ATCC 10231 and *Bacillus cereus* ATCC 10876 are 25 mg/µl. Our extract showed an effect on all the microorganisms tested.

Key words: *Aspleniaceae*, *Asplénium ceterach*, organic extracts, Phenolic compounds, antioxidant activity, antimicrobial activity.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01:	Principales classes des flavonoïdes (Narayana et al., 2001).....	16
Tableau 02:	Les souches pathogènes utilisées.....	27
Tableau 03:	Teneurs en Phénols totaux, et en flavonoïdes de l'extrait brut <i>d'Asplénium ceterach</i>	33
Tableau 04:	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'acide ascorbique et l'extrait.....	35
Tableau 05:	Les concentrations minimales inhibitrices.....	38

LISTE DES FIGURES

Figure 01 :	Photographie de <i>Asplénium ceterach</i> (Trewicket <i>al.</i> , 2004).....	11
Figure 02 :	Structure des acides benzoïques et cinnamiques.....	15
Figure 03 :	Exemple d'alcaloïdes : la nicotine (Jaber, A .2017).....	17
Figure 04 :	Structure Unité isoprène (Osbourn et Lanzotti, 2009).....	18
Figure 05 :	Echantillon de L' <i>Asplénium ceterach</i>	19
Figure 06 :	Le Matériel Végétal Broyée.....	19
Figure 07 :	Les étapes d'extraction.....	20
Figure 08 :	Les Différents étapes réalisées dans L'expérimentation.....	21
Figure 09 :	Dosage de polyphénols totaux.....	23
Figure 10 :	Dosage de Flavonoïdes totaux.....	24
Figure 11 :	Structure Chimique de radical libre et non radical.....	25
Figure 12 :	Protocole de préparation de l'enchantions de test DPPH.....	26
Figure 13 :	Mécanisme réactionnel du test DPPH.....	26
Figure 14 :	Après l'incubation a 37C° / 24h La Lecture : mesurer les zones d'inhibition.....	29
Figure 15 :	Microplaque de la CMI de souches pathogènes testés.....	30
Figure 16 :	Rendement d'extraction de l' <i>Asplénium ceterach</i>	31
Figure 17 :	Courbe étalon de l'acide gallique.....	32
Figure 18 :	Courbe étalon de Quercétine.....	33
Figure 19 :	Effet anti radicalaire d'extrait d' <i>Asplénium ceterach</i> sur la réduction du DPPH effet de l'acide ascorbique.....	34
Figure 20 :	Pouvoir antibactérien d'extrait brut de l' <i>Asplénium ceterach</i> par la méthode de diffusion en puits vis-à-vis des souches testées.....	36
Figure 21 :	Diamètre des zones d'inhibition (en mm) en présence d'extrait brut d' <i>Asplénium ceterach</i> vis-à-vis des souches testées.....	37

***LISTE DES
ABREVIATIONS***

ATCC : American Type Culture Collection

AG : Acide gallique

AlCl₃ : Trichlorure d'Aluminium

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DPPH : 2, 2-Diphényl-1-picrylhydrazyle

EqAA : Equivalent en acide ascorbique

EqAG : Equivalent en Acide Gallique

EOR : Espèces Oxygénés Réactives

EqQ : Equivalents en Quercétine

ES : Extrait Sec

H₃P MO₁₂O₄₀ : Acide Phospho-Molybdique

H₃PW₁₂O₄₀ : Acide Phospho-Tungstique

IC₅₀ : concentration inhibant 50% de l'activité des radicaux libres

OH : Radical hydroxyle

O₂ : Oxygène

O₂⁻ : Anion Superoxyde

H₂O₂ : Peroxydes d'Hydrogène

Rdt : Rendement de l'extrait

UFC : Unité Faisant Colonie

UV : Ultra-violet

TABLE DES MATIERES

Remerciement	
Dédicace	
Resumé	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction générale	

CHAPITRE I: Partie Bibliographie

I.1.généralités sur <i>Asplénium cétérach</i>	11
I.1.1. La classification d' <i>Asplénium ceterach</i>	12
I.1.2. Usages	12
I.2. L'étude des activités antioxydants et antimicrobienne d' <i>Asplénium ceterach</i>	12
I.2.1.Activité antioxydant	13
I.2.1.1.Radicaux libres	13
I.2.1.2 Espèces réactives de l'oxygène(EOR).....	13
I.2.1.3.Stress oxydatif	13
I.2.1.4 Les antioxydants.....	14
I.2.2.Mécanisme d'action des antioxydants.....	14
I.2.2.1 Le principe actif de la plante médicinale.....	14
I.2.3. Les groupes des principes actifs.....	15
I.2.3.1 polyphénols.....	15
I.2.3.2 Acides phénoliques.....	15
I.2.3.2 les flavonoïdes	16
I.2.3.3 Tanins	17
I.2.3.4 Lignines.....	17
I.2.3.5 Alcaloïdes.....	17
I.2.3.6 Terpènes	17
I.3. Activité antimicrobienne.....	18

CHAPITRE II: Matériels et Méthodes

II.1. Matériels.....	19
II.1.1 Matériel végétal.....	19
II.2. Méthodes.....	19
II.2.1. Préparation de l'extrait méthanol <i>d'Asplénium ceterach</i>	19
II.2. 2. Le Rendement Obtenue.....	22
II.2. 3. Dosage des Polyphénols Totaux.....	22
II.2. 4. Dosage des Flavonoïdes totaux	23
II.2.5. Mesure du pouvoir antioxydant.....	24
II.2.5.1. Évaluation de l'activité Anti-radicalaire du radical libre DPPH.....	24
II.2.6. Activité antimicrobienne	27
II.2.6.1. Méthode de diffusion en puits AWDT.....	27
II.2.6.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	29

CHAPITRE III: Résultats et discussion

III.1. Rendement d'extraction <i>d'Asplénium ceterach</i>	31
III.2. Taux de polyphénol et de flavonoïde totaux.....	32
III.2.1 Taux de Polyphénols totaux	32
III.2.2. Taux de Flavonoïde totaux	33
III.3. Evaluation du pouvoir antioxydant (Test de DPPH).....	34
III.3.1. Calcul des pourcentages d'inhibitions I%.....	34
III.3.2 Evaluation de l'IC50.....	35
III.4. Pourvoir de l'activité antimicrobienne de <i>l'Asplénium ceterach</i>	35
III .4.1. resultat Méthode de diffusion en puits AWDT.....	36
III.4.2. Résultat de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	38

Conclusion

Références bibliographiques

INTRODUCTION
GENERALE

Introduction

Les plantes ont constitué le premier et principal outil thérapeutique à la disposition de l'homme et ce, pendant de nombreux siècles. Dans diverses civilisations et sur tous les continents, les pharmacopées végétales se sont développées et enrichies grâce à l'empirisme. Avec un don d'observation inégalé, les anciens ont pu mettre en évidence des propriétés curatives ou préventives des plantes médicinales qui n'ont d'ailleurs, jamais été démenties par l'usage (Carillon, 2009).

En effet près de la moitié des médicaments que nous utilisons ont une composition d'origine végétale, et la quart renferme des extraits ou des molécules actives provenant directement des plants. Ainsi, par l'intermédiaire des médicaments de synthèse ou d'hémisynthèse autant que par le biais de la phytothérapie, les plants constituent le mode de traitement le plus répandu dans le monde, y compris dans les pays occidentaux (Adida et al . 2016). Environ 170 000 molécules bioactives ont été identifiées à partir de plantes. (Chaabi, 2008).

Les métabolites secondaires, les composés phénoliques représentés majoritairement par les flavonoïdes, suscitent de plus en plus l'intérêt des chercheurs car ils sont considérés comme de très puissants antioxydants. (Sarni- Manchado et Cheynier. 2006)

L'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée. Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve l'espèce de *Asplénium ceterach* est un exemple éloquent d'une espèce qui n'a pas été exclue de l'étude, malgré son utilisation dans la médecine populaire locale. Toutes ces considérations nous ont amenés à réfléchir aux possibilités d'évaluer les effets thérapeutiques de ces derniers pour en bénéficier et encourager sa culture du fait qu'elle soit rare et peu exploitée. Cette recherche s'inscrit dans une contribution au renforcement de notre patrimoine naturel en terre d'Algérie, et son objectif est de caractériser le phénol ainsi que d'étudier les activités antioxydants et antimicrobienne d'*Asplénium ceterach*.

Notre travail de recherche comporte deux parties :

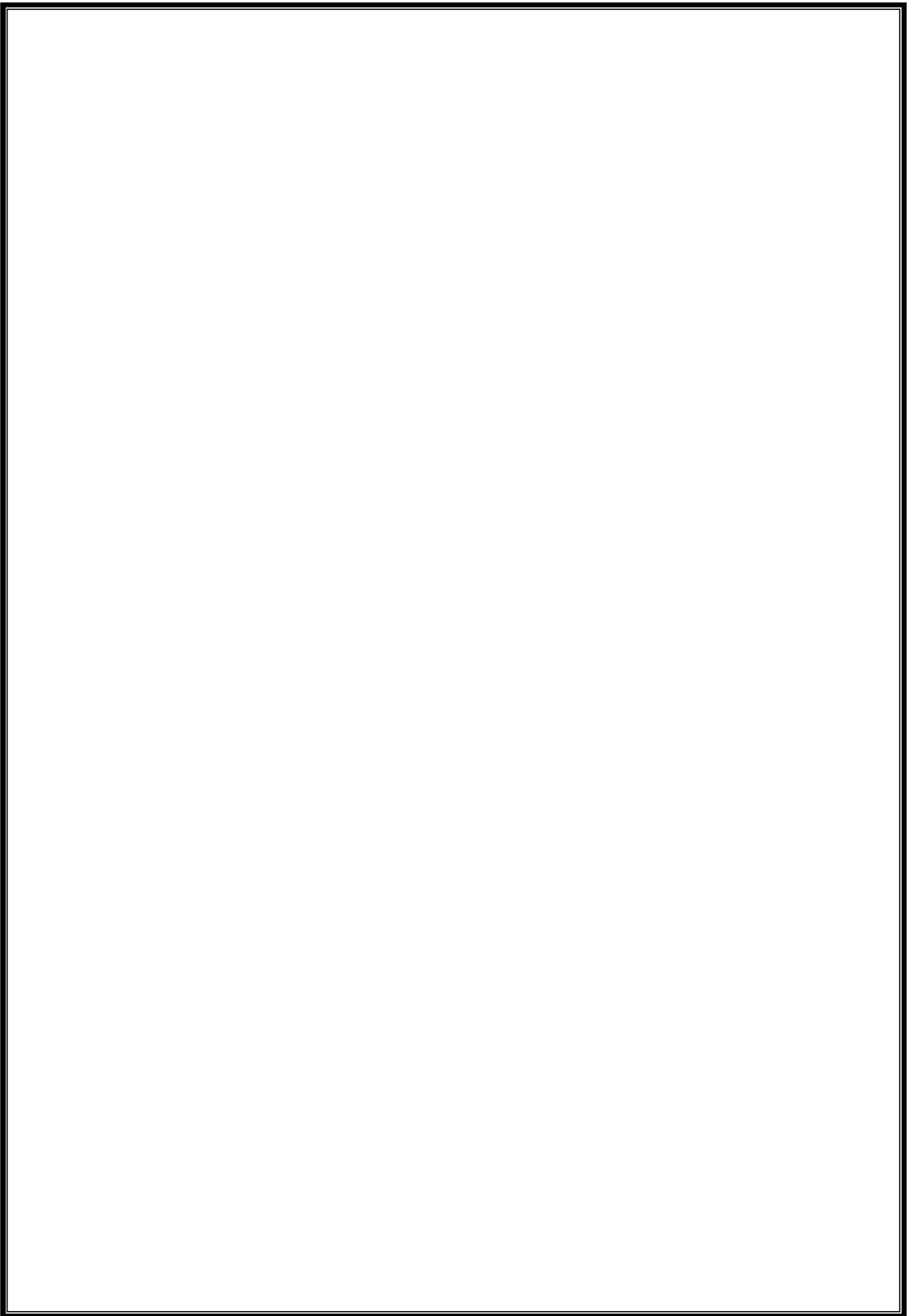
La première partie se compose une étude bibliographique avec deux chapitres

- Présentation de la plante étudiée ;
- Activités biologiques, (l'activité antioxydants et antimicrobiennes).

La deuxième partie présente les matériel et les méthodes d'extraction des composés Phénoliques et qui utilisés dans notre travail. Et l'évaluation de leurs activités antioxydants et

antimicrobienne et présentation des résultats obtenus et leurs discussions. En fin, une conclusion générale comporte les principaux résultats obtenus.

CHAPITRE I
PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE



I.1.généralités sur *Asplénium ceterach* :

La plante qui fait l'objet de ce travail est appelée *Asplénium ceterach*, dénommée aussi Doradille ou encore Herbe dorée, une fougère de de la famille des Aspleniaceae Adaptée à la sécheresse (les feuilles s'enroulent) grâce à une aptitude à l'anhydrobiose et la reviviscence. C'est une plante commune des fentes des rochers (plante chasmophyte) et vieux murs calcaires (plante lithophyte). (NCBI, 2017). « Centre américain pour les informations biotechnologiques » Taxonomy - NCBI » sur www.ncbi.nlm.nih.gov (consulté le 30 août 2017)

Asplénium ceterach est une plante vivace de 5-15 cm, à souche courte, épaisse, gazonnante (Figure 01). Ses feuilles sont en touffe, roulées en crosse dans leur jeune âge, étalées, à pétiole court et couvert d'écailles, étroitement oblongues, pennatiséquées, à lobes courts, ovales-obtus, entiers ou crénelés, alternes, confluent, épais, glabres et verts en dessus, couverts en dessous d'écailles brillantes d'abord argentées puis roussâtres. La fructification est disposée à la face inférieure des feuilles en sores allongés, droits, épars, placés obliquement sur la nervure médiane, dépourvus d'indusie. Adaptée à la sècheresse ; par temps sec les feuilles s'enroulent et présentent les écailles qui limitent l'évapotranspiration. C'est une plante commune des rochers et vieux murs calcaires (Trewick *et al.*, 2004).



Figure 01 : Photographie de *Asplenium ceterach* (Trewicket *al.*, 2004)

I.1.1. La classification de *Asplénium ceterach* : est donnée comme suit (Tison & de foucault 2014):

Règne : Plantae ;

Sous-règne : Tracheobionta ;

Division : Pteridophyta ;

Classe : Filicopsida ;

Ordre : Polypodiales ;

Famille : Aspleniaceae ;

Genre : *Asplénium* ;

Espèce : *Asplénium ceterach*. L., 1753



Plante de L'*Asplénium ceterach*

I.1.2. Usages :

La plante médicinale *Asplénium ceterach* est peu étudiée, néanmoins quelques propriétés et utilisations traditionnelles ont été rapportées comme son usage contre les calculs rénaux, la diarrhée, les troubles intestinaux, la névralgie ainsi que les troubles de la prostate et gastro-intestinaux (Karadeniz et al., 2015). L'infusion, faite en faisant bouillir 20 g de plante entière dans 1 L d'eau pendant 20 min, est un excellent diurétique par prise de 2 à 3 tasses par jour (Antonone et al., 1988). Il est publié dans le journal « The Lancet » que le traitement par une décoction de l'*Asplénium ceterach* fait partie des singularités thérapeutiques des calculs biliaires (The Lancet, 1887). Cette plante est douée également d'un potentiel antioxydant intéressant et des activités antimicrobiennes et protectrices contre les dommages de l'ADN (Berk et al., 2011).

I.2. L'étude des activités antioxydants et antimicrobienne de *Asplénium ceterach*

Au cours des métabolismes normaux de cellules (respiration, nutrition, réaction immunitaire ou après exposition à des molécules toxique (pollution, radiation..), certaines molécules sont créées et peuvent avoir un effet néfaste sur l'organisme. parmi ces molécules, les espèces oxygénées réactives (EOR), sont formées à partir de l'oxygène(O₂). De ce type sont soit des radicaux libres tell que l'anion super oxyde (O₂⁻), ou le radical hydroxyle OH), soit des molécules non radicalaire tell que le peroxydes d'hydrogène (H₂O₂) (Haleng et al.2007 ;Agbo et al.2015 ; Leila 2018).

I.2.1.Activité antioxydant

I.2.1.1.Radicaux libres

Un radical libre peut être défini comme tout espèces capables d'existence indépendante qui contient un électron non apparié dans un orbitale atomique (Halliwell et al.1989 ;Is Young.2001).en général les radicaux libres sont neutralisés par l'organisme à l'aide de molécules antioxydantes. Ces dernières agissent comme source d'électrons, et réduisant ainsi leurs effets nocifs sur la cellule (Mak et Newton.2001).

Dans ce cas, l'équilibre oxydants /antioxydants est en équilibre et le corps se protège par divers systèmes antioxydants contre les radicaux formés (Pincemail et al.,2002 ;Durand et al.,2003), lorsque l'organisme n'arrive plus à maintenir entre la production des radicaux libres et leur neutralisation on parle de stress oxydatif (Popovici et al.2009 ;Djahra 2014 ;Agbo et al.2015 ; Leila 2018).

I.2.1.2 Espèces réactives de l'oxygène (EOR)

Les radicaux dérivés de l'oxygène représentent la classe la plus importante d'espèces radicalaires générées dans les systèmes vivants (Grassi et al., 2010). Ce sont des molécules très réactives qui sont constamment produites par des réactions enzymatiques dans les cellules (Pérez-Pérez et al., 2013). Il existe plusieurs ERO comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le radical super oxyde (O₂•⁻) et le radical hydroxyle (HO•) (Ivanov et al., 2013).

I.2.1.3.Stress oxydatif

La notion de stress oxydatif est définie comme le corps à également été incapable de défense contre l'agression des espèces oxygénées réactives (EOR), suite à un déséquilibre, soit à la production d'EOR qui augmente, soit à une diminution de la capacité de défense antioxydante (Sies H.1991).

Le stress oxydatif n'est pas une maladie en soi c'est une terre favorable au développement de maladies différentes, telle que les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives (Alzheimer, parkinson..), ou le cancer (M. Morina et al.2002). L'organisme se protège en permanence de la formation et de l'agression de ces substances oxydantes grâce à divers mécanismes défensifs enzymatiques et non enzymatiques identifiés par le terme antioxydants.

I.2.1.4 Les antioxydants

Les antioxydants sont un groupe de molécules qui empêchent directement la production ou limitent la propagation ou la destruction des espèces d'oxygènes et peuvent fonctionner en réduisant ou en décomposant ces espèces, en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant le fer libre (Favier.2003).

- **le rôle**

Le rôle physiologique des antioxydants tel que suggère dans cette définition et de prévenir les dommages aux composants cellulaires résultants de réaction chimiques impliquant des radicaux libre (Is. Young, JV. Woodside.2001).

Ces derniers peuvent être produits en excès à cause des agents externes les (pollution, les radiation, UV), de ce notre système endogène de défense se trouve incapable de réduire toutes ces espèces réactives, notre organisme a alors besoin d'une alimentation riche en antioxydants. parmi ces antioxydants, on trouve les vitamines C ,E et A, ainsi que les polyphénols (Venkatachalam et Muthukrishnan.2012).

I.2.2.Mécanisme d'action des antioxydants

(Lamina et al., 2013; Liochev, 2013) Les antioxydants peuvent protéger l'organisme contre les effets néfastes des espèces réactives comme suit:

- Inhibition de la formation des radicaux libres.
- Neutralisation des radicaux libres.
- Augmentation du système de défense du corps.
- Réparation des dommages résultants de radicaux libres

I.2.2.1 Le principe actif de la plante médicinale

Le principe actif sont des molécules présentes dans une médecine des plantes ou dans une préparation à base de plantes médicinales (Pelt.1980), les principe actif à un intérêt thérapeutiques ou préventif, elle provient des plantes fraîches ou desséchées, et peut être citée comme faisant partie des racines, des feuilles, des fleurs, des graines.(Benghanou.2012).

Les plantes possèdent des métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées par les plantes autotrophe, qui sont divisés principalement en trois familles : les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes (Lutge et al., 2002 ; Abderrazak et Joël., 2007) .

I.2.3. Les groupes des principes actifs

I.2.3.1 polyphénols

Les polyphénols ou composés phénoliques, en désigne un vaste ensemble de substances qui possèdent un cycle aromatique à 6 carbones, portant un ou plusieurs groupement hydroxyle (poly- hydroxyle), Plusieurs milliers d'entre eux ont été décrits et caractérisés chez les végétaux, Ils sont subdivisés en sous-classes : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les lignines, les tanins (Jean.JM., 1996)

Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits (Boizot et Charpentier., 2006).

I.2.3.2 Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des petites molécules, constituées d'un noyau benzénique et au moins d'un groupe hydroxyle, elles peuvent être estérifiées, étherifiées, (Wichtl et Anton.2009), parmi cet ensemble très diversifié, les acides hydroxy-benzoïques ou hydroxy - cinnamiques, jouent un rôle important en raison de leur abondance et de leur diversité dans la plupart des organes végétaux consommés par l'homme. (Jean.J.M.1996).

Les phénols possèdent des activités anti-inflammatoires, antiseptiques et analgésiques. (Iserin et al., 2001). (Figure 02)

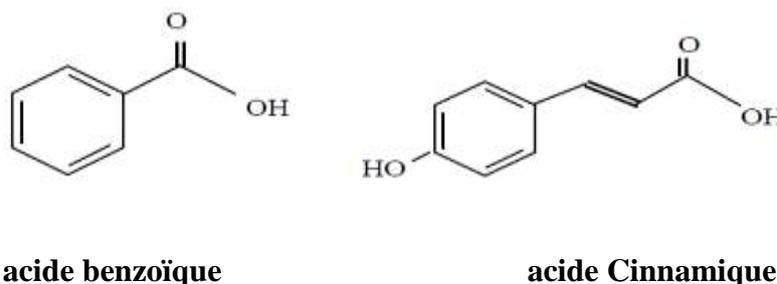


Figure 02 Structure des acides benzoïques et cinnamiques

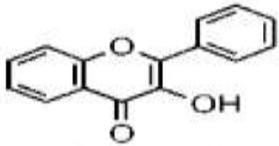
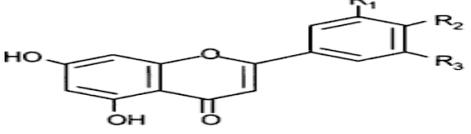
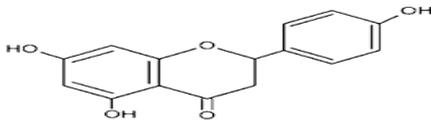
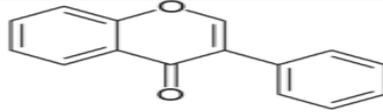
I.2.3.2 les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques naturels (Seyoum et al., 2006), le terme en latin ; flavus = jaune. Ont une structure de C₆-C₃-C₆ à poids moléculaire faible (Wichtl et Anton, 2009). souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Ghestem et al.,2001 ; Bruneton ,J.1999).

Les flavonoïdes ont des sous-groupes caractérisés à contenant deux ou plusieurs cycles aromatiques existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, chacun portant une ou plusieurs groupes hydroxyles phénoliques et reliées par un pont carbone,(Hellier et Forkmann.1993).

La plupart des plantes vasculaires, contiennent des flavonoïdes. le flavonoïde sont classes en plusieurs sous classes tell que flavonols, flavones, flavonones, isoflavones, et les catéchines par la structure de l'anneau C (Toshio .A. et al .2000).

Tableau 1: Principales classes des flavonoïdes (Narayana et al., 2001)

classe	Structure chimique	Exemple
Flavonols		-kaempferol -myricetine -quercetine
Flavones		-apigénine -lutéoline -diosmétine
Flavonones		-Eriodictyol
Isoflavones		-Daidézine -Genistéine

I.2.3.3 Tanins

Les tanins sont des polyphénols, possédants la propriété de précipiter les protéines, elle est utilisée par l'homme, pour tanner les peaux des animaux, est très ancienne, qui sont classiquement. (Jean, J.M.1996), subdivisées en deux catégories

-Tanins hydrolysables dérivés de l'acide gallique. (Jean, J.M.1996).

-Tanins condensés, formes à partir des flavonols et des flavanes-3,4-diols. (Jean, J.M.1996).

I.2.3.4 Lignines

Sont composés qui s'accumulent dans les parois cellulaires (sclérenchymes, ou noyau de fruits), au niveau de la sève brute qui permet aux fibres de rigidité, est après avoir attaché trois unités phénoliques, de base appelées monolignols, de caractère hydrophobe. (Sarni .M et Cheynier.2006).

I.2.3.5 Alcaloïdes

Le terme alcaloïde du grec (Eidos= aspect), est un composé organique hétérocyclique, d'origine naturelle (le plus souvent végétale), azoté, plus ou moins basique, et certains sont très toxiques, (Jean, B.2009 ;Jaber, A.2017). à ce jour, si l'origine végétale est prépondérante plus de 27683 alcaloïdes différents ont été isolés à partir de sources végétales, animales, ainsi qu'à partir de microorganismes. (Amirkia et al.2014 ;Jaber, A.2017).

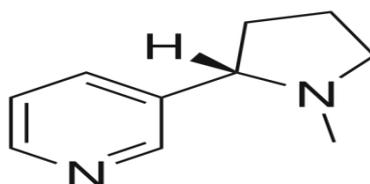


Figure 03 : Exemple d'alcaloïdes : la nicotine (Jaber, A .2017).

les alcaloïdes jouent aussi le rôle d'antibiotique. (Cushnie et al.2014 ; Jaber, A.2017).

I.2.3.6 Terpènes

Les terpanoïdes sont une large famille de composés naturels, d'environ 15000, (Wichtl et al.2009). sont généralement des solvants naturels, existant dans nombreuses plantes.

Ils comprennent des hydrocarbures avec des unités d'isoprène de la formule (C₅H₈), et peuvent être dérivés principalement d'huiles essentielles, de résines, et d'autres produits aromatiques végétaux.(Celine, D.T ; et al . 2012).



Figure 04: Structure Unité isoprène (Osbourn et Lanzotti, 2009).

I.3. Activité antimicrobienne

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutané-muqueux. Pour résister à ces micro-organismes de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut schématiquement en distinguer 3 groupes : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise (Kaufmann, 1997).

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (Billing et Sherman, 1998).

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhesines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

CHAPITRE II
MATERIELS ET
METHODES

II.1 Matériel

II.1.1 Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé au cours de cette étude *l'Asplénium ceterach* (Figure 05) récoltée en mois de Janvier ; Février 2020 sur les rochers du massif de Guezoul. Wilaya de Tiaret.

Au laboratoire, le matériel végétal récolté est lavé plusieurs fois avec l'eau de robinet afin d'éliminer l'excès de sels, les grains de sol et autres particules; puis séché à l'abri de la lumière et de l'humidité pendant quelques semaine. Une fois séchée, la matière végétale à été broyée en poudre à l'aide d'un mixeur, et conservé jusqu'aux jours d'extraction (Figure 5 et 6).



Figure 05 : Echantillon de *L'Asplénium ceterach* **Figure 06 :** Le Matériel Végétal Broyée.

- **Objectifs d'expérimentation**

L'objectif général de ce travail est de déterminer le contenu en Polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux dans *l'Asplénium ceterach*. Ensuite mesurer le pouvoir antioxydant des composés phénoliques contenu dans l'extrait de la plante étudié.

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation de l'extrait méthanol *d'Asplénium ceterach*

Après séchage et broyage *d'Asplénium ceterach*, 70g du matériel végétal et soumis a une agitation pendant 24h à température ambiante, dans 400 ml du méthanol (99%).

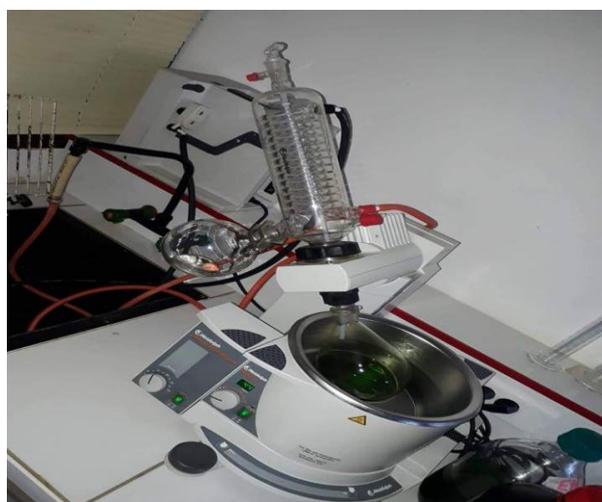
L'extrait ensuite filtrés sur papier Whatman , puis le résidu a été récupéré dans un autre récipient avec 400 ml d'éthyle acétate 99% et laissé sous agitation pendant 30 mn puis les suspensions sont encore filtrées par un papier wathman. Les deux filtrats obtenus ont été mélangés pour être séchés par évaporation du solvant à 45° avec un rota-vapeur (buchi). La solution récupérée est séchée dans l'étuve à 45°C pendant 72h afin d'obtenir un résidu sec, c'est l'extrait brut méthanol pour *Asplénium ceterach* (figure 07).



Agitation.



Filtration



Evaporateur.



L'extrait brut

Figure 07 : Les étapes d'extraction

Les étapes de l'expérimentation sont présentées dans la (Figure 08) :

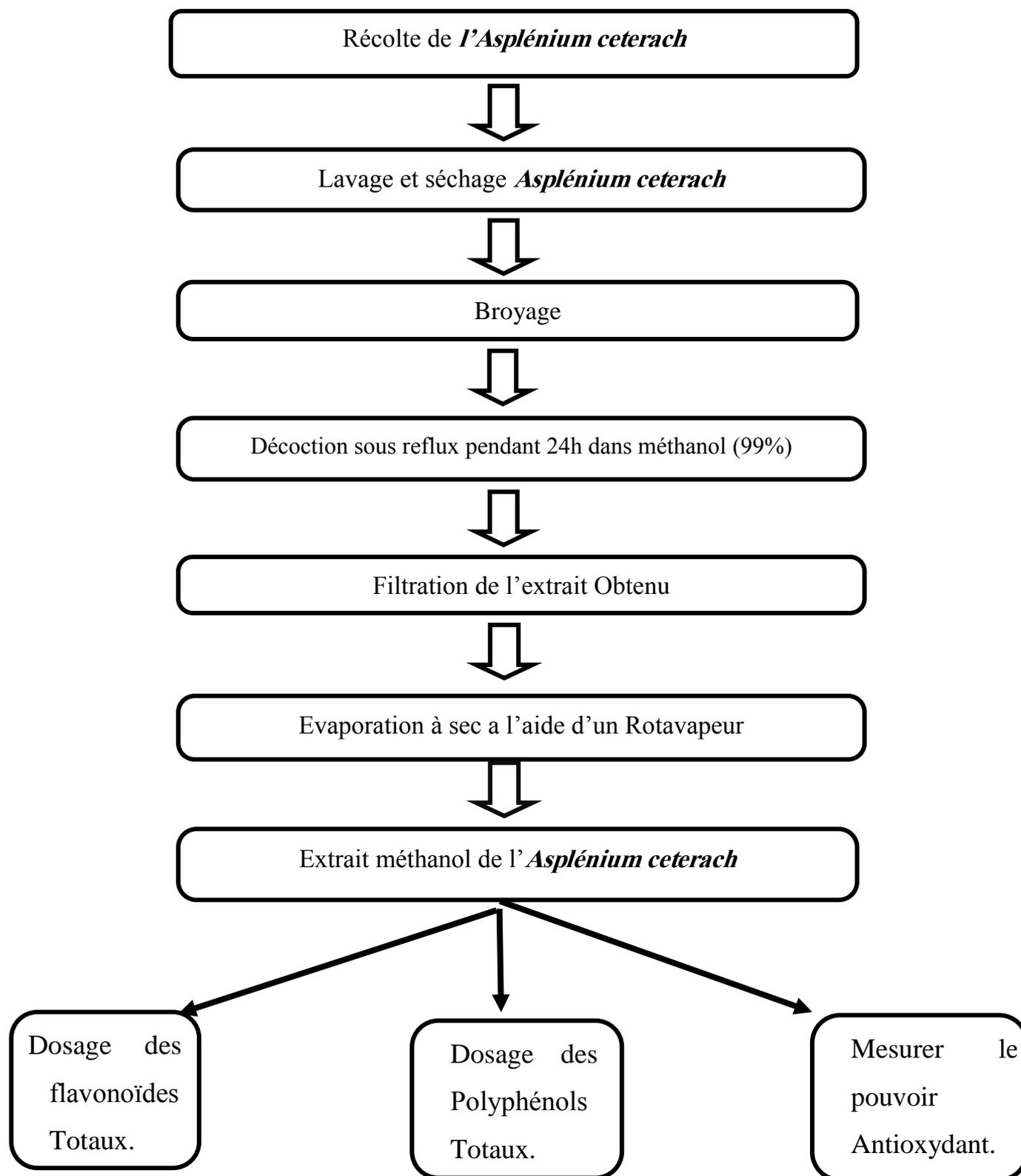


Figure 08: Les Différents étapes réalisées dans L'expérimentation.

II.2. 2 Le Rendement Obtenue

Le rendement de l'extraction est déterminé par le rapport entre la masse des Polyphénols extraits et la masse de la matière première végétale traité. Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante:

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{\text{P2} - \text{P1}}{\text{P3}} \times 100$$

P1: Poids du ballon après évaporation.

P2: Poids du ballon avant évaporation.

P3: Poids de la matière végétale de départ.

II.2. 3. Dosage des Polyphénols Totaux

Ce dosage repose sur la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué d'un mélange d'acide ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$). L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés dont l'absorbance est comprise entre 725 et 760 nm (Ribéreau-Gayon,1968).

- **Méthode**

Un Volume de 0.2ml d'extrait a été mélangé avec 1 ml de méthanol pur Dans 5 tubes, depuis le 2^{ème} tube on fait une dilution (1/2 ; 1/4 ; 1/6) avec l'agitation des tubes. Ensuite 0.1 ml de chaque échantillon a été mélangé avec 1 ml de méthanol pur avec 0.5 ml de Folin-Ciocalteu (10%). Après 5 minutes, on rajoute 1ml d'une solution de Carbonate de sodium (6%). Le mélange est soumis une agitation puis incubé a température ambiante a l'obscurité pendant 1h et l'absorbance est lue a 765 nm sur un Spectrophotomètre. L'acide gallique est utilisé comme standard de référence. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait sec ($\mu\text{g EqAG}/\text{mg ES}$).

Les étapes de dosage de Polyphénols totaux sont présentées dans la (Figure 09):

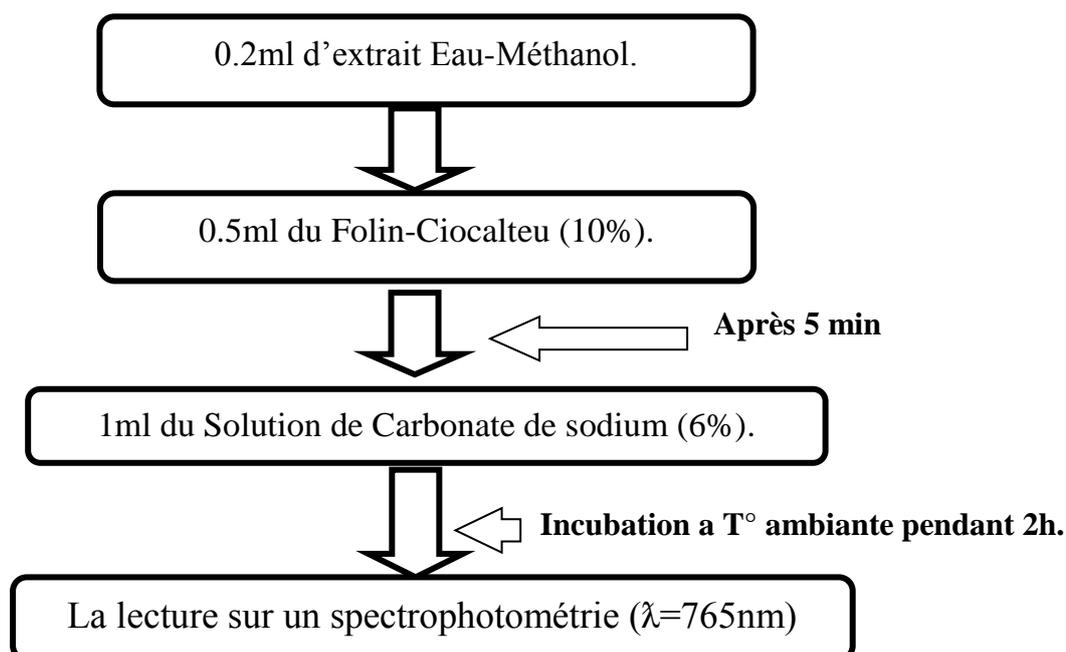


Figure 09 : Dosage de polyphénols totaux.

- **Courbe d'étalonnage de l'acide gallique**

La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations de 0.1 au 10 µg/l, dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage. Les résultats sont ainsi exprimés en microgramme d'équivalents d'acide gallique par milligramme de matière végétale fraîche.

II.2. 4. Dosage des Flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes sont quantifiés par une méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl₃) 2%. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes, qui absorbe dans le visible à 510 nm (Ardestani et Yazdanparast, 2007).

- **Méthode**

Un volume de 0.5 ml d'extrait a été additionné à 0.5 ml de Chlorure d'aluminium à 2% (AlCl₃) dans le tube 1. 0.5 ml depuis le 1^{er} tube, a été mélangé avec 0.5 ml de Chlorure d'aluminium dans le tube 2, jusqu'au 4^{ème} tube, le mélange obtenu a été placé à température ambiante et à l'obscurité pendant 10 min puis l'absorbance a été mesurée à

430nm sur un Spectrophotomètre. Le Quercétine est utilisé comme standard de référence. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalents de Quercétine par milligramme d'extrait sec ($\mu\text{g EqQ/mg ES}$).

Les étapes de dosage de flavonoïdes totaux sont présentées dans la (Figure 10) :

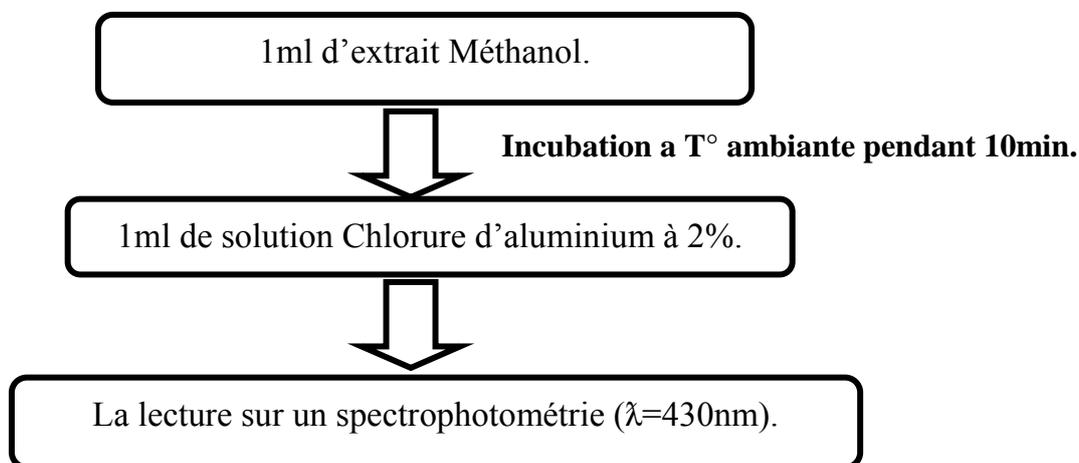


Figure 10 : Dosage de Flavonoïdes totaux.

- **Courbe d'étalonnage de la Quercétine**

La courbe d'étalonnage est effectuée par Quercétine à différents concentration de 0.1 au 10 $\mu\text{g/l}$, dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage. Les résultats sont ainsi exprimés en microgramme d'équivalents de Quercétine par milligramme de matière végétale fraîche.

II.2.5. Mesure du pouvoir antioxydant

De nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydant, *in vitro et in vivo* des composés Phénoliques purs ou d'extrait. Dans notre étude nous avons utilisé des tests chimiques qui mesurent la réduction du radical stable le DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) (Sharma, *et al.*, 2009 ; Bourkhiss *et al.*, 2010).

II.2.5.1. Évaluation de l'activité Anti-radicalaire du radical libre DPPH

La méthode du DPPH utilise un radical relativement stable, dont les antioxydants réduisent ce radical ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphénylpicryl hydrazine (Figure11). Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du DPPH ; dont la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des

antioxydants donneur de proton présents dans l'échantillon (Sanchez Moreno, 2002 ; Parejo *et al.*, 2003).

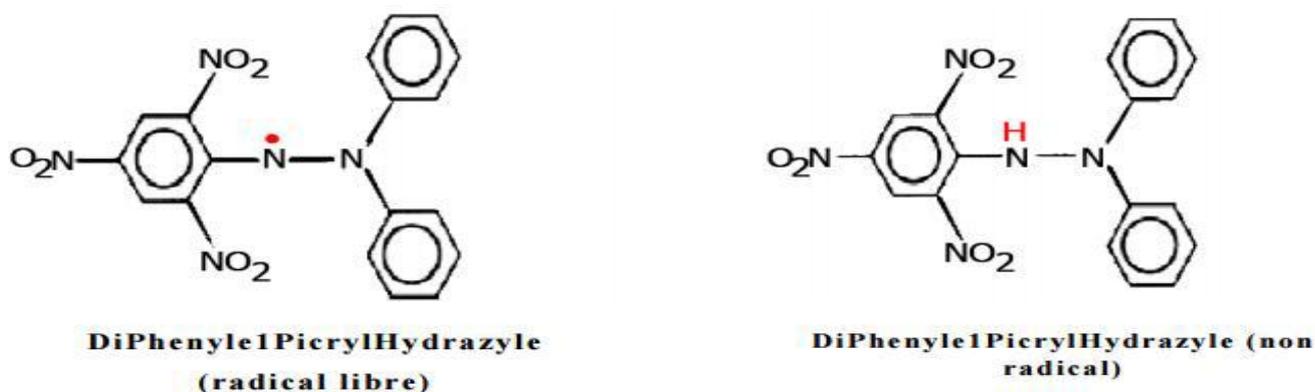


Figure 11 : Structure Chimique de radical libre et non radical.

- **Mode Opérateur**

L'effet de l'extrait sur la réduction du DPPH• à été réalisé selon le Protocole suivant (Benariba *et al.*, 2013).

- **Préparation Du DPPH**

3.15mg de DPPH est dissoute dans 100ml du méthanol pure pour obtenir une solution de DPPH.

- **Préparation des échantillons**

Un Volume de 0.2g de notre extrait est dissout dans 2 ml de méthanol (CH₃-OH) ; à partir de cette concentration, on prépare 10 tubes moins concentré que le premier, on prépare (100; 50 ; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19), Puis en ajoutant 1 ml de DPPH dans chaque tube.

Le mélange obtenu est ensuite agité, puis gardé à l'abri de lumière à température ambiante pendant 30min. Ensuite La lecture ce fait a l'aide d'un Spectrophotométrie de la densité optique à 517nm. (Figure 12)

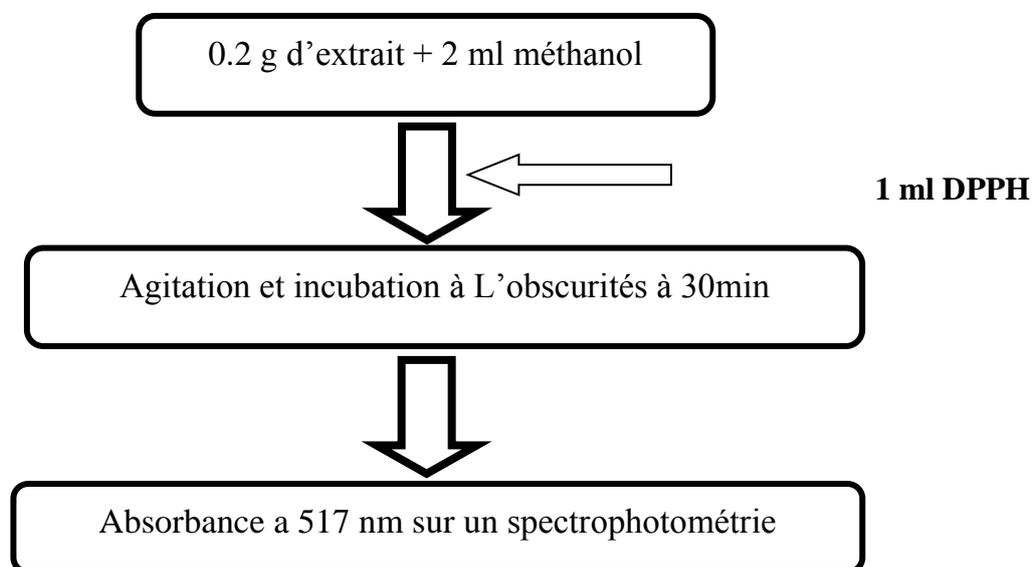


Figure 12 : Protocol de préparation de l'échantillon de test **DPPH**.

L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle positif à différentes concentrations. Le mécanisme réactionnel du test **DPPH** est présenté dans la figure suivante :

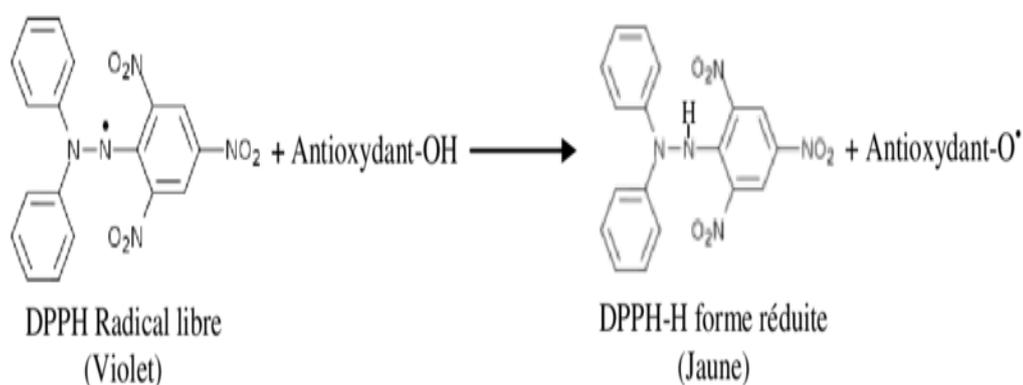


Figure 13 : Mécanisme réactionnel du test **DPPH**.

La valeur **IC50** est la concentration d'extrait qui assure la réduction de **50%** du **DPPH**, déterminée graphiquement par la régression linéaire, pour chaque extrait à partir de la courbe du pourcentage de réduction en fonction de la concentration (Samarth *et al.*, 2008).

- **Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique**

La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide ascorbique à différentes concentrations de 0.1 au 10 µg/l, dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage. Les résultats sont ainsi exprimés en microgramme d'équivalents d'acide ascorbique par milligramme de matière végétale fraîche. µg.EqAA/mg

II.2.6. Activité antimicrobienne

- **Origine des souches**

Les souches utilisées dans ce travail comportent des souches pathogènes qui proviennent de la collection du laboratoire LMBAFS [tableau 02](#).

Tableau 02 : Les souches pathogènes utilisées.

Souches	Référence
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33862
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
<i>Candida albicans</i>	ATCC10231
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 35659

Réactivation des souches

La réactivation des souches est effectuée par ensemencement des souches pathogènes dans un bouillon BHIB à 37°C pendant 24 heures d'incubation avant chaque test d'antagonisme pour obtenir une culture jeune. Puis ajuster la densité optique de 0.08 à 0,10 lue à la longueur d'onde de 625 nm qui correspond à 10⁸ UFC/ml (Kishor, 2005).

II.2. 6.1.Méthode de diffusion en puits AWDT (méthode de Barefoot et kaenhammer, 1983)

La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie (antibiogramme et antifongigramme), repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu semi solide (gélose molle), l'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en

fonction du diamètre d'inhibition la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Dans la technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit tester (Broadasky et al, 1999).

Cette méthode consiste à couler 15 ml Muller Hinton molle avec 100µl d'une culture jeune de 24h d'incubation de nombre de 10^8 UFC/ml (la densité optique 0.08-0.1) sur une boîte de pétri. Après solidification à température ambiante dans une zone stérile, des puits sont creusé à l'aide d'un embout jaune stérile. Généralement ont réalisé 1 puits par boîte de 6mm de diamètre. Un volume de 50ul de l'extrait brut est mis dans les puits.

Les boîte de pétri sont incubées à 37°C pendant 24h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (pré-diffusion) (Doumandji et al, 2010).

La présence de zone d'inhibition à formées autour des puits est examinée après 18 à 24h d'incubation (Hwanhlem et al, 2011)

La lecture des résultats se fait par la mesure de diamètre des zones d'inhibition apparaissant ; il sera considéré comme positif si le diamètre est supérieur à 2 mm



Cultures jeunes des souches pathogènes testées



100µl d'inoculum +15ml milieu Semi-solide (séché pendant 30mn)



Embout jaune stérile
Diamètre,=6mn



Réalisation des puits



Extrait brut



Remplis les puits par 50 µl d'extrait brut

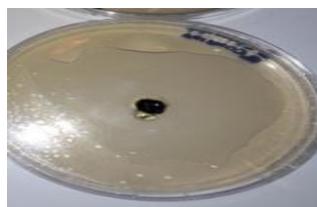


Figure 14 : Après l'incubation a 37C° / 24h La Lecture : mesurer les zones d'inhibition

II.2.6.2.Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

Généralement la concentration minimale inhibitrice (CMI) est considérée comme étant la plus faible concentration de substance antimicrobienne capable d'inhiber la croissance visible d'un microorganisme donné après un temps d'incubation de 24h (Ganière *et al.*, 2004)

La détermination de la CMI a été réalisée par la Méthode de micro dilution sur milieu liquide selon CLSI (Clinical and Laborztory Standards Institute) (2008).

Dans cette technique, des microplaques à fond rond (96puits) sont utilisées pour déterminer la concentration minimale inhibitrice, dans chaque ligne de la microplaque, est déposé 100 µl du bouillon nutritif BHIB.

Ensuit, 200 µl de l'extrait brut à tester sont introduits dans le premier puits. Après avoir bien mélangé le contenu du premier puits ,100 µl est prélevé, puis déposé dans le 2^{ème} puits, et ainsi de suite jusqu'au 11^{ème} puits ou 100 µl restants sont éliminés. Par conséquent, nous obtenons une dilution ½ entre chaque puits .le dernier puits représentent le témoin négatifs : le puits n°12 contient uniquement le bouillon nutritif.

Enfin, 100 µl de l'inoculum ($1 \cdot 10^6$ UFC/ml) est ajouté dans chaque puits. Les microplaques sont scellées et incubées à 37 °C pendant 24h.

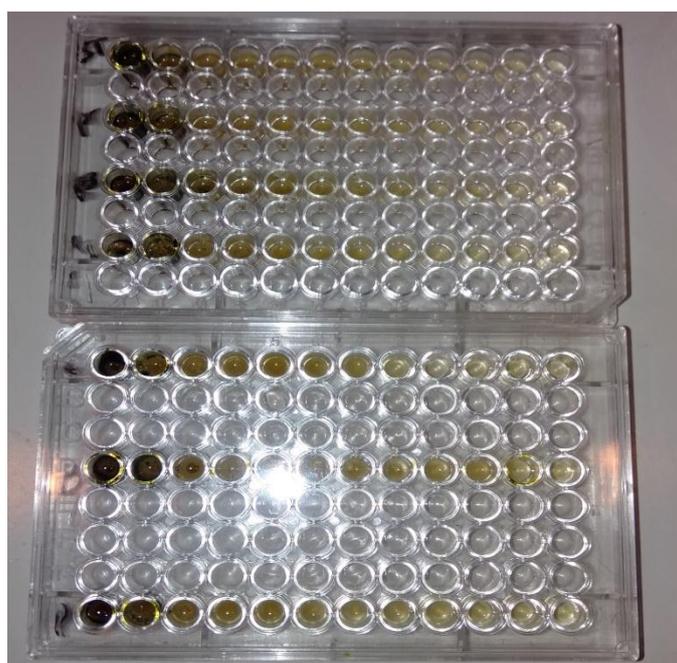


Figure 15 : Microplaque de la CMI de souches pathogènes testées

CHAPITRE III
RESULTATS ET
DISCUSSION

III.1. Rendement d'extraction d'Asplénium ceterach

Le rendement de l'extraction se calcule par le rapport entre la masse de Polyphénols extraits et la masse de la matière première végétale traitée.

Après extraction et récupération d'extrait, leur rendement a été déterminé par rapport à 100 g de matière végétale exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante:

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{P2 - P1}{P3} \times 100$$

P1 = 51,96g (poids du ballon après évaporation.)

P2 = 50,37g (poids du ballon avant évaporation)

P3 = 20g (poids de la matière végétale de départ).

Donc le rendement de l'extraction est égale **8%** rapport à 100 g de matière végétale. (Figure 16)

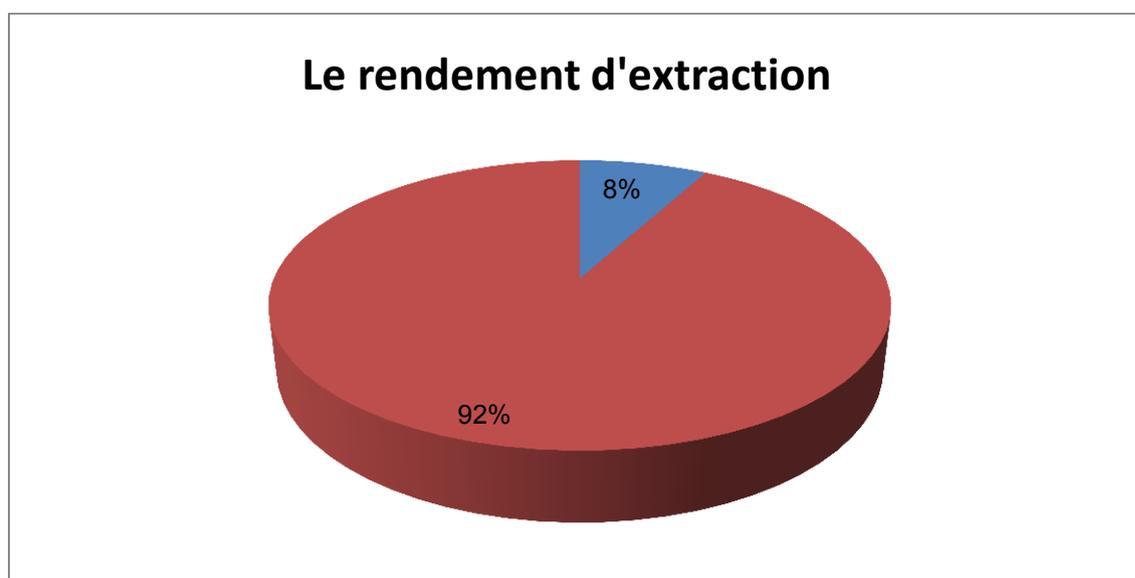


Figure 16 : Rendement d'extraction de l'Asplénium ceterach

Le calcul de la teneur de rendement d'extraction repose sur plusieurs facteurs à savoir température d'extraction, de la matière végétale initiale et l'humidité (Wattiaux,1994).

Selon Michel *et al.* (2012), le rendement des extractions dépend de la nature du solvant utilisé et des propriétés chimiques des molécules à extraire. De même, la méthode d'extraction (macération, décoction, infusion) joue également un rôle important dans la détermination du rendement ainsi que la composition chimique de l'extrait préparé (Tefiani,2015)

III.2. Taux de polyphénol et de flavonoïde totaux

III.2.1 Taux de Polyphénols totaux

La teneur en Polyphénols totaux dans l'extrait est déterminée à partir des équations de la régression linéaire de courbe d'étalonnage de l'acide gallique exprimées en $\mu\text{g.Eq}$ acide gallique par mg d'extrait (Figure 17)

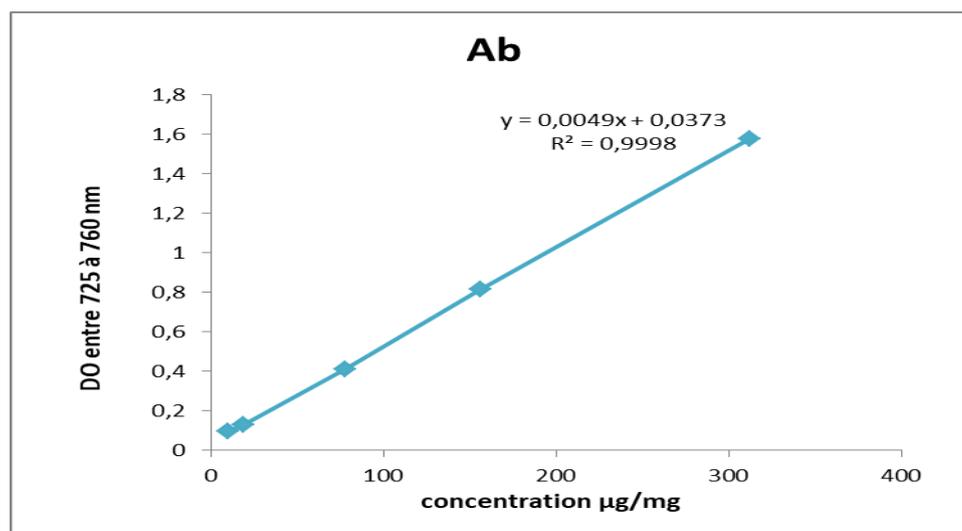


Figure 17 : Courbe étalon de l'acide gallique.

La méthode de dosage par la méthode au Folin-Ciocalteu 2% est largement utilisée pour la quantification globale des composés phénoliques. Cette méthode se base sur la réaction d'oxydoréduction entre les groupements hydroxyles des composés phénoliques et les acides phosphotungstique et molybdique du réactif de Folin-Ciocalteu. La réduction de ce dernier provoque le changement de sa couleur du jaune-verdâtre au bleu.

En effet, le réactif peut réagir avec des protéines, des sucres, l'acide ascorbique et des composés soufrés, ce qui peut influencer les résultats obtenus (Singleton et Rossi, 1965). En ce qui concerne notre étude, l'analyse des composés phénoliques montre que la teneur en Polyphénols enregistrée dans cette étude est de **167,9 $\mu\text{g. EqAG}/\text{mg}$** par mg d'extrait.

Des études récentes ont montré que les teneurs en composés phénoliques et surtout le Polyphénol, changent de façon considérable d'une espèce à une autre et à l'intérieur de la même espèce, à cause des facteurs extrinsèques (température, climat...), génétiques (la variété

et l'origine d'espèces), physiologiques (le degré de maturation des algues, les organes utilisés) et de la durée de stockage (Maisuthisakul et al., 2007; Ksouri et al., 2009).

III.2.2. Taux de Flavonoïde totaux

Équations de la régression linéaire de courbe d'étalonnage exprimées en $\mu\text{g.EQ/mg}$ Quercétine par mg d'extrait (Figure 18).

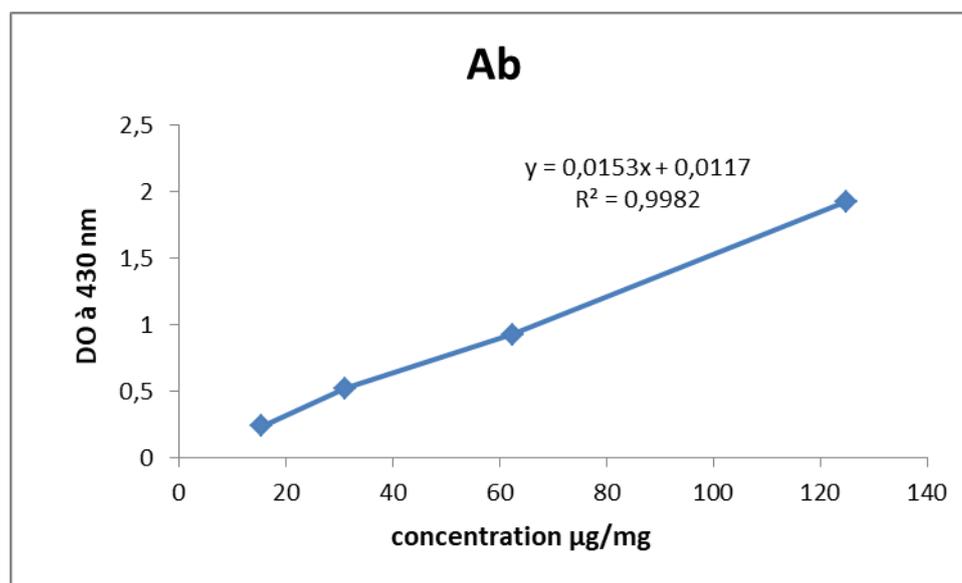


Figure 18 : Courbe étalon de Quercétine.

La teneur en flavonoïde est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage à la Quercétine. La teneur en flavonoïdes enregistrée dans cette étude est de **57,07 $\mu\text{g.EQ/mg}$** extrait.

Tableau 03 : Teneurs en Phénols totaux, et en flavonoïdes de l'extrait brut d'*Asplénium ceterach*

	Phénols totaux ($\mu\text{g EA/mg}$ extrait)	Flavonoïdes ($\mu\text{g EQ/mg}$ extrait)
Extrait Brut	167,9	57,07

D'après ces résultats nous constatons que *d'Asplénium ceterach* est riche en phénols totaux (**167,9 $\mu\text{g.EA/mg}$ extrait**) par rapport les flavonoïdes totaux (**57,07 $\mu\text{g.EQ/mg}$ extrait**).

Il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie car l'utilisation de différentes méthodes d'extraction, réduit les possibilités de comparaison entre les études (Ksouri et al., 2009).

De ce fait le méthanol reste le meilleur solvant pour extraire ces composés, cette affinité est appuyée par plusieurs travaux (Abdille *et al.*, 2005).

III.3. Evaluation du pouvoir antioxydant (Test de DPPH)

L'activité antioxydant de l'extrait d'*Asplénium ceterach* est évaluée par le test de réduction du radicale libre **DPPH**. Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est un radical de couleur violacée qui absorbe dans l'UV- visible à la longueur d'onde de 517nm, suivie par spectrophotométrie. Il fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier l'activité antioxydant des composés phénolique.

Dans ce test, le substrat est un radical libre qui, en réagissant avec une molécule antioxydant, se transforme en DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) avec perte de son absorbance caractéristique à 517 nm. Les réactions ont lieu à température ambiante et en milieu éthanolique, qui permet une bonne solubilisation de la plupart des antioxydants. Ce test est très utilisé, car il est rapide et facile, Malgré qu'elle soit couteuse.

L'étude quantitative d'acide ascorbique de l'*Asplénium ceterach*, est réalisée par des dosages spectrophotométrique. La teneur en vitamine C est exprimé en microgramme d'équivalent l'acide ascorbique par ml d'extrait (Figure 19).

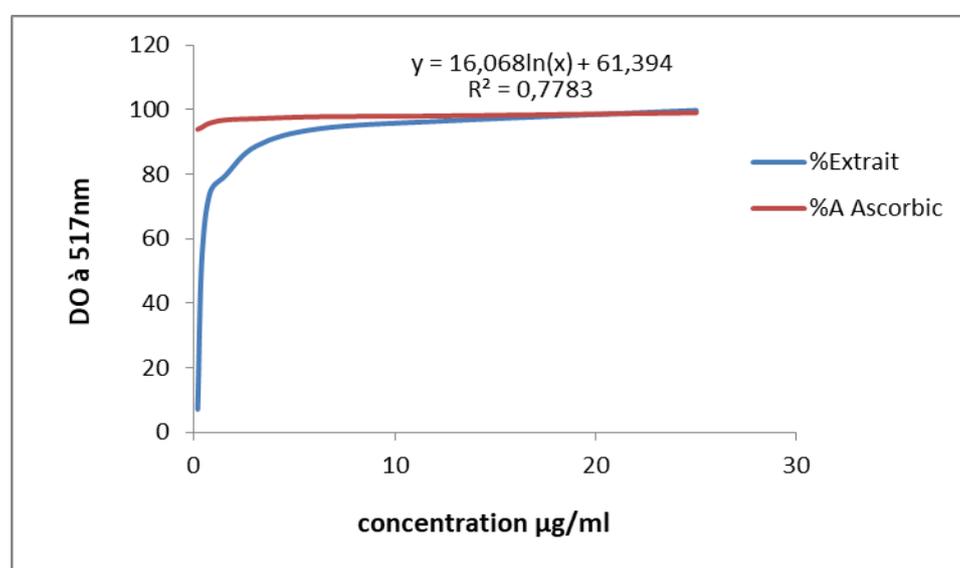


Figure 19 : Effet anti-radicalaire d'extrait d'*Asplénium ceterach* sur la réduction du DPPH effet de l'acide ascorbique

III.3.1.Calcul des pourcentages d'inhibitions I%

Les résultats du pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'extrait méthanolique de *l'Asplénium ceterach* sont illustrés dans le [Tableau 04](#)

Nous calculons les pourcentages d'inhibition par la formule suivante :

$$I\% = ((Ac - At) / Ac) * 100$$

Ac: Absorbance du contrôle négatif.

At : Absorbance de l'extrait.

Tableau04 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'acide ascorbique et l'extrait

Concentrations d'extrait (µg/ml)	50	25	12,5	6,25	3,12
% d'inhibition de l'acide ascorbique	99,7	99,03	98	97,2	96,8
% d'inhibition de l'extrait	97,9	97,6	96	88,8	79,8

III.3.2 Evaluation de l'IC50

La concentration inhibitrice à 50% (IC50) est définie comme étant la concentration de l'extrait qui permet de réduire le pourcentage d'inhibition du DPPH à 50% et il est inversement proportionnel à la capacité antioxydante. En utilisant l'équation de régression $y = 16,016 \ln(x) + 61,394$

$$50 = 16,016 \ln(x) + 61,394 \rightarrow IC50 = x = 492 \mu\text{g/ml}$$

L'IC50 est déterminée à partir d'une courbe de pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH enregistrée dans cette étude est **492 µg/ml**.

III.4. Pouvoir de l'activité antimicrobienne de *l'Asplénium ceterach* :

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antimicrobienne d'extrait brut de *l'Asplénium ceterach* par la méthode de diffusion en puits AWDT ([Barefoot et Klaenhammer, 1983](#)) sur un milieu gélosé solide, Mueller-Hinton, c'est le milieu le plus utilisé pour faire ces tests d'antagonisme.

L'activité antimicrobienne de *l'Asplénium ceterach* a été estimée en terme de diamètre de la zone d'inhibition autour des puits contenant l'extrait brut à tester vis-à-vis de 7 microorganismes testés qui proviennent de la collection du laboratoire LMBAFS, dont deux bactéries Gram positif (+) : *B. cereus* ATCC10876 et *S.aureus* ATCC 33862, et quatre bactéries Gram négatif (-) *P.aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *P. mirabilis* ATCC 35659 et *K. pneumoniae* ATCC 13883 ainsi une levure *C. albicans* ATCC 10231.

III .4.1.resultat Méthode de diffusion en puits AWDT

C'est la technique de base utilisé pour étudier la capacité substance à exercer un effet antimicrobien. D'après Les résultats obtenus, on remarque que les propriétés antimicrobiennes dans ce test ont montré que l'extrait brut de *l'Asplénium ceterach* influence totalement sur toutes les souches (Figure 20).

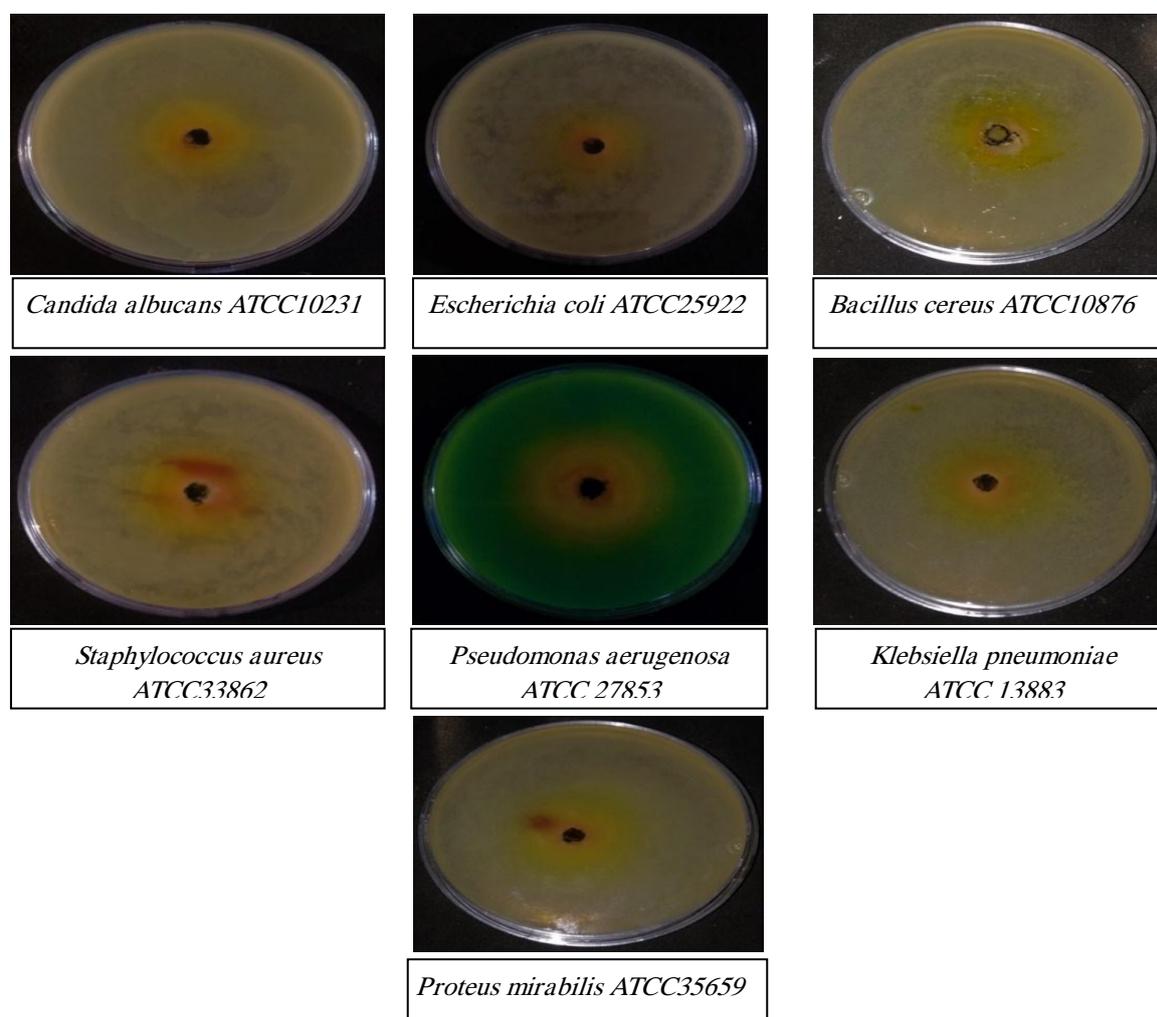


Figure 20: Pouvoir antibactérien d'extrait brut de *l'Asplénium ceterach* par la méthode de diffusion en puits vis-à-vis des souches testées.

L'extrait brut de *l'Asplénium ceterach* a montrée des diamètres d'inhibition compris entre 40 mm à 25 mm vis à vis toutes les souches. Ainsi qu'il possède une activité inhibitrice importante vis à vis la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, qui obtenu le diamètre d'inhibition 40 mm, cette inhibition est respectivement avec les souches pathogènes. *Proteus mirabilis* ATCC 35659 a enregistré un diamètre d'inhibition de l'ordre de 35 mm, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 qui obtenu le diamètre d'inhibition 33 mm, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 a marqué à son tour un diamètre de l'ordre de 31 mm, *Escherichia coli* ATCC 25922 qui obtenu le diamètre d'inhibition 30mm, *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Candida albicans* ATCC 10231 qui sont obtenu le diamètre d'inhibition 25mm (Figure 21)

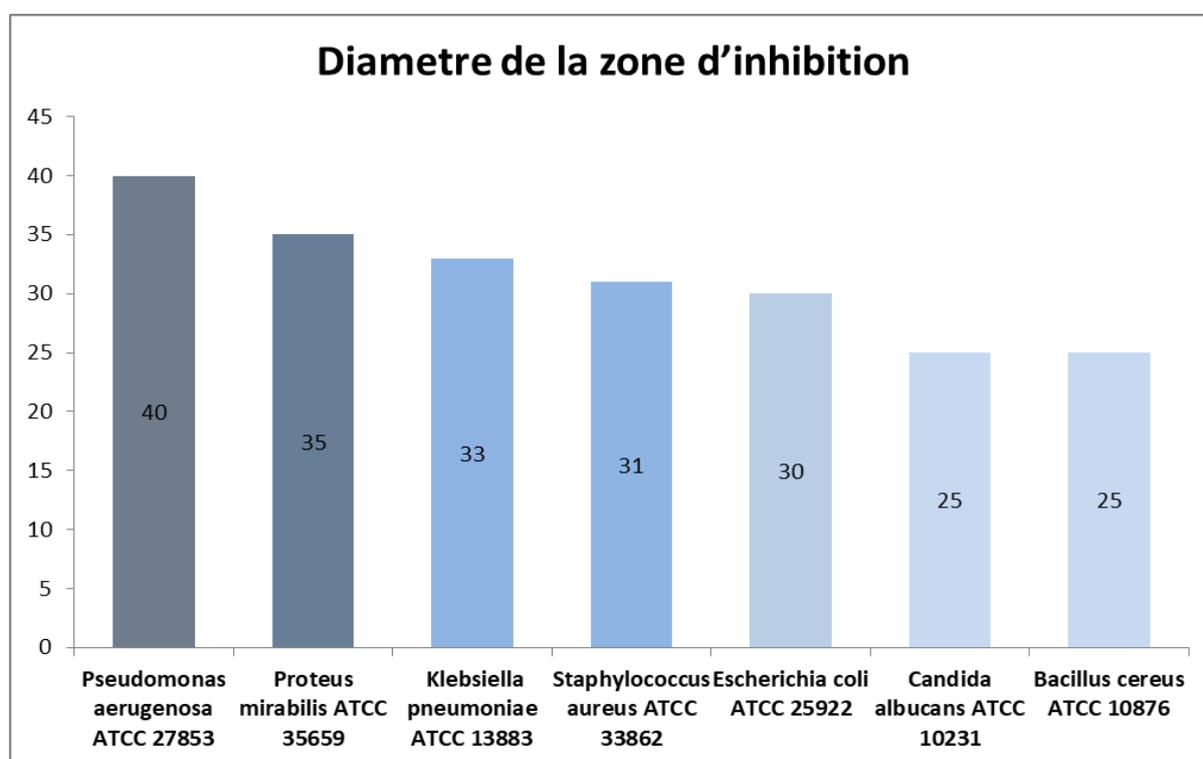


Figure 21: diamètre des zones d'inhibition (en mm) en présence d'extrait brut *d'Asplénium ceterach* vis-à-vis des souches testées.

III.4.2. Résultat de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI pour une souche pathogène donnée, représente la plus faible concentration d'extrait de *l'Asplénium ceterach* brut qui inhibe toute croissance visible après 24h d'incubation. La CMI permet de définir la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes vis-à-vis d'un inhibiteur donné.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI en mg/µl d'extrait brutµ%*m*) des différentes souches pathogènes testées dans ce travail sont respectivement variables, selon la souche, de 25 mg/µl à 0,39 mg/µl. les résultats obtenues sont représentées dans le [tableau 05](#) ci-dessous :

La souche	CIM
Souches fongique	
<i>Candida albucans ATCC 10231</i>	25mg/µl
Souche bactériennes gram positif	
<i>Bacillus cereus ATCC 10876</i>	25 mg/µl
<i>Staphylococcus aureus ATCC 33862</i>	3,125 mg/µl
Souche bactériennes gram négative	
<i>Pseudomonas aerugenosa ATCC 27853</i>	0,39 mg/µl
<i>Escherichia coli ATCC 25922</i>	3,125 mg/µl
<i>Proteus mirabilis ATCC 35659</i>	1,56 mg/µl
<i>Klebsiella pneumoniae ATCC 13883</i>	1,56 mg/µl

CONCLUSION

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Leur utilisation est en progression constante, étant donné la toxicité et les effets secondaires indésirables des molécules de synthèse. Dans ce contexte, on s'est intéressé à étudier les activités antioxydants et antimicrobiennes d'*Asplénium ceterach*

Asplénium ceterach également connu sous le nom de «*Herbe dorée* », est l'une des plantes médicinales les plus populaires. appartenant à la famille des *Aspleniaceae*, est très répandue dans le nord algérien. Utilisées depuis longtemps dans la pharmacopée traditionnelle de notre région. ont été rapportées comme son usage contre les calculs rénaux , les troubles intestinaux, les troubles de la prostate et gastro-intestinaux .

L'objectif de cette présente étude la valorisation de la plante *Asplénium ceterach* Par une estimation de la teneur des composés phénoliques et flavonoïdes, ensuite d'évaluer de la capacité antioxydante et l'activité antimicrobienne de l'extraits phénoliques de cette plante.

Dans cette étude les résultats d'extraction de la matière végétale obtenus montrent que l'extrait brut de *l'Asplénium ceterach* est récupéré avec un rendement de **8%**. La teneur en polyphénols totaux pour les extraits de *l'Asplénium ceterach* a été estimée par la méthode colorimétrique de folin ciocalteu , les résultats obtenus indiquent que l'extrait est riche en polyphénols totaux de teneur **167,9 µg.EA/mg** d'extrait) et qui est responsable à des effets antioxydants importants sur le DPPH. En parallèle la teneur en flavonoïdes a été estimée par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl₃) 2%.le total de teneur **57,07 µg.EQ/mg** d'extrait.

L'évaluation de l'effet antibactérien montre que toutes les souches bactériennes testées sont sensibles à l'extrait d'*Asplénium ceterach*. La zone d'inhibition la plus importante est obtenue par la souche bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* à l'égard de toutes les souches testées avec un diamètre de 40mm.

La méthode d'extraction joue un rôle important dans la détermination du rendement ainsi que la composition chimique de l'extraits préparés .Le rendement d'extrait dépend de la nature du solvant utilisé et des propriétés chimiques des molécules à extraire.

Les résultats obtenus in vitro ne conforme qu'une étape initiale dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, nous souhaiterons une étude in vivo, à travers laquelle, nous garantissons une vision plus approfondie sur les activités biologiques des extraits de cette plante.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références

-A-

- **Abderrazak M. et Joël R. (2007).** La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. 177p
- **Antonone R., De Simone F., Morrica P. & Ramundo E. 1988.** Traditional phytotherapy in the Roccamonfina volcanic group, Campania, Southern Italy. Journal of Ethnopharmacology. 22(3), 295–306.
- **Agbo MO., Uzor PF., Akazie-Nneji UN., Eze-Odurukwe CU., Ogbatue UB. And Mbaoji ED.2015.** Antioxidant, total phenolic and flavonoid content of selected Nigerian medicinal plants. *The Dhaka University journal of pharmaceutical Sciences*.14(1) :35-41.
- **Amirkia, V.; Heinrich, M(2014).** Alkaloids as drug leads – A predictive structural and biodiversity-based analysis. *Phytochem. Lett.*, 10, xlviii–liii.
- **Ardestani, A. and Yazdanparast, R. (2007)** Antioxidant and Free Radical Scavenging Potential of Achilleasantolina Extracts. Food Chemistry, 104,21-29.
- **Abdille M.H., Singh R.P., Jayaprakasha G.K., Jena B.S., (2005).** Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits, Food Chemistry, 90(4). 891-896.
- **Adida H., Benariba N., Bechiri A., Chekroun E., Djaziri R., (2016).** Phytochemical study and evaluation of the antiradical activity of extracts of *pituranthos scoparius*. *Phytotherapie*, 14,p207-212.

-B-

- **Berk S., Tepe B., Arslan S. & Sarikurkcü C. 2011.** Screening of the antioxidant, antimicrobial and DNA damage protection potentials of the aqueous extract of *Asplenium ceterach* DC. African Journal of Biotechnology. 10(44), 8902–8908.
- **Benghanou M., (2012).** La phytothérapie entre la confiance et mefiance. Memoire professionnel infirmier de la sante publique, *institut de formation paramédical CHETTIA (Alger)*: 56.
- **Billing J. et Sherman P.W. 1998.** Antimicrobial functions of spices: why some like it hot. *The Quarterly review of biology* 73(1), 3–49.
- **Boizot N., and Charpentier J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra*. Pp 79-82. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).
- **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3ème Ed Techniques et documentations. Paris. pp: 227-310-312-313-314.494.
- **Bourkhiss et al., (2010) :** Parties de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters du Maroc. Bulletin de la société royale des sciences de liège. 141-154.

- **Barefoot, S.F., et Klaenhammer, T.R. (1983).** Determination and activity of lactacin B, bacteriocin Produced by lactobacillus acidophilus. *Appl. Environ. Microbiol.* **45(6):** 1808-1815.
- **Benariba N, Djaziri R, Bellakhdar W, et al (2013)** Phytochemical screening and free radical scavenging activity of Citrullus colocynthis seeds extracts. *Asian Pac J Trop Biomed* 3:35–40
- **Broadsky TF, Lewis C & Ble TE - Doumandji A, Hellal A & Saidi N - Hwanhlem N, Bruneton J., (1999).** Pharmiognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2eme édition, Paris : Editions médicales internationales, Tec et Doc Lavoisier. 1120.

-C-

- **Celine, D.J., maryline, A.V., christian, G., elmaataoui, M., chemat, F. 2012** Terpenes as green solvents for extraction of oil from microalgae. *Molecules* 2012, 17, 8196-8205; *Doi:10.3390/molecules 1707896.*
- **Cowan M. M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 12 (4): 564-582.
- **Cushnie, T. P. T.; Cushnie, B.; Lamb, A. J. Alkaloids: Agents 2014** An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *Int. J. Antimicrob*, 44 (5), 377–386.
- **Clinical and Laboratory Standards Institute, M100-S18 (2008).** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Seventeenth Informational Supplement Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- **Carillon A, 2009,** Place de la phytothérapie dans les systèmes de santé au XXIème siècle. In: Conférence SIPAM, Djerba, Tunisie, Mars 2009, 7p.
- **Chaabi, M. (2008).** Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines Euphorbia stenocla Baill. (Euphorbiaceae), Anogeissus carpus Guill. Etperr. (Combrétaceae), Limoniastrum feei (Girard) Batt. (Plumbaginaceae). Thèse de doctorat en pharmaco chimie, Université Louis Pasteur et Université Mentouri, Constantine (Alger): 179, 180.

-D-

- **Djahra A. 2014.** Etude photochimique et activité antimicrobienne, antioxydant, anti hépatotoxique du marrube ou marrubium vulgare. Thèse de doctorat. *Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.*
- **Durand G., Polidori A. et Pucci B. 2003.** La vectorisation de pièges à radicaux libres. *L'actualité chimique.* 26–29.

- **Doumandji , A., Hellal, A . et Saidi, N. (2010).** Purification de la bactériocine a partir de lactobacillusacidophilus11. *Microbiol. Ind . (4)*, 25- 47.

-F-

- **Favier A. (2003).** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. pp: 108-115.

-G-

- **Ghestem A., Seguin E., Paris M., and Orecchioni A.M. (2001).** Le préparateur en pharmacie dossier 2èmeEd TEC&DOC. Paris. pp275. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).
- **Grassi D., Desideri G. and Ferri C.(2010).** Flavonoids antioxidants against atherosclerosis. *Nutrients 2:889-902*.
- **Ganière, J.P., MANGION,C. et PÉRIDY, M .(2004).** Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices et Bactéricides de la cefquinome, la marbofloxacin, la tylosine et la spiramycine en solution dans du lait vis-à-vis de bactéries isolées de mammites bovines. *Revue Méd. Vét , vol 8-9*, 411-416.

-H-

- **Haleng J., Pincemial J., Defraigne J.O., Charlier C et Chapelle J.P. 2007.** Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège .62(10) :628-638*.
- **Halliwell B., Gutteridge J.M. 1989.** Free radicals in biology and medicine, 2nd edition . Oxford: clarendon press, 1989.
- **Hellier W., Forkmann G. 1993.** Biosynthesis of flavonoids. *Chapman and hall, London: 499-535*.
- **Hwanhlem, N., Buradaleng, S., Wattanachant, S., Benjakul, S., Tani, A., Maneerat, S. (2011).** Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control, 22: 401 407*.

-I-

- **Iserin P. 2001.** Encyclopédie des Plantes Médicinales, Identification, Préparation, Soins. *Larousse, Paris. p. 335*.

- **Is Young J.V, Woodside. 2001.** Antioxidants in health and diseases; *jclin pathol* ; 54:176-186.
- **Ivanov A. V., Bartosch B., Smirnova O. A., Isagulians M. G. and Kochetkov S. N. (2013).** HCV and oxidative stress in the liver. *Viruses* 5: 439-469.

-J-

- **Jaber, Ali. 2017.** Matrices MALDI bithiophéniques spécifiques aux alcaloïdes: étude des mécanismes fondamentaux et applications. *Thèse de doctorat Chimie Analytique.*
- **Jean, B. 2009.** Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. 4 édition ; *Lavoisier.*
- **Jean, J.M. 1996.** Les composés phénoliques des végétaux :quelles perspectives à la fin du XXème siècle ? *Acta bot . Gallica*, 1996.143(6).473-479.

-K-

- **Karadeniz A., Çinbilgel İ., Gün S.Ş. & Çetin A. 2015.** Antioxidant activity of some Turkish medicinal plants. *Natural product research.* 29(24), 2308–2312.
- **Kaufmann SHE. 1997.** Host response to intracellular pathogens. *Ed. Springer ; R.G. Landes, New York; Austin, p. 345.*
- **Kishor, G. K., Pande ,S. et Podile, A.R. (2005).** Biological control of late leaf spot of Peanut (*Arachis hypogaea*) with chitinolytic bacteria. *The American Phytopathological Society* , 95 , 1157- 1165.
- **Ksouri R, Falleh H, Megdiche W, Trabelsi N, Hamdi B, Chaieb K, et al(2009).** Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L and related polyphenolic constituents. *Food Chem Toxicol.*;47:2083–91

-L-

- **Lamina S., Ezema C.I., Theresa A.I. and Anthonia E.U. (2013).** Effects of free radicals and antioxidants on exercise performance. *Oxidants and antioxidants in medical science* 2(2): 83.91.
- **Liochev S.I. 2013.** Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free radical biology and medicine* 60:1-4.
- **Lutge U., Kluge M., Bauer G. (2002).** Botanique 3ème Ed Technique et documentation. Lavoisier .Paris. 211p.

- **Leila Aït ABDERRAHIM . 2018.** Etude de l'activité biologique (antioxydante, antimicrobienne et cicatrisante) de quelques préparations thérapeutiques à base de miel et de plantes médicinales. Thèse de doctorat en sciences biologiques , Université Ibn Khaldoun de Tiaret , Algérie .

-M-

- **Mak S. and Newton G.E. 2001.** The oxidative stress hypothesis of congestive heart failure. *Chest journal*. 120: 2035-1046.
- **M.Morina, M.Martin-Mateo, J.P. Cristol et B.Canaud. 2002.** Stress oxydant, hémocompatibilité et complications de la dialyse au long cours. *Laboratoire de biochimie, service de néphrologie ;vol.23 ,N°5.pp.2001-2008.*
- **Michel T., Destandau E., Le Floch G., Lucchesi M.E., Elfakira C., (2012).** Antimicrobial,antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed, *Food Chemistry*, 131(3). 754 760.
- **Maisuthisakul M, Da-SilvaM (2007) .** Assessment of phenolics content and free radical scavenging capacity of some that indigenous plants.*Food Chem(100) : 1409-1418.*

-N-

- **Narayana K., Reddy M., Chaluvadi M., Krishana D.2001.** Bioflavonoid classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential . *Indian journal of pharmacology*. 33:2-16.

-O-

- **Osborn A.E and Lanzotti V.2009.** plant derived natural products synthesis, function and application. Edition Springer. New York:11-35.

-P-

- **Pelt J. M., 1980.** Les drogues, leur histoire et leurs effets. Edition Doin, Paris: 221.
- **Pérez-Pérez E., Vit P. and Huq F. (2013).** Flavonoids and polyphenols in studies of honey antioxidant activity. *International Journal of Medicinal Plant and Alternative Medicine* 1(4): 63-72.

- **Pincemail J. Bonjean K. Cayeux K. & Defraigne J.O. 2002.** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition, Clinique et Métabolisme*.16. pp. 233–239.
- **Popovici, C.; Saykova, I.; Tylkowski, B.2009,** *Revue de génie industriel*,4, 25-39.
- **Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Saavedra, G., Murcia, M. A., &Codina, C. (2003).** Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sciences*, 73(13), 1667-1681.

-R-

- **Ribéreau-Gayon P (1968)** Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris 254 pp.

-S-

- **Sarni-Manchado P., Veronique C., 2006.** Les polyphénols en agroalimentaires. *Collection sciences et techniques agroalimentaires, édition TEC et DOC, Paris (France): 398.*
- **Sies H., 1991.** Oxidative stress : from basic research to chemical application. *AMJ MED*,1991,91,31-38.
- **Sharma, O. P., &Bhat, T. K. (2009).** DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*, 113(4), 1202-1205. / Bourkhiss, M. B., Hnach, M., Paolini, J., Costa, J., Farah, A., &Satrani, B. (2010). Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles différentes.
- **Sanchez-Moreno C. (2002).** Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int* 8:121-137.
- **Samarth R.M., Panawar M.,Soni A., Kumar M., (2008).** Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extract, *Food Chemistry*, 106,868-873.
- **Singleton V.L., Rossi J.A., (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*,(16). 144-158.

- **Sarni-Manchado P., Veronique C., 2006.** Les polyphénols en agroalimentaires. Collection sciences et techniques agroalimentaires, édition TEC et DOC, Paris (France): 398.
- **Seyoum, A., Asres, K., & El-Fiky, F.K. (2006).** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67, 2058-2070.

-T-

- **Tison J.-M., De Foucault B. (coords), 2014,** FLORA GALLICA - FLORE DE FRANCE , Ed. Biotope (Mèze), 1196p
- **The Lancet. 1887.** The annus medicus. pp. 1-16.
- **Toshio Aoka., Tomoyoshi Akashi and shin-ichi ayabe.2000.** flavonoids of leguminous plants :structure, biological activity, and biosynthesis ; *j. plant RES -113:* 475-488.
- **Trewick S.A., Morgan- Richards M. & Chapman H.M. 2004.** Chloroplast DNA diversity of *Hieracium pilosella* (Asteraceae) introduced to New Zealand: reticulation, hybridization, and invasion. *American Journal of Botany*. 91(1), 73–85.
- **TEFIANI, I. (2015).** Contribution à l'étude phytochimique et à l'effet antioxydant des extraits d'algue verte: *Ulva linza* (Doctoral dissertation, université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen-).

-V-

- **Venkatachalam U., Muthukrishnan S. 2012.** Free radical scavenging activity of éthanolic extract of *desmodium gangeticum* . *journal of acute medicine*, 2(2),p3642.

-W-

- **Wichtl M. & Anton R. 2009.** Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Édition LAVOISIR, Paris. pp. 38–41.
- **Wattiaux David(1994)** :Prediction of the electronic equipment during a pyrotechnic shock., In first International Symposium on Environmental Testing Engineering,(23) :541-545.

