

VALORISATION DES EXTRAITS POLYPHENOLIQUES ET FLAVONOÏQUES DE LA PARTIE AÉRIENNE D'*Echium vulgare*

LAOUFI Razika¹, BOUCHENAK Ouahiba², YAHIAOUI Karima³, BENHABYLES Narimen⁴
& ARAB Karim⁴

¹Laboratoire de Technologies Douces et Valorisation des Matériaux Biologiques et Biodiversité, Faculté des sciences, Université Mohamed Bougara de Boumerdes 35000 Boumerdes- Algérie

²Faculté des Sciences, Université M'Hamed Bougara de Boumerdes

³Laboratoire de Recherche de Technologie Alimentaire, Université M'Hamed Bougara de Boumerdes

⁴Laboratoire de Valorisation et Conservation des Ressources Biologiques, Université de Boumerdes

Résumé : Diverses activités biologiques sont attribuées aux extraits naturels des plantes contenant une variété de composés phénoliques. Le but du travail est de valoriser le pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits polyphénoliques et flavonoïques de la partie aérienne d'*Echium vulgare*. Pour ce faire, nous avons réalisé un screening phytochimique et une évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion dans un milieu solide. L'activité antioxydante de l'extrait de la partie aérienne a été évaluée par le test diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH). Le screening phytochimique a révélé une forte teneur en tanins totaux, flavonoïdes, mucilages et saponosides. Les résultats ont montré aussi un effet antioxydant important proche de celui de l'acide ascorbique ($p > 0.05$), soit une IC50 de $0,347 \pm 0,025$ mg/ml. Les résultats du pouvoir antimicrobien montrent que les extraits polyphénoliques exercent une forte activité sur *Candida albicans* avec une zone d'inhibition de 41 mm. Les souches *E. coli* et *P. aeruginosa* ont montré une sensibilité moindre aux polyphénols et aux flavonoïdes, soit respectivement un diamètre d'inhibition compris entre 23 et 16 mm. Par contre *K. pneumoniae* est montrée résistante. Ces résultats montrent l'importance de valoriser les extraits de la partie aérienne de la plante d'*Echium vulgare* dans le traitement des infections microbiennes.

Mots clés : activité antimicrobienne, activité antioxydante, *Echium vulgare*, flavonoïdes, polyphénols.

Valorization of polyphenolic and flavonoid extracts from the aerial part of *Echium vulgare*

Abstract: Various biological activities are attributed to natural plant extracts containing a variety of phenolic compounds. The aim of the work is to evaluate the antimicrobial potency of polyphenolic and flavonoid extracts of the aerial part of *Echium vulgare*. For this, we carried out a phytochemical screening and an evaluation of the antimicrobial activity by the diffusion method in a solid medium. Phytochemical screening revealed a high content of total tannins, flavonoids, mucilags and saponosids. The results of the antimicrobial power show that the polyphenol extracts exert a strong activity on *Candida albicans* with a zone of inhibition of 41 mm. The *E. coli* and *P. aeruginosa* strains showed less sensitivity to polyphenols and flavonoids, with an inhibition diameter of between 23 and 16 mm, respectively. The other hand, *K. pneumoniae* was resistant. These results showed the importance of valuing the extracts of the aerial part of the *Echium vulgare* in the treatment of microbial infection.

Key words: antimicrobial activity, antioxidant activity, *Echium vulgare*, flavonoids, polyphenols.

Introduction

La majorité des médicaments actuels, sont d'origine végétale ou fabriqués à partir de leurs modèles. La médecine par les plantes est donc devenue une grande science, dans

laquelle on part de la plante vers le principe actif [1].

Actuellement, plusieurs questions sont soulevées concernant la sécurité des produits chimiques synthétiques utilisés en médecine ou dans l'industrie alimentaire.

En effet, les antioxydants de synthèse se sont avérés responsables d'effets indésirables, et l'usage excessif d'agents antimicrobiens chimiques dans la médication humaine conduit à l'apparition de souches résistantes [2].

Cependant, en tant que source médicamenteuse les plantes restent encore sous exploitées surtout dans le domaine de la microbiologie médicale [3]. L'évaluation des propriétés phytothérapeutiques demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquentes ou non connues dans la médecine. Ces dernières représentent une nouvelle source de composés actifs [4], et leur valorisation passe inévitablement par des screenings phytochimiques, et l'étude de leur caractéristique physicochimique. Parmi ces plantes, l'*Echium vulgare* semble avoir un effet antioxydant et antimicrobien [5], cytotoxique vis-à-vis des globules rouges [6] et anti-tumorale [7]. De plus, en médecine traditionnelle les racines sont utilisées pour le traitement des fissures des mains, ainsi que pour la cicatrisation des plaies à l'instar de l'allantoïne [8], les sommités fleuries et les feuilles sont prises sous forme d'infusion pour bénéficier de leurs propriétés astringentes, émoullientes, expectorantes, sudorifères et prévenir les bronchites et la grippe [9].

Il a semblé donc intéressant d'inscrire ce travail dans ce contexte de recherche, afin de mieux valoriser l'usage de cette plante en Algérie. Le but principal de cette étude est l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne de l'extrait polyphénolique et flavonoïque.

I.- Matériel et méthodes

I.1.- Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de l'extrait polyphénolique et flavonoïques de la partie aérienne d'*Echium vulgare*, récoltée en mars 2016 dans la région de Boumerdes (Algérie). La partie aérienne est séchée à l'ombre, puis broyée pour donner une poudre à partir de laquelle l'extrait polyphénolique et flavonoïques ont été obtenus.

I.2.- Caractérisation phytochimique

Les tests phytochimiques réalisés soit sur la poudre, soit sur l'infusé à 10 %, ont pour objectif de rechercher les substances bioactives (métabolites primaires ou secondaires) synthétisées par cette plante. Les méthodes de caractérisation utilisées dérivent de celles décrites par [10,11].

I.3.- Extraction et dosage des polyphénols totaux

Selon la méthode adoptée, décrite par [12], une prise d'essai de 5 g de poudre de la partie aérienne d'*Echium vulgare* a été mise en macération dans 100 ml de méthanol 85% sous agitation magnétique pendant 72 heures. L'extrait a ensuite été stocké à 4°C durant 24 h, puis filtré. Le solvant a été évaporé à sec sous pression réduite à 70°C à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi R- 461). Le rendement de l'extraction est calculé en pourcentage du rapport de la masse de l'extrait obtenu ($m - m_0$) sur la masse totale (mT) de la poudre végétale utilisée, selon la formule suivante :

$$R\% = (m - m_0) \times 100 / mT$$

La teneur en phénols totaux des extraits a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu, mélange de complexe d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide

phospho-molybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) de couleur jaune, décrite par [13].

Le test en question, consiste à mélanger une quantité de 0,5 ml de l'extrait à différentes concentrations avec 1ml du réactif de Folin–Ciocalteu fraîchement préparé (10 fois dilué) et 1ml de carbonate de sodium à 20 % ($Na_2 CO_3$). L'ensemble est incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 60 minutes et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 760nm. La quantification des polyphénols a été déterminée en fonction d'une courbe d'étalonnage, réalisée par l'acide gallique à différentes concentrations, dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche.

I.4.- Extraction et dosage colorimétrique des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes est réalisée selon la méthode de [14]. Ainsi, 20g de la matière sèche finement broyée est macérée dans du méthanol 85% (10% W/v) pendant 72 heures. Après filtration et évaporation à basse pression, la phase aqueuse obtenue est conservée pendant 48 heures à 4°C. Le filtrat subit plusieurs lavages successifs en utilisant comme solvant de fragmentation l'éther de pétrole (v/v), l'étherdiéthylique (v/v), l'acétate d'éthyle et le butanol (v/v). La phase aqueuse finale contenant les flavonoïdes les plus polaires, concentrée par évaporation à basse pression à 35°C, est prise en considération et fera l'objet d'analyses biologiques.

La méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) citée par [15] est adoptée pour quantifier les flavonoïdes, à l'aide d'une courbe d'étalonnage linéaire en utilisant la

quercétine (0,12mg/ml) comme standard. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (mg EQ/g).

I.5.- Effet scavenger du radical DPPH

L'évaluation de l'effet antioxydant est réalisée par le test de piégeage du radical libre DPPH, en adoptant la méthode décrite par [16]. Pour cela, un volume de 25 μ l de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations (de 0,0125 à 1mg/ml) sont ajoutés à 1,95 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,0024g/l). Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 25 μ l de méthanol avec 1,95 ml de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique, dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Le test est répété trois fois pour chaque concentration. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) selon la formule suivante:

$$I\% = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs test})}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

Où:

- **Abs contrôle** : absorbance moyenne du radical seul ; **Abs test** : absorbance du radical libre en présence d'antioxydant après trente minutes de contact ; **I %** : pourcentage d'inhibition.

I.7.- Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion

en milieu gélosé cité par [17]. Ainsi, cinq souches microbiennes ont été testées : *Esherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Candida albicans*. L'inoculum est préparé avec de l'eau physiologique stérile (0,9 %), et les charges bactériennes des inocula sont déterminées par la mesure de la densité optique à 620 nm sur un spectrophotomètre (BioSystems). L'absorbance doit être comprise entre 0,2 et 0,3. Ceci correspond à une concentration 10^6 UFC /ml. Des disques de 6 mm de diamètre de type Whatman n°1, stérilisés et imprégnés à raison de 15 μ L d'extraits ont été déposés à la surface d'un milieu préalablement ensemencé. Des témoins négatifs (eau distillée stérile) et positifs (solvant) ont été également utilisés. Après une incubation à 37°C pendant 24 h, les zones d'inhibition ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque essai et dans les mêmes conditions.

1.8.- Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Statistica 6. Toutes les expériences ont été réalisées en triple. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD. La comparaison des moyennes des mesures entre lots a été faite à l'aide du test t de Student ($p < 0,05$).

2. Résultats et discussion

2.1.- Caractérisation phytochimique

Selon le test phytochimique, on remarque que la partie aérienne de l'*Echium vulgare* est très riche en tanins totaux et en flavonoïdes. Cependant, elle est

moyennement riche en coumarines, mucilages et saponosides. En revanche, on note l'absence d'anthocyanes, des senosides, des alcaloïdes, des irridioïdes et des quinones. Les résultats de la présente étude sont en accord avec ceux trouvés par plusieurs auteurs. En effet, [18] ont signalé la richesse des feuilles de l'*Echiumpycnanthum*, une autre espèce du genre *Echium*, en tanins et en flavonoïdes. De même, [5] et [19] ont mentionné la présence des flavonoïdes, alcaloïdes, coumarines, tanins et saponosides dans les feuilles d'*Echiumvulgare* récoltée en Algérie. La richesse de cette espèce en ces métabolites secondaires est aussi signalée par [20] et [21]. Cette différence dans la richesse en métabolites est attribuée à l'adaptation évolutive de l'espèce aux conditions biotiques (l'espèce elle-même) et abiotiques (milieu). En effet, selon [22], les conditions climatiques (température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité), stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires influençant ainsi la composition chimique à différents lieux de croissance, tout au long du développement de la plante. Cette étude a également montré l'existence d'une réelle biodiversité moléculaire, qui confère à la plante des vertus médicinales importantes à valorisées. Il est important de signaler que la richesse en flavonoïdes et en tanins lui confère de nombreuses vertus médicinales. Les effets biologiques des flavonoïdes ont été décrits par plusieurs auteurs: antioxydantes [23], anti-inflammatoires, inhibiteurs d'enzymes, anti-allergiques, anti-ulcérogènes, et antimicrobiens [24]. Quant aux tanins, avec leurs propriétés de former des complexes avec les protéines, ces métabolites présentent des propriétés anti

diarrhétiques, antibactériennes, antifongiques, et antiseptiques. Ce qui pourrait expliquer l'utilisation traditionnelle de la partie aérienne d'*Echiumvulgare* dans le traitement des plaies, des furoncles et des abcès [25].

2.2.-Rendement de l'extraction et détermination de la teneur en polyphénols

L'extrait polyphénolique présente un aspect liquide et une couleur marron foncé. Le rendement en polyphénols bruts obtenu à partir de trente grammes (30g) de poudre végétale est de 9,95%, avec une teneur de $121,6\text{mg} \pm 0,03 \text{ mg EAG /g}$. [26] en utilisant l'éthanol comme solvant, ont noté une faible teneur en polyphénols totaux des feuilles d'*Echium.vulgare*, soit $68 \pm 0.73 \text{ mg EAG /g}$ de poudre. Cette différence peut être due à la méthode d'extraction [27] et la région de récolte. D'après [28], la méthode d'extraction doit permettre d'avoir une fraction complète en composés d'intérêt et doit éviter leur modification chimique. De plus, et selon ces auteurs, l'eau, les mélanges aqueux de l'éthanol, du méthanol et de l'acétone sont généralement utilisés. Par ailleurs, [29] ont signalé que la solubilité des composés phénoliques est fonction de leur degré de polymérisation, de leur interaction avec les autres constituants et le type de solvant utilisé. Enfin et selon [30] et [31], l'utilisation de solvants mixtes aboutit à un fort enrichissement des extraits en polyphénols.

2.3.- Rendements et dosages des flavonoïdes

L'extrait flavonoïque présente un aspect liquide et une couleur marron foncé. Le rendement en flavonoïdes obtenu à partir de trente grammes (30g) de poudre végétale est de 20,82 %, soit 47,63 mg

EQ/g, ce qui montre la richesse d'*Echiumvulgare* en ces métabolites. Il ressort des données qu'*Echiumvulgare* est riche en flavonoïdes mono glycosides (20,82%), mais pauvre en flavonoïdes aglycones (6,55%). La concentration des flavonoïdes est plus importante dans la phase d'éther diéthylique par rapport aux deux autres phases (d'acétate d'éthyle et butanolique). La présence de ces métabolites secondaires dans la partie aérienne de cette plante médicinale est signalée par [5], récoltée en Algérie avec une concentration de 33,35 mg EC/g de poudre.

2.4.- Activité antioxydante

Les résultats de l'activité antiradicalaire des extraits de la plante médicinale *E. vulgare* et du témoin positif acide ascorbique déterminés par la méthode au DPPH sont représentés dans la figure 1.

Les pourcentages d'inhibition du radical des extraits phénoliques varient avec les fractions testées. D'après les résultats, il est à remarquer que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente significativement ($p > 0.05$) avec l'augmentation de la concentration. Le taux d'inhibition du DPPH enregistré en présence des différents extraits est inférieur à ceux d'acide ascorbique. A une concentration de 60mg/ml, une différence significative entre l'acide ascorbique et les extraits est notée ($p > 0.05$). En effet, les polyphénols et les flavonoïdes ont révélé une activité importante avec plus de 60%, par rapport à l'acide ascorbique (97,25 %). A une concentration de 80mg/ml, le pourcentage d'inhibition des extraits polyphénoliques, extraits flavonoïques aqueux F4 sont plus élevés, atteignant les 80%. Les autres fractions F1 (extrait d'éther diéthylique), F2 (extrait d'acétate

d'éthyle)et F3 (extrait *n*-butanol) ont donné un pourcentage d'inhibition de 65,2 % ; 78,9 % ; et 76,6 % respectivement.

pourcentage d'inhibition

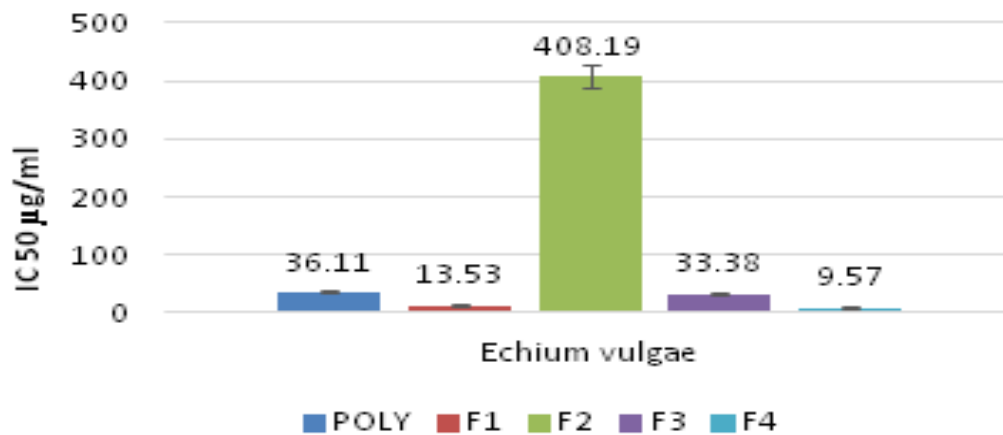


Figure 1. Taux d'inhibition radicalaire en fonction des concentrations des extraits de *E. vulgare*

Poly : extrait polyphénolique; **F1** : extrait d'éther diéthylique; **F2** : extrait d'acétate d'éthyle;
F3 : extrait *n*-butanol; **F4** : extrait aqueux

La différence de l'activité est mise en évidence en utilisant la valeur de la concentration inhibant 50% du DPPH appliquée (IC₅₀). Une valeur d'IC₅₀ faible correspond à une activité antioxydante élevée. Les résultats observés lors des tests antioxydants ont fait ressortir la capacité des extraits polyphénoliques et flavonoïques à inhiber le radical stable DPPH. L'activité antiradicalaire manifestée par l'extrait polyphénolique et flavonoïque aqueux de *Echium vulgare* présente des valeurs d'IC₅₀ importantes et très prometteuses, très proches de celle de l'acide ascorbique, soit 34,78 µg/ml et 36,11 mg/ml respectivement.

La forte activité des extraits aqueux est attribuée à leur richesse en composés phénoliques polaires. En effet, une étude réalisée par [32] a suggéré que les molécules polaires présentes dans les extraits végétaux contribuent à l'augmentation de l'activité antioxydante.

2.5.- Activité antimicrobienne

La sensibilité des germes vis-à-vis des métabolites secondaires est exprimée par l'apparition des zones d'inhibitions. Dans le tableau 1 sont incluses les valeurs en (mm) des diamètres d'inhibition relatives aux différentes souches testées.

Tableau 1. Diamètre d'inhibition en mm des extraits d'*Echium vulgare*

| Microorganismes | | |
|-------------------------------|-------------|-------------|
| | Polyphénols | Flavonoïdes |
| <i>Escherichia coli</i> | 23 ± 0,075 | 11 ± 0,076 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 16 ± 0,043 | 11 ± 0,046 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 10 ± 0,006 | 19 ± 0,036 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | - | - |
| <i>Candida albicans</i> | 41 ± 0,026 | 12 ± 0,016 |

L'antibiogramme a pour but de prédire la sensibilité après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C pour les bactéries et 28°C pendant 72h pour la levure. Les résultats obtenus ont montrés que les diamètres des zones d'inhibition diminuent graduellement avec les dilutions. Le pouvoir antibactérien des extraits d'*Echium vulgare* diffère d'un microorganisme à un autre. Les bactéries *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* se sont montrées sensibles à l'extrait polyphénolique et aux flavonoïdes. Le diamètre d'inhibition varie de 10±0,006 mm (*Staphylococcus aureus*) à 23±0,75 mm (*Pseudomonas aeruginosa*). En revanche, *Klebsiella pneumoniae* s'est révélée résistante aux deux extraits. Enfin, la levure s'est montrée fortement sensible à l'extrait polyphénolique de la partie aérienne (41±0,026 mm).

A partir des dilutions en série des différents extraits bruts, nous avons tenté de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice « CMI ». L'unique valeur déterminée est obtenue sur la souche *S. aureus*, soit 15,2 mg/ml pour l'extrait polyphénolique et 0,297 mg/ml pour l'extrait aqueux. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par [33]. Cet auteur a signalé des CMI dépassent 1 mg/ml vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. Par ailleurs, des résultats proches sont notés par [5], concernant l'effet inhibiteur des flavonoïdes de la partie aérienne

d'*Echium vulgare* vis-à-vis d'*E. coli* (13 mm), *P. aeruginosa* (12 mm), *Staphylococcus aureus* (12 mm), et *Candida albicans* (15 mm). Cependant, il a noté une sensibilité pour *Klebsiella pneumoniae* avec des zones d'inhibition d'environ 16 mm. Quand au comportement de *Candida albicans*, les résultats obtenus vont dans le même sens que ceux révélées par [9] et [34]. L'activité antibactérienne des composés naturels s'explique par la lyse des membranes des bactéries. Les flavonoïdes et les tanins peuvent induire une fuite d'ions potassium au niveau de la membrane, ce qui entraîne des lésions irréversibles. Cette perméabilité au potassium est un effet précurseur de leur mort [35]. La variabilité des résultats de l'activité biologique des extraits végétaux peut dépendre du contenu en composés polyphénoliques, et des différents mécanismes d'action. Leur relative toxicité envers les microorganismes, est liée aux sites et aux nombre des groupements hydroxyyles. [36] a signalé que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité. Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés et plus ils sont inhibiteurs des microorganismes [37]. Selon [38], l'activité antimicrobienne est liée à la polarité des substances bioactives. Les composés les moins polaires comme les flavonoïdes n'ayant pas de groupement hydroxyle OH sur leur cycle B sont plus

actifs vis-à-vis des agents microbiens que ceux portant le groupement hydroxyle. Les travaux de [39], ont montré également que l'effet d'un extrait est probablement due à la synergie entre les différents composants, qui, lorsqu'ils sont séparés deviennent inactifs individuellement. Ceci est interprété par le fait que les plantes produisent une variété énorme de petites molécules antibiotiques ayant un large spectre de structures telles que les terpénoïdes, les glycostéroïdes, les flavonoïdes et les polyphénols [39]. Dans le même ordre d'idée, [40] a signalé que les flavane-3-ols, les flavonols et les tanins ont un large spectre et une forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols. Ces molécules ont la capacité de supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne telle que l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte et la neutralisation des toxines bactériennes ainsi leur capacité d'établir une synergie avec certains antibiotiques. Cependant, la plupart de ces petites molécules ont une faible activité antibiotique par rapport aux antibiotiques communs produits par les bactéries et les champignons [39].

Conclusion

Cette étude contribue à la connaissance des potentiels antioxydants et antimicrobiens d'*Echium vulgare* *in vitro*. Les résultats obtenus montrent l'importance de valoriser les extraits de la partie aérienne de la plante d'*Echium vulgare* dans le traitement des infections microbiennes. Il serait également intéressant de réaliser d'autres études pour évaluer le potentiel antioxydant et antimicrobien *in vivo*.

Références bibliographiques

- [1] Novais M.H., Santos I., Mendes S., Pinto-Gomes C. : Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *Journal of ethnopharmacology*; 2004; 93(2-3): 183-195.
- [2] Mau J.L., Chang C.N., Huang S.J., Chen C.C. : Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus mycelia*. *Food chemistry*; 2004; 87(1): 111-118.
- [3] Kirby G.C. : Medicinal plants and the control of protozoal disease, with particular reference to malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 1996; 90(6): 605-609.
- [4] Da Silva J.A.T. : Mining the essential oils of the Anthemideae. *African Journal of Biotechnology*; 2004; 3(12): 706-720.
- [5] Bentabet N., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K. : Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie*; 2014; 12(6): 364-371.
- [6] Kherbouche H. Evaluation de l'activité cytotoxique des extraits de plantes: *Fredolia aretioides* et *Echium vulgare* vis-à-vis des globules rouges humains. Tlemcen. 2014. 45p.
- [7] Karakaş F.P., Yildirim A., Türker A. : Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities. *Turkish Journal of Biology*; 2012; 36(6): 641-652.
- [8] Sezik E. : Parasiticidal, antifungal and antibacterial activities of *Onosmagriffithii* Vatke. *African Journal of Biotechnology*; 1997; 8(19): 5084-5087.
- [9] Boullard B. Plantes médicinales du monde. Réalités et croyances. Ed. ESTEM, Paris. 2001. 636p.
- [10] Harborne A.J. *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Ed. Springer, Netherlands. 1998. 302p.

- [11] Raaman N. Phytochemical techniques. Ed. Publishing Agency, New Delhi. 2006. 306p.
- [12] Bidié A.P., Ernest K., N'guessan J.D., Joseph D.A., Frédérique G.: Influence of *Mitragyna ciliate* (Myta) on the microsomal activity of ATPase Na⁺/K⁺ dependent extract on a rabbit heart. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines; 2008;5(3): 294-301.
- [13] Wong S.P., Leong L.P., Koh J.H.W.: Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. Food Chemistry; 2006; 99: 775-783.
- [14] Markham K.R.: Technics of flavonoids identification. Ed. Academic Press, London. 1982. 113p.
- [15] Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N.: Antioxidant Activity of Some Algerian Medicinal Plants Extracts Containing Phenolic Compounds. Food Chemistry; 2006; 97(4): 654-660.
- [16] Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F.: A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. J. Sci. Technol. Inter.; 1998; 8: 121-137.
- [17] Gupta V.K., Roy A., Nigam V.K., Mukherjee K.: Antimicrobial activity of *Spondiaspinnata* Resin. Journal of Medicinal Plants Research; 2010; 4(16): 1656-1661.
- [18] Chaouche T., Atik-Bekara F., Haddouchi F., Boucherit Z.: Antibacterial activity of different extract of *Echium pycnanthum* Pomel. J. chem. pharm. Res.; 2012; 4(1): 216-220.
- [19] Tomás-Barberán F.A., Tomás-Lorente F., Ferreres F., Garcia-Viguera C.: Flavonoids as biochemical markers of the plant origin of bee pollen. Journal of the Science of Food and Agriculture; 1989;47(3): 337-340.
- [20] Baba-Ahmed S. Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne des extraits d'*Echiumvulgare* de la région de Remchi (Tlemcen). Master; Univ. Tlemcen. 66p.
- [21] El-Shazly A., Abdel-All M., Tei A., Wink M.: Pyrrolizidine alkaloids from *Echium rauwolfii* and *Echium horridum* (Boraginaceae). ZeitschriftfürNaturforschung C; 1999; 54(5-6): 295-300.
- [22] Fadili K., Amalich S., N'Dedianhoua S.K., Bouachrine M., Mahjoubi M., EL Hilali F., Zair T.: Polyphenols content and antioxidant activity of two species from Moroccan High Atlas: *Rosmarinus officinalis* and *Thymus satureioides*. International Journal of Innovation and Scientific Research; 2015; 5 (17): 24-33.
- [23] Iserin P.: Encyclopédie des plantesmédicinales. Ed. Ybert, Tatiana Delasalle-Feat, London. 2001. 335p.
- [24] Cushnie T.T., Lamb A.J.: Antimicrobial activity of flavonoids. International journal of antimicrobialagents; 2005; 26(5): 343-356.
- [25] Bruneton J.: Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales. Ed. Tec et Doc, Paris. 2009. 1269p.
- [26] Conforti F., Sosa S., Marrelli M., Menichini F., Statti G.A., Uzunov D., Menichini F.: The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: the role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. Food Chemistry; 2009; 112(3): 587-594.
- [27] Lee J.Y., Chang E.J., Kim H.J., Park J.H., Choi S.W.: Antioxidative flavonoids from leaves of *Carthamustinctorius*. Archives of pharmacal research; 2002; 25(3): 313-319.
- [28] Turkmen N., Velioglu Y.S., Sari F., Polat G.: Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. Molecules; 2007; 12(3): 484-496.
- [29] Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C.: Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their

- biological activities. *Comptes Rendus Biologies*; 2008; 331(5): 372-379.
- [30] Mohammedi Z., Atik F.: Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarixaphylla* (L.) Karst. *Int. J. Pharmacogn. Biol. Sci.*; 2011;61(4): 363-374.
- [31] Bourgou S., Beji R.S., Medini F., Ksouri R.: Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*; 2016; 28(12): 1649-1655
- [32] Kang RS., Daniels CM., Francis SA., Shih SC., Salerno WJ., Hicke L., Radhakrishnan I.: Solution structure of a CUE-ubiquitin complex reveals a conserved mode of ubiquitin binding. *Cell*; 2003; 113(5): 621-630.
- [33] Kuruzum U.A., Guvenalp Z., Stroch K., Demirezer L.O. et Zeeck A.: Phytochemical and antimicrobial investigation oh *Echium vulgare* growing in Turkey. *Biochemical systematics and Ecology*; 2004; 32(9): 833-836.
- [34] Bidarigh S., Massiha A., Mohammad R.M. Pahlaviani K., Issazadeh K., Muradov PZ., Azarpour E.: Antimicrobial (Screening) properties of Various Plant Extracts from *Ocimum basilicum* L. and *Nerium oleander* L. against Fungal Common Rots of Potato *In vitro*. *Bioassay J. Basic. Appl. Sci. Res.*; 2012; 2(7): 6810-6815.
- [35] Rhayour, K. (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de Doctorat en Biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l'environnement et la santé; Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Maroc. 170p.
- [36] Cowan M.M.: Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*; 1999; 12: 564–582.
- [37] Scalbert A.: Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*; 1991; 30(12): 3875-3883
- [38] Chabot S., Bel-Rhlid R., Chenevert R., Piché Y.: Hyphal growth promotion *in vitro* of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker et Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂-enriched conditions. *New Phytologist*; 1992; 122(3): 461-467.
- [39] Sarker S.D., Latif Z., Gray A.I.: Natural products isolation. *Methods in Biotechnology*. Humana Press; 2005; 20: 1-25.
- [40] Daglia M., Papetti A., Mascherpa D., Grisoli P., Giusto G., Lingström P., Pratten J., Signoretto C., Spratt D.A., Wilson M., Zaura E., Gazzani G.: Plant and fungal food components with potential activity on the development of microbial oral diseases. *BioMedResearchInternational*; 20 11; 2011: 1-9.