

Variabilité des teneurs en composés phénoliques et des activités biologiques chez six espèces médicinales

Variability of phenolic compound contents and biological activities in six medicinal species

M. SAADA^{1*}, M. KHEMAKHEM², R. KSOURI¹

¹Laboratoire des Plantes Aromatiques et Médicinales, Centre de Biotechnologie de Borj-Cédria, BP 901, 2050 Hammam-lif, Tunisie.

²Université de Carthage, Ecole Supérieure des Industries Alimentaires de Tunis, 58, Avenue Alain Savary, 1003 Tunis, Laboratoire de Chimie Organique Structurale : Synthèse et Etude Physicochimique, Faculté des Sciences de Tunis, Campus Universitaire 2092 - El Manar, Tunisie

*Corresponding author: saadamariem@gmail.com

Abstract - The main objective of this study is to evaluate the interspecific variability of biological capacities and phenolic composition of the aerial parts of six medicinal species (*Retama raetam*, *Nitraria retusa*, *Pituranthos tortuosus*, *Zygophyllum album*, *Juncus maritimus* and *Rubia tinctorum*). At first, a comparison of the total polyphenol, flavonoid and proanthocyanidin contents of these species was carried out. The tests used to evaluate the antioxidant activities of the plants studied consisted in determining the total antioxidant activity, the antiradical power against DPPH, the reducing power of iron and the β -Carotene bleaching test. In a second step, the antimicrobial activity against five pathogenic bacteria was also tested. The obtained results showed a significant variability of the phenolic compound contents between the six species of interest. Indeed, *R. raetam* was found to be the richest species in total polyphenols and flavonoids (23.93 mg EAG.g⁻¹MS and 3.58 mg EC.g⁻¹MS respectively) compared to other species whose contents are less than 9.36 mg EAG.g⁻¹MS and 3.26 mg EC.g⁻¹MS respectively. In addition, the analysis of antioxidant capacities confirmed the existence of an important differences between these six species. In fact, *R. raetam* showed the best anti-radical and iron reducing activities (the IC₅₀ and EC₅₀ are in the order of 23 and 410 μ g.ml⁻¹ respectively) while the extract of *J. maritimus* was significantly more efficient as to the inhibition of β -carotene bleaching. Moreover, the antimicrobial activity test also confirmed the superiority of *R. raetam* over other species, as it showed the highest inhibition diameters (ZI between 11.00 and 16.33 mm). All the results obtained attest to the superiority of the specie *R. raetam* compared to the other studied plants from the point of view of richness in phenolic compounds and biological potentialities.

Keywords: medicinal plants; antioxidant activities; antimicrobial capacity; phenolic compounds.

Résumé - Cette étude vise principalement à l'évaluation de la variabilité interspécifique des capacités biologiques et de la composition phénolique des parties aériennes de six espèces médicinales (*Retama raetam*, *Nitraria retusa*, *Pituranthos tortuosus*, *Zygophyllum album*, *Juncus maritimus* et *Rubia tinctorum*). Dans un premier temps, une comparaison des teneurs en polyphénols, flavonoïdes et proanthocyanidines totaux de ces espèces, a été réalisée. Les tests utilisés pour évaluer les activités antioxydantes des plantes étudiées ont consisté à déterminer l'activité antioxydante totale, le pouvoir antiradicalaire contre le DPPH, le pouvoir réducteur du fer et l'inhibition du blanchissement de la β -carotène. Dans un deuxième temps, l'activité antimicrobienne contre cinq bactéries pathogènes a été également testée. Les résultats obtenus ont montré une variabilité significative des teneurs en composés phénoliques entre les six espèces d'intérêt. En effet, *R. raetam* s'est avérée être l'espèce la plus riche en polyphénols totaux et en flavonoïdes (23.93 mg EAG.g⁻¹MS et 3.58 mg EC.g⁻¹MS respectivement) par comparaison aux autres espèces dont les teneurs sont inférieures à 9.36 mg EAG.g⁻¹MS et 3.26 mg EC.g⁻¹MS respectivement. En outre, l'analyse des capacités antioxydantes a confirmé l'existence de différences importantes entre ces six espèces. Par ailleurs, *R. raetam* a montré les meilleures activités antiradicalaire et réductrice du fer (les CI₅₀ et CE₅₀ sont de l'ordre de 23 et 410 μ g.ml⁻¹ respectivement) tandis que l'extrait de *J. maritimus* a été significativement plus performant quant à l'inhibition du blanchissement de la β -carotène. De surcroît, le test de l'activité antimicrobienne a confirmé également



la supériorité de *R. raetam* par rapport aux autres espèces, étant donné qu'elle a montré les diamètres d'inhibition les plus élevés (ZI entre 11.00 et 16.33 mm). L'ensemble des résultats obtenus atteste de la supériorité de l'espèce *R. raetam* comparé aux autres plantes étudiées de point de vue richesse en composés phénoliques et potentialités biologiques.

Mots clés : plantes médicinales ; activités antioxydantes ; capacité antimicrobienne ; composés phénoliques.

1. Introduction

Les industries agro-alimentaires et thérapeutiques accordent de plus en plus d'intérêt à l'investigation des phytoressources naturelles à potentialités antioxydantes pour substituer les antioxydants synthétiques. Parmi ces espèces, les plantes médicinales sont recherchées pour leur richesse en molécules bioactives à activités biologiques diverses (Ksouri et al. 2012). Parmi ces molécules, les composés phénoliques sont de puissants antioxydants naturels très sollicités grâce à leur capacité de neutralisation des radicaux libres, leur pouvoir de réduire les espèces réactives de l'oxygène ainsi que leurs capacités de chélation des ions métalliques et d'inhibition du blanchissement de la β -carotène. De plus, ces composés constituent des inhibiteurs du développement de certains micro-organismes saprophytes ou parasites et des champignons ou bactéries (Sarni-Manchado and Cheynier 2006).

En outre, chez les plantes les teneurs en ces molécules et leurs natures sont fortement modifiées sous l'action, d'une part, des facteurs externes ou exogènes qu'ils soient de nature biotiques ou abiotiques et d'autre part, des facteurs internes ou endogènes tels que les facteurs génétiques conduisant à des différences importantes entre les espèces (Ksouri et al. 2010). De ce fait, les facteurs génétiques sont considérés parmi les critères les plus importants de variabilité qualitative et quantitative des teneurs en composés phénoliques. Dans ce contexte, les travaux de Falleh et al. (2009) ont rapporté une variabilité significative des teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins condensés au sein du genre *Mesembryanthemum*. En outre, il est à noter que cette variabilité des teneurs en composés phénoliques est généralement corrélée avec l'importance des activités biologiques (Hanson et al. 2004). Ces données sont corroborées par les travaux de Trabelsi et al. (2010), qui ont montré une corrélation significative et positive entre les teneurs en composés phénoliques et l'activité antiradicalaire. Néanmoins, cette relation n'est pas toujours évidente puisqu'elle peut être non significative voire même négative dans certains cas. Ainsi cette activité ne dépend pas seulement de la teneur en polyphénols mais aussi de la structure et de l'interaction entre les différents composés (Djeridane et al. 2006). Dans ce contexte, on se propose d'explorer la variabilité des teneurs en composés phénoliques et des principales activités biologiques (antioxydantes et antimicrobiennes) des parties aériennes de six espèces médicinales (*Retama raetam*, *Nitraria retusa*, *Pituranthos tortuosus*, *Zygophyllum album*, *Juncus maritimus* et *Rubia timctorum*).

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

Cette étude a été réalisée sur six espèces médicinales qui ont été collectées en 2011 dans leurs biotopes naturels au niveau de 3 régions différentes par leurs conditions climatiques. En effet, les espèces *Retama raetam* et *Juncus maritimus* ont été récoltées à Borj-Cédria situé au nord du pays et appartenant à l'étage bioclimatique semi-aride supérieur, *Nitraria retusa* et *Zygophyllum album* à Kairouan localisé au centre du pays et appartenant à l'étage bioclimatique aride supérieur et finalement *Pituranthos tortuosus* et *Rubia timctorum* à Gabès situé au sud du pays et appartenant à l'étage bioclimatique aride inférieur.

2.2. Extraction des échantillons de plantes

Les six espèces ont été ramenées immédiatement au laboratoire pour leur séchage tout d'abord à l'air libre durant deux semaines, puis dans une étuve à 60 °C pendant 24 heures. Par la suite, les parties aériennes de ces plantes ont été broyées finement à l'aide d'un broyeur à billes (type Dongoumeau). La poudre a été conservée à l'obscurité et à 4°C pour être utilisée dans l'extraction et les différentes analyses. Ce type d'extraction a été effectué selon la méthode de Mau et al. (2001). La macération a été réalisée en ajoutant 2.5 g de la poudre végétale à 25 ml du solvant organique (méthanol 80 %). Après 30 minutes d'agitation à l'aide d'un agitateur magnétique et un repos de 24 heures à 4°C et à l'obscurité, le mélange a été filtré sur du papier filtre sans cendre (papier watman N°4). L'extrait ainsi obtenu a été conservé à 4°C et à l'abri de la lumière pour être utilisé dans les différentes analyses.

2.3. Dosage et quantification des métabolites naturels

2.3.1. Dosage des polyphénols totaux

Une prise de 125 µl de chaque extrait convenablement dilué est ajoutée à 500 µl d'eau distillée et 125 µl du réactif de Folin-Ciocalteu. Après une agitation instantanée et un repos de 3 min, 1250 µl de (Na)₂CO₃ (7 %) sont additionnés en ramenant le volume final à 3 ml avec de l'eau distillée. Après une incubation de 90 min à l'obscurité et à température ambiante, la densité optique est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (type Anthelie 2 Advanced) à 760 nm. Trois répétitions ont été réalisées. La gamme étalon a été préparée avec de l'acide gallique à des concentrations de 50 à 500 µg.ml⁻¹ (Dewanto et al. 2002). Les teneurs ont été exprimées en mg d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG.g⁻¹MS).

2.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Une prise de 0.25 ml de chaque extrait a été additionnée de 0.075 ml de NaNO₂ (5 %). Après un repos de 6 min, on ajoute au mélange, 0.150 ml de chlorure d'aluminium (AlCl₃ 6H₂O, 10 %) fraîchement préparé. Après 5 min d'incubation à une température ambiante, 0.5 ml de NaOH (1M) a été ajouté au mélange et puis ajusté avec de l'eau distillée à un volume final de 2.5 ml. La lecture de l'absorbance a été faite à une longueur d'onde de 510 nm. La gamme étalon a été préparée par de la catéchine à des concentrations allant de 50 à 400 µg.ml⁻¹ (Zhishen et al. 1999). Les teneurs en flavonoïdes ont été exprimées en mg d'équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg EC.g⁻¹MS).

2.3.3. Dosage des tanins condensés

Un aliquote de 0.05 ml de l'extrait de plante a été additionné à 3 ml de vanilline dans le méthanol (4 %) et 1.5 ml de HCl concentré. Après 15 min d'incubation à la température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 500 nm (Sun et al. 1998). Comme pour les flavonoïdes, les teneurs en tanins condensés ont été exprimées en mg d'équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg EC.g⁻¹MS).

2.4. Mesure des activités antioxydantes

2.4.1. Activité antioxydante totale

Cette méthode consiste à ajouter 200 µl d'extrait de plante à 2 ml de la solution à pH acide contenant de l'acide sulfurique (H₂SO₄; 0.6 M), du phosphate de sodium (NaH₂PO₄, H₂O; 28 mM) et de l'heptamolybdate d'ammonium ((NH₄)₆MO₇O₂₄, 4H₂O); 4 mM). Le mélange a été ensuite placé dans un bain-marie à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 695 nm. L'activité antioxydante totale a été exprimée en mg d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG.g⁻¹MS) (Ksouri et al. 2009).

2.4.2. Activité antiradicalaire contre le DPPH

Selon la méthode de Hanato et al. (1988), une prise de 1 ml de l'extrait à différentes concentrations a été mise en présence de 250 µl d'une solution de DPPH· (0.2 mM dans le méthanol). Le mélange a été incubé pendant 30 min à l'obscurité, ensuite l'absorbance a été mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible contre un témoin (sans extrait). Les résultats ont été exprimés en pourcentages d'inhibition calculés suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange selon l'équation (5):

$$PI = (DO \text{ témoin} - DO \text{ extrait} / DO \text{ témoin}) * 100$$

PI : pourcentage d'inhibition (ou CI₅₀)

DO témoin : absorbance du témoin

DO extrait : absorbance de l'extrait

La réalisation de la cinétique de cette activité permet de déterminer la concentration qui correspond à 50 % d'inhibition (CI₅₀), la valeur de la CI₅₀ la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée.

2.4.3. Pouvoir réducteur du fer

Le pouvoir réducteur a été déterminé par la méthode décrite par Oyaizu (1986). Cette méthode consiste à mélanger 0.2 ml de l'extrait à différentes concentrations avec 0.5 ml de tampon phosphate (0.2 mol.l⁻¹, pH 6.6) et 0.5 ml de ferricyanure de potassium ou K₃Fe(CN)₆ (1%). Le mélange obtenu a été incubé pendant 20 min à 50 °C. Après cette incubation, 0.5 ml d'acide trichloroacétique ou TCA (10%) ont été additionnés pour arrêter la réaction, suivie d'une centrifugation à 650 x g pendant 10 min à la température ambiante. Enfin au 0.5 ml surnageant, 0.5 ml d'eau distillée et 0.1 ml de trichlorure ferreux ou FeCl₃ (0.1%) ont été additionnés. La lecture de l'absorbance a été réalisée à 700 nm (le blanc est le

tampon d'extraction). Les résultats ont été exprimés en concentration effective (CE_{50} , $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), qui est la concentration de l'extrait correspondant à une absorbance égale à 0.5. La valeur de CE_{50} a été obtenue par la courbe de régression linéaire (Ksouri et al. 2009).

2.4.4. Test d'inhibition du blanchissement de la β -carotène

L'estimation de la capacité d'inhibition du blanchissement de la β -carotène a été déterminée selon la méthode de Koleva et al. (2001). Un aliquote de 2 mg de β -carotène ont été dissous dans 20 ml de chloroforme. Pour une prise de 4 ml de cette solution, 40 mg de l'acide linoléique et 400 mg de Tween 40 ont été ajoutés. Après évaporation du chloroforme à 40°C sous vide, 100 ml d'eau oxygénée a été ajoutée à la solution. Le mélange a été ensuite vigoureusement agité. Les extraits ainsi que le témoin positif (BHA) ont été préparés dans du méthanol. 300 μl du mélange β -carotène/acide linoléique et 20 μl des échantillons préparés dans le méthanol ont été placés dans les puits d'une microplaque. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque concentration. Par la suite la microplaque a été incubée à 50°C pendant 120 min et la lecture des échantillons a été effectuée à 470 nm à l'aide d'un lecteur ELISA (lecteur microlitre EAR 400, Labsystems Multiskan MS).

Deux lectures ont été effectuées, une première à $t = 0$ min et une seconde après 120 min d'incubation. L'activité des extraits a été évaluée au terme du blanchissement de la β -carotène selon cette équation (9) et les résultats ont été exprimés en CI_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

$$PI = [(DO_{E(120)} - DO_{C(120)}) / (DO_{C(0)} - DO_{C(120)})] * 100$$

PI: pourcentage d'inhibition

$DO_{E(120)}$: absorbance d'extrait à $t=120$ min,

$DO_{C(120)}$: absorbance de témoin à $t=120$ min,

$DO_{C(0)}$: absorbance de témoin à $t=0$ min.

2.5. Détermination de l'activité antibactérienne

2.5.1. Préparation du milieu de culture

Le milieu de Mueller Hinton a été utilisé pour la culture des bactéries. Il est constitué d'un mélange de 15 g d'agar, 17.5 g de caséine hydrolysée, 4 g d'infusion de viande de bétail et 1.5 g d'amidon. Trente-huit grammes de ce milieu ont été dissous, à chaud dans un litre d'eau distillée, le pH final étant de 7.4. Une stérilisation par autoclavage a été réalisée pendant 15 minutes à 120°C . Enfin le milieu obtenu a été réparti dans des boîtes de Pétri à raison de 15 ml dans chacune.

2.5.2. Ensemencement par inondation

Cette étape commence par la préparation d'une suspension bactérienne de quatre bactéries gram positive (*Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*.) et une bactérie gram négative (*Pseudomonas aeruginosa*). Elle consiste à prélever une souche pure et bien isolée à l'aide d'une anse, cette prise a été dissoute dans 10 ml de l'eau physiologique (NaCl 9 ‰). L'absorbance de cette suspension a été ajustée à 0.4 unité à 540 nm. Ce mélange a été ensuite étalé dans des boîtes de pétri de façon à recouvrir presque entièrement la surface gélosée. Des mouvements de rotation imprimés par la main accélèrent le recouvrement. Afin de fixer les souches bactériennes sur le milieu gélosé, une incubation de 15 min à 37°C a été effectuée. Les boîtes ont été ensuite retirées et l'excès de liquide a été rejeté stérilement. Une autre incubation de ces boîtes dans l'étuve à 37°C pendant un quart d'heure permet leur séchage et ainsi on obtient un tapis bactérien (Graham et al.1985).

2.5.3. Application des disques

Des disques de papier Wattman stériles de 6 mm de diamètre ont été placés sur les tapis microbiens. Des prises de 10 μl d'une huile essentielle à l'état brut et des extraits végétaux préparés à une concentration de $100\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ont été ensuite disposées sur les disques. Après 24 h d'incubation à 37°C , on observe l'effet des échantillons sur la croissance des souches autour du disque. L'apparition d'un halo autour de chaque disque traduit l'inhibition de la croissance bactérienne. La mesure de cette activité consiste à mesurer le diamètre d'inhibition (Graham et al. 1985). Les témoins positifs (antibiotiques) utilisés sont la Gentamicine contre les bactéries et l'Ampicilline contre les champignons.

2.6. Analyse statistique

Toutes les extractions et les dosages ont été effectués en triple essais. Les moyennes ont été comparées à l'aide de l'analyse de variance unidirectionnelle (SPSS) suivie des tests à distance de Duncan. Les différences entre les moyennes individuelles ont été jugées significatives à $P < 0,05$. Toutes les analyses ont été effectuées par le logiciel SPSS v 5.1 (Statsoft 1998).

3. Résultats et discussion

3.1. Teneurs en composés phénoliques des parties aériennes des six espèces médicinales

Les polyphénols totaux : Les résultats des teneurs en polyphénols totaux des six espèces étudiées ont montré une variabilité significative en fonction de l'espèce. Par comparaison aux autres plantes, *R. raetam* a montré une supériorité remarquable en ces composés avec une teneur de l'ordre de 23.93 mg EAG.g⁻¹MS. En outre, les quatre espèces (*N. retusa*, *J. maritimus*, *R. timctorum* et *P. tortuosus*) ont présenté des quantités plus faibles variant de 3.12 à 9.36 mg EAG.g⁻¹MS. Néanmoins, une teneur quasi négligeable a été notée chez *Z. album* (0.68 mg EAG.g⁻¹MS). De ce fait, *R. raetam* est à peu près 2.5 à 35 fois plus riche en polyphénols par comparaison aux autres espèces (Tableau 1).

Les flavonoïdes totaux : Les flavonoïdes sont l'une des classes des polyphénols les plus étudiées actuellement. L'analyse des résultats des extraits méthanoliques de la partie aérienne a montré une différence significative entre les teneurs en ces molécules chez les six espèces étudiées. En effet, les résultats ont indiqué que deux plantes ont exhibé les teneurs les plus élevées en flavonoïdes à savoir : *R. raetam* (3.58 mg EC.g⁻¹ MS) et *J. maritimus* (3.26 mg EC.g⁻¹ MS) ; suivies de *N. retusa* et *Z. album* avec des teneurs moindres en ces composés de l'ordre de 1.83 et 1.61 mg EC.g⁻¹ MS, respectivement. Cependant, *R. timctorum* et *P. tortuosus* ont présenté les teneurs les plus faibles (< 0.44 mg EC.g⁻¹ MS) (Tableau 1).

Les tanins condensés : Les résultats concernant les tanins condensés montrent qu'il existe également une variabilité significative des teneurs en ces composés entre les six espèces d'intérêt. Contrairement aux résultats des polyphénols et des flavonoïdes, l'espèce *R. timctorum* s'est distinguée des autres plantes par les teneurs les plus importantes en tanins condensés de l'ordre de 2.41 mg EC.g⁻¹ MS. En deuxième lieu, les espèces *P. tortuosus*, *N. retusa* et *R. raetam* ont présenté des teneurs en proanthocyanidines moindres variant entre 1.19 et 1.65 mg EC.g⁻¹ MS. Enfin, les plus faibles quantités en ces composés ont été trouvées chez *J. maritimus* et *Z. album* (0.96 et 0.34 mg EC.g⁻¹ MS respectivement) (Tableau 1).

La comparaison des teneurs en composés phénoliques des extraits végétales a révélé des différences significatives entre les six espèces étudiées. En effet, l'extrait de la partie aérienne de *R. raetam* a montré les teneurs les plus élevées en ces métabolites (23.93 mg EAG.g⁻¹MS pour les polyphénols et 3.58 mg EC.g⁻¹ MS pour les flavonoïdes) contrairement aux autres espèces qui ont affiché des teneurs plus faibles. Ces résultats reflètent bien la richesse de l'espèce *R. raetam* en ces métabolites secondaires témoignant ainsi de la supériorité de son génotype. Une telle variabilité interspécifique rappelle bien celle trouvée précédemment par Falleh et al. (2009). Ces auteurs ont montré une variabilité endogène prononcée au sein du genre *Mesembryanthemum* au niveau des teneurs en composés phénoliques. En effet, leurs résultats ont dévoilé une grande richesse de *M. edule* en polyphénols totaux (70.07 mg EAG.g⁻¹MS) par comparaison à *M. crystallinum* et *M. nodiflorum* (1.43 et 1.72 mg EAG.g⁻¹MS, respectivement). Ils ont conclu que cette différence est due à une variabilité interspécifique remarquable liée aux potentialités génotypiques de chaque espèce. Dans le même cadre, les travaux de Moore et al. (2006) ont mis en évidence l'importance des facteurs génétiques dans la modulation de la biosynthèse des métabolites secondaires et dans la variation quantitative et qualitative du contenu phénolique des plantes. Cet effet génotype a été également observé dans les travaux de Tounsi et al. (2009) en comparant trois espèces de vigne (Muscat d'Italie, Syrah et Carignan) sur la base de leurs richesses en composés phénoliques et leurs activités antioxydantes. Les résultats ont montré une importante variabilité des teneurs en polyphénols totaux (de 121 à 440 mg EAG.g⁻¹ MS), en flavonoïdes (de 48 à 116 mg EC.g⁻¹ MS) et en tanins condensés (de 14 à 37 mg EC.g⁻¹ MS) avec une supériorité remarquable de la variété Muscat d'Italie. Cette variabilité a été attribuée au pool génétique responsable de la biosynthèse des composés phénoliques de chaque espèce. Outre les facteurs génétiques, il existe des facteurs exogènes (édaphique et abiotique) qui sont également impliqués dans la variation qualitative et quantitative des composés phénoliques. En effet, les travaux de Ksouri et al. (2008), sur quelques espèces halophytiques (*Cakile maritima* et *Tamarix gallica*), ont montré l'implication des facteurs d'ordre extrinsèque dans la modulation de biosynthèse de ces molécules et dans la variation de leurs pouvoirs antioxydants. Ils ont trouvé qu'indépendamment de l'espèce étudiée, les teneurs en polyphénols étaient meilleurs dans les plantes provenant de la zone aride par rapport à celles provenant de la zone humide. Des études antérieures ont montré que le stress abiotique (salinité, luminosité, déficit hydrique, etc.) largement présent dans la zone aride peut améliorer la synthèse des composés phénoliques en réponse au stress oxydatif engendré par la formation d'espèces oxygénées réactives dans ces environnements hostiles (De Abreu and Mazzafera 2005). En revanche, *R. raetam* qui semblerait être l'espèce la plus active, appartient à une zone semi-aride contrairement à la majorité des autres plantes étudiées qui proviennent des zones arides. Ainsi, cette espèce est exposée à des conditions climatiques moins sévères mais

surement favorables à son métabolisme secondaire. Des études récentes ont affirmé que le stress causé par une sécheresse et une température élevées peut limiter la croissance des plantes et altérer leur composition chimique (Xu and Zhou 2006 ; Erice et al. 2006). Par exemple, un déficit hydrique et une chaleur importante ont considérablement réduit la teneur en polyphénols totaux chez l'espèce *Lolium perenne* (Hamada et al. 2014). Cet état de fait explique parfaitement la richesse de *R. raetam* par rapport aux autres espèces, dont les conditions climatiques n'étaient pas trop adéquates à leur métabolisme. Par conséquent, chaque plante possède son propre mécanisme pour s'adapter à son biotope. Ainsi, selon la nature de l'espèce végétale, les conditions climatiques extrêmes peuvent soit stimuler ou inhiber leur voie de biosynthèse des métabolites secondaires.

Tableau 1 : Teneurs en composés phénoliques au niveau des extraits des parties aériennes de six espèces médicinales.

	PT (mg EAG.g ⁻¹ MS)	FT (mg EC. g ⁻¹ MS)	TC (mg EC. g ⁻¹ MS)
<i>Retama raetam</i>	23.93 ^a	3.58 ^a	1.19 ^c
<i>Rubia tinctoria</i>	4.95 ^d	0.44 ^c	2.41 ^a
<i>Pituranthos tortuosus</i>	3.12 ^e	0.20 ^c	1.65 ^b
<i>Nitraria retusa</i>	9.36 ^b	1.83 ^b	1.63 ^b
<i>Zygophyllum album</i>	0.68 ^f	1.61 ^b	0.34 ^e
<i>Juncus maritimus</i>	5.71 ^c	3.26 ^a	0.96 ^d

PT : Polyphénols Totaux ; FT : Flavonoïdes Totaux ; TC : Tanins Condensés

3.2. Détermination des activités antioxydantes et bactériennes des parties aériennes des six espèces médicinales

Activité antioxydante totale (AAT) : L'estimation de l'activité antioxydante totale des différents extraits de ces espèces a montré une différence significative entre les six plantes étudiées (Tableau 2). En effet, comme pour les polyphénols totaux et les flavonoïdes, *R. raetam* a surpassé les autres espèces puisqu'elle a montré une activité AAT de l'ordre de 55.6 mg EAG.g⁻¹ MS. En outre, les deux espèces *R. tinctorum* et *J. maritimus* ont présenté des AAT moins importantes mais considérables de l'ordre de 31.46 et 27.33 mg EAG.g⁻¹ MS respectivement, contrairement aux trois plantes restantes qui ont affiché des valeurs de l'activité antioxydante totale très faibles (< 16.43 mg EAG.g⁻¹ MS).

Capacité à neutraliser le radical DPPH : Le pouvoir antiradicalaire des parties aériennes des six espèces végétales a été évalué par le test de la capacité inhibitrice du radical synthétique DPPH· à la concentration d'inhibition de 50 % (CI₅₀) (Tableau 2). La comparaison des différentes valeurs de la CI₅₀ a été à l'origine d'une ségrégation significative de cette activité antiradicalaire en fonction de l'espèce. En effet, *R. raetam*, s'est distinguée par la CI₅₀ la plus faible, vis-à-vis des cinq autres espèces, de l'ordre de 23 µg.ml⁻¹. Par la suite, deux autres catégories de plantes ont été perçues selon leur pouvoir antiradicalaire. La première regroupe les plantes ayant une faible activité antiradicalaire dont les CI₅₀ sont comprises entre 124 et 350 µg.ml⁻¹. Il s'agit de : *N. retusa* (CI₅₀ = 124 µg.ml⁻¹), *P. tortuosus* (CI₅₀ = 142 µg.ml⁻¹) et de *Z. album* (CI₅₀ = 350 µg.ml⁻¹). La deuxième catégorie est celle des plantes présentant une activité antiradicalaire moyenne comme *R. tinctorum* (CI₅₀ = 56 µg.ml⁻¹) et *J. maritimus* (CI₅₀ = 76 µg.ml⁻¹).

Pouvoir réducteur du fer : L'analyse des résultats de la capacité de réduction des ions métalliques de transition, tel que l'ion ferrique Fe³⁺, montre aussi une différence significative de cette activité antioxydante en fonction de l'espèce étudiée. En effet, *R. raetam* s'est montré la plus intéressante puisqu'elle a affiché une valeur de la CE₅₀ de l'ordre de 410 µg.ml⁻¹ contrairement aux autres espèces, qui ont montré une activité très faible avec une CE₅₀ > 950 µg.ml⁻¹ (Tableau 2).

Tableau 2 : Mesure des activités antioxydantes des extraits des parties aériennes de six espèces médicinales.

	Activité antioxydante totale (en mg EAG.g ⁻¹ MS)	Activité antiradicalaire contre DPPH (CI ₅₀ en µg.ml ⁻¹)	Activité réductrice du fer (CE ₅₀ en µg.ml ⁻¹)	Test d'inhibition du blanchissement de la β-carotène (CI ₅₀ en µg.ml ⁻¹)
<i>Retama raetam</i>	55.60 ^a	23 ^f	410 ^f	960 ^d
<i>Rubia tinctoria</i>	31.46 ^b	56 ^e	2100 ^b	5000 ^c
<i>Pituranthos tortuosus</i>	16.43 ^d	142 ^b	1560 ^e	5200 ^c
<i>Nitraria retusa</i>	9.89 ^e	124 ^c	1100 ^c	8800 ^b
<i>Zygophyllum album</i>	3.41 ^f	350 ^a	2400 ^a	16150 ^a
<i>Juncus maritimus</i>	27.33 ^c	76 ^d	950 ^d	460 ^e

Test d'inhibition du blanchissement de la β-carotène : L'estimation des concentrations d'inhibition du blanchissement de la β-carotène montre également une différence significative entre les six espèces étudiées. En effet, contrairement aux autres activités antioxydantes, les résultats ont indiqué que *J. maritimus* est l'espèce ayant la valeur de la CI₅₀ la plus faible (460 µg.ml⁻¹) et par conséquent le pouvoir

d'inhibition le plus important (Tableau 2). Par ailleurs, cette capacité à inhiber le blanchissement de la β -carotène s'est avérée plus faible, mais non négligeable chez *R. raetam* avec une CI_{50} de l'ordre de 960 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Enfin, *R. timctorum*, *P. tortuosus*, *N. retusa* et *Z. album* ont exhibé les activités les moins intéressantes avec des $CI_{50} > 5000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Activité antimicrobienne : Les résultats présentés dans le Tableau 3 montrent une variabilité significative de l'activité antimicrobienne en fonction de l'espèce étudiée et de la souche testée. En effet, l'évaluation de cette activité a été estimée par la mesure du diamètre des halos d'inhibition de cinq souches de bactéries pathogènes. Par ailleurs, indépendamment des extraits étudiés, une activité très intéressante au niveau de la majorité des plantes étudiées a été notée contre les souches *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Pseudomonas aeruginosa*, étant donné que les diamètres de la zone d'inhibition ont atteint jusqu'à les 16.33 mm. Hormis l'extrait de *R. raetam*, les cinq autres espèces n'ont présenté aucune activité antibactérienne contre la souche *Bacillus cereus*. D'autre part, outre le type du microorganisme testé, l'extrait de *R. raetam* s'est révélé être le plus actif par comparaison aux autres extraits contre la plupart des souches utilisées étant donné que ses ZI ont varié entre 11.00 et 16.33 mm.

Comme pour les composés phénoliques, les activités antioxydantes et antimicrobiennes ont montré une variabilité significative entre les six espèces étudiées. L'utilisation de plusieurs tests a montré que la capacité antioxydante est très différente entre *R. raetam*, *N. retusa*, *P. tortuosus*, *Z. album*, *J. maritimus* et *R. timctorum*, le plus souvent supérieure pour *R. raetam*. Les différences entre les valeurs de la CI_{50} sont généralement très significatives. A titre d'exemple, la capacité de stabiliser le radical DPPH \cdot de *R. raetam* est 2.5 à 15 fois supérieure à celle des autres espèces étudiées. De même, pour l'activité antibactérienne toutes les souches étudiées ont montré une sensibilité particulière pour l'extrait de *R. raetam* étant donné que les ZI ont varié entre 11 et 16.33 mm. Dans ce même contexte, Sahan et al. (2017) ont exploré les activités antioxydantes des extraits de trois espèces de chicorée (*Cichorium*). Ils ont trouvé qu'il existe une variabilité significative entre ces espèces dont l'ordre est comme suit : 241.50, 233.66 et 205.27 $\mu\text{mol TE}\cdot\text{g}^{-1}$ MS respectivement pour les espèces chicorée blanc, chicorée vert et chicorée rouge. D'autres résultats similaires ont été également observés lors de l'évaluation de l'activité antimicrobienne de diverses espèces données. En effet, Lemuh Njimoh et al. (2015) ont testé l'activité antibactérienne des extraits de 14 plantes médicinales contre six pathogènes humains. Ils ont trouvé qu'il existe une variabilité significative entre les différentes plantes étudiées soulignant ainsi l'impact important des facteurs endogènes sur la potentialité biologique de la plante.

Par ailleurs, les résultats obtenus suggèrent aussi l'existence d'une corrélation étroite entre les teneurs élevées en polyphénols totaux de *R. raetam* et sa capacité biologique importante. Récemment, plusieurs auteurs ont montré une corrélation positive hautement significative entre la richesse d'une plante en composés phénoliques et sa capacité biologique surtout antioxydante (Connan et al. 2006). En effet, Djeridane et al. (2006) ont trouvé que la variation des teneurs en polyphénols totaux chez les espèces *Artemisia arborescens* et *Artemisia campestris* a été fortement corrélée (3.4 et 20.4 mg EAG $\cdot\text{g}^{-1}$ MS respectivement) à leurs capacité antioxydante (11.6 et 25.0 mmol TEAC $\cdot\text{g}^{-1}$ MS respectivement).

Somme toute, Macheix et al. (2005) soutiennent, grâce à des observations, qu'il est possible de caractériser différentes espèces par une « empreinte phénolique ». Cette chimiotaxonomie permet d'affiner la classification des espèces et leurs relations phylogénétiques. De plus, une telle variabilité pourrait être d'une grande importance dans la sélection des plantes les plus prometteuses comme source naturelle d'antioxydants.

Suite à la comparaison entre les six espèces étudiées, *R. raetam* a été choisi comme étant l'espèce la plus intéressante d'où l'intérêt d'identifier ses principaux composés phénoliques responsables de ses activités antioxydantes et antimicrobiennes par une analyse par RP-HPLC.

Tableau 3. Mesure de l'activité antibactérienne des extraits des six plantes médicinales par la méthode de la diffusion des disques

Souches bactériennes	Source No.	Diamètre de la zone d'inhibition incluant celle du disque (mm ± SD)					
		<i>Retama raetam</i>	<i>Rubia tinctoria</i>	<i>Pituranthos tortuosus</i>	<i>Nitraria retusa</i>	<i>Zygophyllum album</i>	<i>Juncus maritimus</i>
Gram-positif							
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579	11.00 ± 0.55 ^b	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966	16.33 ± 1.00 ^a	15.66 ± 2.00 ^b	15.33 ± 0.76 ^b	-	15.33 ± 0.76 ^b	9.33 ± 0.46 ^c
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	15.33 ± 0.70 ^a	14.33 ± 1.00 ^b	12.00 ± 0.60 ^d	8.00 ± 0.40 ^e	13.66 ± 0.68 ^c	7.33 ± 0.36 ^f
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 070101121	16.00 ± 0.80 ^a	14.66 ± 1.00 ^b	13.66 ± 0.68 ^c	9.00 ± 0.45 ^d	14.00 ± 0.70 ^b	-
Gram-négatif							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	15.00 ± 0.75 ^a	14.00 ± 0.70 ^b	9.66 ± 0.48 ^e	12.33 ± 1.00 ^c	14.00 ± 0.70 ^b	11.00 ± 0.55 ^d

SD : standard de déviation, Le diamètre des disques utilisé est de 6 mm. L'activité est absente (-) si la zone d'inhibition (ZI) est < 1mm ; l'activité est faible si (ZI) est de 1 mm ; activité moyenne si (ZI) entre 2 et 3 mm; l'activité est assez élevée si (ZI) entre 4 et 5 mm ; l'activité est élevée si (ZI) est entre 6-9 mm; l'activité est très élevée si (ZI) >9.

3.3. Identification et quantification des composés phénoliques de l'extrait de *Retama raetam* par RP-HPLC

L'analyse du chromatogramme RP-HPLC a montré qu'il existe une variabilité significative de point de vue qualitative et quantitative au niveau de la composition phénolique de *R. raetam* (Tableau 4). En effet, l'analyse par RP-HPLC a permis juste l'identification des composés minoritaires alors que les majoritaires demeuraient non identifiés à cause d'un manque de standards. Le profil analysé a révélé la présence de deux classes majoritaires (les flavonoïdes et les acides phénoliques) et les autres étaient juste des phénols simples et des coumarines. Quantitativement parlant, les flavonoïdes ont constitué la fraction principale des composés phénoliques présents dans l'extrait étudié avec un taux maximal dans le stade floraison (1154.58 µg. g⁻¹MS), suivi de près des stades fructification et végétative (828.61 et 535.71 µg.g⁻¹MS respectivement). Au cours de la croissance de *R. raetam*, une même tendance de variation en acides phénoliques a été observée puisque la plus grande quantité en ces composés a été trouvée pendant la période de floraison (322.35 µg. g⁻¹ MS). Il est intéressant de noter que les données du Tableau 4 ont montré également l'apparition de nouvelles molécules caractéristiques de chaque stade lors de la comparaison des trois périodes. En effet, l'acide gallique, l'acide hydroxycinnamique et la naringénine ont été apparus pendant la période végétative, tandis que la rutine, le kaempférol et les acides syringique, rosmarinique, trans-cinnamique ont été synthétisés exclusivement pendant la floraison. En outre, l'isoquercitrine n'a été trouvée que durant la période de fructification.

Tableau 4. Identification et quantification des composés phénoliques (exprimés en µg.g⁻¹MS) de l'extrait de *Retama raetam* par RP-HPLC.

Composés phénoliques	<i>Retama raetam</i>
Acides phénoliques	
Acide gallique	6.42 ± 0.32
Acide chlorogénique	10.94 ± 0.55 ^b
Acide syringique	-
Acide p-coumarique	18.43 ± 0.92 ^a
Acide hydroxycinnamique	2.63 ± 0.13
Acide rosmarinique	-
Acide ellagique	18.02 ± 0.90 ^a
Acide trans-cinnamique	-
Total des acides phénoliques	56.44 ± 0.56 ^b
Flavonoïdes	
Catéchine	42.73 ± 2.13 ^c
Epicatechine-3-O-gallate	-
Lutéoline-7-O-glucoside	165.62 ± 0.83 ^b
Isoquercitrine	-
Rutine	-
Myricétine	95.00 ± 0.47 ^b
Isorhamnétine-3-O-rutinoside	122.19 ± 0.61 ^b
Quercétine	53.64 ± 2.68 ^a
Naringénine	3.77 ± 0.19
Lutéoline	29.17 ± 1.46 ^c
Kaempférol	-
Apigénine	23.59 ± 1.18 ^a
Quercétine-3-galactoside	-
Total des flavonoïdes	535.71 ± 1.19 ^c
Autres composés	
Résorcinol	218.33 ± 1.10 ^a
Catéchol	12.14 ± 0.61 ^c
Coumarine	10.19 ± 0.51 ^c
Total des autres composés	240.66 ± 0.74 ^a

4. Conclusion

En conclusion, les résultats obtenus mettent en évidence la diversité interspécifique entre les différentes espèces étudiées. Cette variabilité a été bien marquée au niveau des composés phénoliques, des pouvoirs antioxydants et de l'activité antimicrobienne. En effet, et d'une manière générale, *Retama raetam* s'est distinguée des autres plantes par sa richesse en composés phénoliques ainsi que par ses importantes propriétés biologiques. Ces données permettent de retenir cette espèce pour d'autres investigations plus approfondies afin de confirmer sa potentialité biologique.

Acknowledgments

This work was supported by the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research (LR10CBBC02).

5. Références

- Connan S, Deliste F, Deslandes E, Gall E (2006)** Intra-thallus phlorotannin content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters. *Bot Mar* 49: 39-46.
- De Abreu N, Mazzafera P (2005)** Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiol Biochem* 43: 241-248.
- Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu R H (2002)** Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50: 3010-3014.
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N (2006)** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *J Food Chem* 97: 654-660.
- Erice G, Irigoyen J J, Pérez P, Martínez-Carrasco R, Sánchez-Díaz M (2006)** Effect of elevated CO₂, temperature and drought on photosynthesis of nodulated alfalfa during a cutting regrowth cycle. *Physiol Plantarum* 126: 458-68.
- Falleh H, Ksouri R, Oueslati S, Guyot S, Magné C, Abdely C (2009)** Interspecific variability of antioxidant activities and phenolic composition in *Mesembryanthemum* genus. *Food Chem Toxicol* 47: 2308-2313.
- Graham D R, Dixon R E, Hughes J M, Thorns berry C (1985)** Disk diffusion antimicrobial susceptibility testing for clinical and epidemiologic purposes. *Am J Infect Control* 13: 241-249.
- Hamada A, Darin P, Gaurav Z, Wim Van den E, Ivan A, Janssens and Han A (2014)** Climate Extreme Effects on the Chemical Composition of Temperate Grassland Species under Ambient and Elevated CO₂: A Comparison of Fructan and Non-Fructan Accumulators. *PLoS One* 9: 92044.
- Hanato T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T (1988)** Two new flavonoids and other constituents in licorice root their relative astringency and radical scavenging effect. *Chem Pharm* 36: 1090-1097.
- Hanson P M, Yang R Y, Wu J, Chen J T, Ledesma D, Tsou S C S, Lee T C (2004)** Variation for antioxidant activity and antioxidants in tomato. *J Am Soc Hortic Sci* 129: 704-711.
- Koleva I, Teris A, Beek V, Linszen H, Groot A, Lyuba N, Evstatieva (2001)** Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods. *Phytochem Anal* 13: 8-17.
- Ksouri R, Falleh H, Magdiche W, Trabelsi N, Mhamdi B, Chaieb K, Bakrouf A, Magné C, Abdely C (2009)** Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food Chem Toxicol* 47: 2083-2091.
- Ksouri R, Ksouri W M, Jallali I, Debez A, Magné C, Hiroko I, Abdely C (2012)** Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Crit Rev Biotechnol* 32: 289-326.
- Ksouri R, Megdiche W, Falleh H, Trabelsi N, Boulaaba M, Smaoui A, Abdely C (2008)** Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C R Biol* 331: 865-873.
- Ksouri R, Megdiche W, Koyro H W, Abdely C (2010)** Responses of Halophytes to Environmental Stresses with Special emphasis to Salinity. *Adv Bot Res* 53: 117-145.
- Lemuh Njimoh D, Assob J C N, Mokake S E, Nyhalah D J, Yinda C K, Sandjonn B (2015)** Antimicrobial Activities of a Plethora of Medicinal Plant Extracts and Hydrolates against Human Pathogens and Their Potential to Reverse Antibiotic Resistance. *Int J Microbiol* 2015 : 547-156.

- Macheix J J, Fleuriet A, Jay-Allemand C (2005)** Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes. Lausanne 192.
- Mau J L, Chao G R, Wu K T (2001)** Antioxydant Properties of Methanolic Extracts from Several Ear Mushrooms. *J Agric Food Chem* 49: 5461-5467.
- Moore J, Liu J G, Zhou K, Yu L (2006)** Effects of Genotype and Environment on the Antioxidant Properties of Hard Winter Wheat Bran. *J Agri Food Chem* 54: 5313-5322.
- Oyaizu M (1986)** Studies on products of the browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J Nutr* 44: 307-315.
- Sahan Y, Gurbuz O, Guldas M, Degirmencioglu N, Begenirbas A (2017)** Phenolics, antioxidant capacity and bioaccessibility of chicory varieties (*Cichorium* spp.) grown in Turkey. *Food Chem* 217: 483-489.
- Sarni-Manchado P, Cheynier V (2006)** Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier. Paris.
- Statsoft Statistica (1998)** Windows (Computer program electronic manual). StatSoft Inc., Tulsa, OK.
- Sun B, Richardo-da-Silvia J M, Spranger I (1998)** Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J Agric Food Chem* 46: 4267-4274.
- Tounsi M S, Ouerghemmi I, Wannes W A, Ksouri R, Zemni H, Marzouk B, Kchouk M E (2009)** Valorisation of three varieties of grape. *J ind crops prod* 30: 292-296.
- Trabelsi N, Megdiche W, Ksouri R, Falleh H, Oueslati S, Bourgou S, Hajlaoui H, Abdelly C (2010)** Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT* 43 : 632-639.
- Xu Z Z, Zhou G S (2006)** Combined effects of water stress and high temperature on photosynthesis, nitrogen metabolism and lipid peroxidation of a perennial grass *Leymus chinensis*. *Planta* 224: 1080-90.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W (1999)** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64: 555-559.