



Banque Nationale de Gènes de Tunisie BNGT

Projet : Valorisation des espèces végétales autochtones Siciliennes et Tunisiennes avec un intérêt nutritif et bon pour la santé « ESPAS »

Groupe de Tâche 3: Recherches et Analyses pour la Définition de
Protocoles Scientifiques d'Espèce Végétales autochtones à haute valeur
Nutraceutique et de Santé dans la zone de coopération

Rapport Intermédiaire n°5

R 3.6 La détermination de la bioactivité des métabolites des espèces végétales objet d'étude.



Valorisation des espèces végétales
autochtones SICILIENNES & TUNISIENNES
avec un intérêt nutritif et bon pour la santé

Pr. Ramzi Chaabane (BNGT)
Dr. Awatef Rhimi (BNGT)
Dr. Neila Jellouli (BNGT)
MSc. Sonia Hjaoujia (BNGT)
Dr. Saloua Ouerghemmi (BNGT)

Banque Nationale de Gènes de Tunisie BNGT
Boulevard du Leader Yasser Arafat, 1080 Charguia 1, Tunis
Tél 1: 0021671771756
Tél 2: 0021671771678
Fax: 0021671771827
Mail: bng@bng.nat.tn
Site Web: <http://www.bng.na.tn>





R 3.6. La détermination de la bioactivité des métabolites des espèces végétales objet d'étude.

- **Activité 3.5.1.** Évaluation in vitro de la bioactivité des composés d'intérêt nutraceutique présents dans l'espèce végétale étudiée.
- **Activité 3.5.2.** Évaluation des effets de l'huile essentielle d'origan pour la protection des cultures.
- **Activité 3.5.3.** Création du Report intermédiaires sur la détermination de la bioactivité des métabolites à l'étude des espèces végétales



Sommaire

Introduction Générale.....5

I. Activités biologiques	6
1. Activité antioxydant.....	6
2. Activité antibactérienne.....	6
3. Activité antifongique.....	6
4. Activité antivirale.....	7
5. Activité anti-tumorale.....	7

A. Activités biologiques d'*Origanum vulgare*

Matériels et Méthodes

I. Huiles essentielles	8
II. Evaluation des activités biologiques	8
1. Evaluation de l'activité antioxydante.....	8
1.1. La méthode de DPPH.....	8
a. Principe.....	8
b. Mode opératoire.....	9
2. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	9
2.1. Origine et choix de souches bactériennes.....	9
2.2. Méthode de diffusion sur milieu gélosé (Aromatogramme)	
a. Préparation des suspensions microbiennes.....	11
b. Préparation des disques.....	11
c. Ensemencement.....	11
d. Dépôt des disques.....	12
e. Interprétation des résultats.....	12
2.3. Analyses statistiques.....	12
3. Evaluation de l'activité antifongique.....	12
3.1. Origine et choix de souches fongiques.....	12
3.2. Méthode de diffusion de disque.....	13
4. Evaluation de l'activité insecticide.....	14
4.1. Origine et choix de l'insecte utilisé	14
4.2. Milieux alimentaires.....	14
4.3. Effet bio-insecticide de l'HE.....	14
a. Méthode expérimentale	14
b. Estimation de l'effet de l'HE sur la survie et la dynamique des insectes....	15
c. Test de répulsivité.....	16



Résultats et discussions

A. Activités biologiques d'<i>Origanum vulgare</i>.....	18
I. Introduction.....	18
II. Ethnopharmacologie et Propriétés phytothérapeutique d'<i>Origanum vulgare</i>.....	19
III.. Activités biologiques d'<i>Origanum vulgare</i>.....	20
1. Activité antioxydante	20
2. Activités antibactériennes.....	21
3. Activités antifongiques.....	22
4. Activités insecticides	23
Conclusions.....	24
B. Activités biologiques de <i>Rosa</i> sp.	26
I. Evaluation de l'Activité Anti-oxydante chez le genre <i>Rosa</i>.....	26
1. Introduction.....	26
2. Méthodologie.....	27
2.1. Test DPPH	28
2.2. Test TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).....	28
2.3. Pouvoir réducteur du fer par test de FRAP	28
2.4. Test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).....	28
3. Résultats	
I. Activité Anti-oxydante évaluée chez le genre <i>Rosa</i>	
1. Pouvoir antioxydant des extraits de <i>Rosa canina</i>	29
1.1. Organes végétatifs.....	29
1.2. Cynorrhodons.....	29
2. Pouvoir antioxydant des extraits de <i>Rosa sempervirens</i>	30
3.2.1. Organes végétatifs.....	30
3.2.2. Cynorrhodons.....	31
3. Pouvoir antioxydant des extraits de <i>Rosa moschata</i>	33
3.3.1. Organes végétatifs.....	33
3.3.2. Fleurs.....	33
4. Discussion.....	35
II. Evaluation de l'Activité antibactérienne chez le genre <i>Rosa</i>.....	37
1. Evaluation de l'Activité antibactérienne chez le genre <i>Rosa</i>	37
2. Conclusions	



Liste des Figure

Figure 1 : Structure chimique du radical synthétique DPPH et du DPPH-H (non radicalaire)

Figure 2 : Les souches bactériennes testées

Figure 3 : Schéma simplifié du principe de la méthode de diffusion sur gélose

Figure 4 : Schéma simplifié du principe de la méthode de diffusion

Figure 5 : Schéma simplifié du principe de la méthode d'évaluation de l'effet bio insecticide de l'HE d'Origan

Figure 6 : Estimation de l'effet répulsif sur les adultes

Figure 6 : Test bioinsecticide des huiles de différentes localités d'Origan

Figure 7 : Activité antioxydante des extraits organiques des péricarpes et akènes de *Rosa sempervirens*.

Figure 8 : Activité antioxydante des extraits aqueux des fleurs de *Rosa moschata*

Figure 9 : Effet de l'extrait de *Rosa sempervirens* sur les bactéries testées

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Souches bactériennes testées

Tableau 2 : Doses d'HE, temps et solvants testées

Tableau 3 : Pourcentage de répulsion selon Mc Donald *et al.* (1970)

Tableau 4 : Activité antioxydante des extraits organiques des feuilles et des tiges de *Rosa canina*.

Tableau 5 : Activité antioxydante des extraits organiques des feuilles et des tiges de *Rosa sempervirens*.

Tableau 6 : Activité antioxydante des extraits organiques des feuilles et des tiges de *Rosa moschata*.

Tableau 7 : Diamètres des zones d'inhibition pour *Escherichia coli* par la méthode de disque

Tableau 8 : Diamètres des zones d'inhibition pour *Staphylococcus aureus* par la méthode de disques pour les extraits de cinq solvants



Introduction Générale

Actuellement environ 180 espèces typiquement médicinales et aromatiques sont généralement utilisées en parfumerie, en agroalimentaire et surtout en médecine ou en pharmacie. Plusieurs populations rurales à travers le monde, utilisent ces plantes ou parties de ces plantes (sous différentes formes) pour leurs soins primaires.

Aujourd'hui, malgré le développement spectaculaire de la chimiothérapie, la phytothérapie reste très utilisée. En effet, l'utilisation des métabolismes secondaires des plantes pour remplacer les médicaments synthétiques a connu un essor particulier. Ces métabolismes se sont avérés efficaces pour lutter contre divers maladies (cardiovasculaires, glycémie, cancers, infections virales et fongiques, inflammatoires, dégénérescence des neurones, etc.). Les plantes médicinales constituent une véritable usine de synthèse de ces métabolites.

Parmi les diverses plantes médicinales et aromatiques, les genres *Rosa L.*, (famille des *Rosaceae*) et *Origanum L.* (famille des *Lamiaceae*), suscitent aujourd'hui beaucoup d'intérêt sur le plan économique grâce à leurs diverses utilisations de ses fleurs, fruits, huiles essentielles, huiles des graines et dans le domaine alimentaire, cosmétique, des produits pharmaceutiques, médecine traditionnelles en raison de leur richesse en composés bioactifs comme le phénol, caroténoïde, tocophérols, terpènes, glucolipides, des acides gras, des acides organiques, sucres, protéines et minéraux. ce qui leurs donnent des propriétés antiseptiques, anti-diarrhéiques et anti-bronchiques. Notre travail dans le cadre de valorisation des plantes médicinales et aromatiques et après la caractérisation quantitative et qualitative nous sommes passés à l'investigation des activités biologiques telle que l'activité antioxydante, l'activité antibactérienne, l'activité antifongique et l'activité bio-insecticide effectué sur des huiles et des extraits largement utilisées dans les médicaments, les produits alimentaires et cosmétiques.



I. Activités biologiques

1. Activité antioxydant

Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir (LAIB., 2011).

2. Activité antibactérienne

L'action des HEs sur la prolifération microbienne se fait à travers l'altération de la perméabilité membranaires des bactéries en perturbant les systèmes de transport ionique ; le transport des électrons et la production de l'énergie. Le mode d'actions d'HE dépend du type de microorganisme. En général bactérie GRAM- sont plus résistantes que les GRAM + grâce à la structure de leur membrane interne (OUIS ., 2015) .

3. Activité antifongique

Le pouvoir antifongique des HEs des plantes aromatiques contre les moisissures allergisantes et contre les champignons pathogènes et opportunistes tel que *Candida albicans* (SAIMI ., 2014) .

Auteur	Activité	Méthode	Extraction	Résultats
Shahidi Bonjar et al. [61] (2004) (<i>O.majorana</i>)	Antibactérienne	Diffusion sur gélose utilisant les puits	Macération par méthanol	DI : entre 7 et 14mm sur, <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> et <i>B. cereus</i>
A.R. Khosrav et al. [74] (2011) <i>O.vulgare</i>	Antifongique (16 isolats de <i>C. glabrata</i>)	Diffusion sur gélose utilisant les puits/macrodilution en milieu liquide	Hydrodistillation	DI : 18–40 mm avec (moyenne: 27.1 mm) CMI: 0.5 à 1100mg/ml (moyenne: 340.2mg/ml)
P. Pozzatti et al. [69] (2010)	antifongique	Microdilution en milieu liquide	Hydrodistillation	CMI: 400 et 1600 µg/ml pour <i>C. albicans</i> et entre 400 et 800 µg/ml pour <i>C. dubliniensis</i> .
Maarif et al. (<i>O. vulgare</i>) [75]	Antifongique	Macrodilution en milieu solide gélosé	Hydrodistillation	CMI: <i>C. albicans</i> : 2,5 % v/v <i>T. rubrum</i> : 0,312% v/v <i>M.canis</i> : 0,156% v/v <i>A. niger</i> : 1,25% v/v
Notre étude	Antifongique	Macrodilution en milieu liquide	Hydrodistillation	CMI: 0,125 à 0,5% (v/v)

Différent résultats obtenus sur l'activité antifongique de l'origan



4. Activité antivirale

Les virus sont généralement fortement sensibles aux molécules aromatiques des HEs telle que les monoterpénols et les monoterpénals (SAIMI., 2014). De nombreuses pathologies virales sévères traitées avec des HEs (ZENASNI., 2014).

5. Activité anti-tumorale

Certaines huiles essentielles présentent des activités anti-tumorales et sont utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers. L'huile essentielle de *Nigella sativa* L démontre une activité cytotoxique contre différentes lignées tumorales (TOURE., 2015). ainsi que l'huile essentielle de *Myrica gale* exerce un effet inhibiteur sur la croissance des cellules cancéreuses des poumons, et du colon. (LEMAOUI., 2011).



A. Activités biologiques d'*Origanum vulgare*

Matériels et Méthodes

I. Huiles essentielles

Les échantillons végétaux extraits correspondent aux parties aériennes de d'Origanum et de Rosa récoltées dans différentes régions du nord de la Tunisie. Les huiles essentielles ont été obtenues par hydrodistillation, réalisée à l'aide de l'appareil de Clevenger, selon la méthode décrite dans la Pharmacopée européenne (1975). Les huiles essentielles ont été déshydratées sur sulfate de sodium anhydre et stockées à 4 °C à l'obscurité.

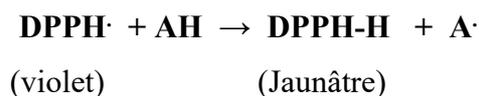
II. Evaluation des activités biologiques

1. Evaluation de l'activité antioxydante

1.1. La méthode de DPPH

a. Principe

Le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) est un radical libre stable. Le DPPH est caractérisé par une couleur violette. La réduction des radicaux DPPH par un agent antioxydant (substance donneuse de protons) entraîne une décoloration de la solution.



Il est donc possible de détecter la diminution de l'intensité de cette coloration par spectrophotométrie. Cette décoloration met en évidence le pouvoir antioxydant d'un échantillon par sa capacité à piéger le radical libre (**Fig. 1**).

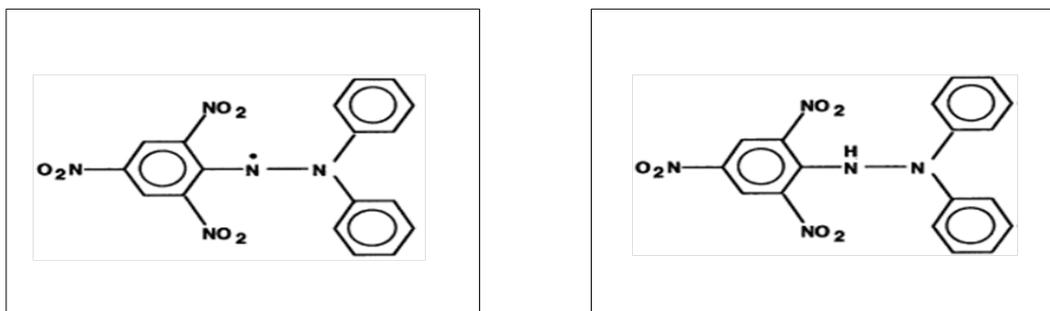


Figure 1 : Structure chimique du radical synthétique DPPH et du DPPH-H (non radicalaire)



b. Mode opératoire

La capacité de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* à piéger les radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) a été évaluée. Pour la mesure de l'activité, une prise d'essai de 500µl d'extrait à différentes concentrations est mise en présence de 200 µl d'une solution de DPPH (0.15mM). Le mélange est placé pendant 30 mn à l'obscurité pour réagir (Hatano, 1988) et l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un témoin négatif (sans extrait) un spectrophotomètre UV-Visible (DeNovix DS-11). Le témoin positif utilisé est un antioxydant de synthèse : le 2,6-di-t-butyl-4-méthylphenol ou butylhydroxytoluène (BHT). L'inhibition du radical est traduite par une diminution de l'intensité de la coloration du mélange. Les pourcentages d'inhibition sont calculés selon la formule suivante:

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

PI : pourcentage d'inhibition.

DO *témoin* : absorbance du témoin négatif.

DO *extrait* : absorbance de la solution d'extrait méthanolique.

L'étude de la variation de l'activité anti-radicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (CI₅₀). Elle est calculée graphiquement par les régressions linéaires des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de chacun des extraits étudiés. Ce paramètre (CI₅₀) est la concentration nécessaire de l'antioxydant pour réduire 50% du radical DPPH. Une valeur faible de CI₅₀ correspond à une grande efficacité de l'extrait.

2. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été déterminée d'abord par la méthode de diffusion des disques, en raison de sa simplicité et son efficacité pour tester la sensibilité des bactéries. Cette méthode nous permet également de savoir la nature de l'activité antibactérienne de différents huiles et extraits de la plante (bactériostatique ou bactéricide).

2.1. Origine et choix de souches bactériennes

Les souches bactériennes choisies pour cette étude sont des bactéries pathogènes, résistantes aux antibiotiques et certaines sont impliquées fréquemment dans la contamination et l'altération des produits alimentaires (Tableau 1). Ces souches nous ont été fournies par le



laboratoire bactériologie de l'Institut Supérieur des Sciences Biologiques Appliquées de Tunis (ISSBAT).

Tableau 1 : Souches bactériennes testées

Réaction à la coloration de GRAM	Souches
Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>
Gram négatif	<i>Escherchia coli</i>

Escherchia coli (Fig. 2) : est un bacille à Gram négatif appartenant à la famille des *Entérobactéries*. Elle a la forme de bâtonnet et elle peut être mobile ou immobile. C'est une bactérie commensale de la flore intestinale des mammifères et des oiseaux. Cependant, elle peut être à l'origine de pathologies allant de toxi-infection alimentaire à la mort. Les principaux modes de transmissions des infections dues à *E. coli* à l'être humain sont la consommation d'aliments contaminés (viande de bœuf peu cuite, produits non pasteurisés), l'ingestion d'eau contaminée et le contact avec des animaux (Chahed et *al.*, 2007).

Staphylococcus aureus (Fig. 2) : est une coccobactérie à Gram positif, catalase positive appartenant à la famille des *Staphylococcaceae* (Murray et *al.*, 2003; Becker et *al.*, 2004). Elle est immobile, asporulée, facultativement anaérobique et habituellement disposée en grappes. Elle fait partie de la flore humaine, allant des affections qui évoluent spontanément vers la guérison à des pathologies mortelles (Murray et *al.*, 2003). Cette bactérie est une des principales causes de toxi-infections alimentaires, résultant de la consommation d'aliments contaminés (Le Loir et *al.*, 2003). L'intoxication alimentaires par les staphylocoques se caractérise par une apparition brutale de nausées, de vomissements, de douleurs abdominales, de crampes et de diarrhée (Le Loir et *al.*, 2003 ; Murray et *al.*, 2003)

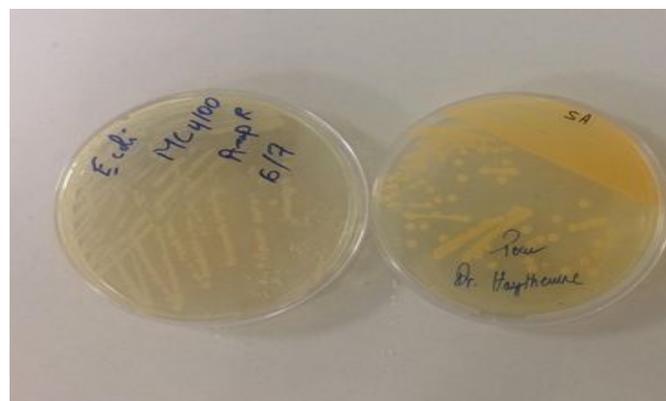


Figure 2 : Les souches bactériennes testées



2.2. Méthode de diffusion sur milieu gélosé (Aromatogramme)

Cette technique repose sur le pouvoir migratoire d'un extrait sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Pétri (Fig. 3). Elle consiste à déposer un disque stérile, imbibé de l'extrait, sur un tapis bactérien au tout début de sa croissance et de mesurer la zone où les bactéries n'ont pas pu se développer. Le diamètre d'inhibition, qui traduit l'activité antibactérienne de l'extrait est ainsi déterminé (Hussain et *al.*, 2010).

L'aromatogramme a été effectué par la technique de diffusion en milieu gélosé BrainHeart Infusion Agar (BHI).

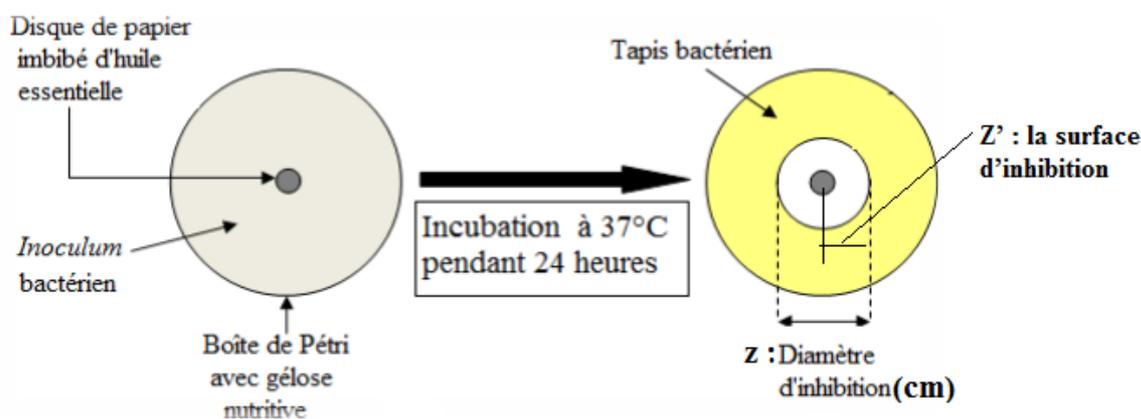


Figure 3 : Schéma simplifié du principe de la méthode de diffusion sur gélose

a. Préparation des suspensions microbiennes

L'inoculum a été réalisé à partir d'une culture de 24 heures sur gélose. La suspension bactérienne se fait par le transfert en conditions antiseptiques, d'une colonie bactérienne vers un tube d'eau physiologique puis homogénéisée et gardée sur une paillasse pendant 30 min (OMS, 2005).

b. Préparation des disques

Les disques ont été préparés à partir du papier Wattman de 6 mm de diamètre. Ensuite, ces disques sont mis dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave, puis stockés à une température ambiante.

c. Ensemencement

Les suspensions préparés ont été ensuite ensemencées par écouvillonnage sur des boîtes de Pétri contenant le milieu BHI (BrainHeart Infusion Agar).



d. Dépôt des disques

Les disques imprégnés de l'extrait ont été déposés aseptiquement sur la gélose. Les boîtes sont maintenues à 4°C pendant 1h pour que l'extrait puisse diffuser.

e. Interprétation des résultats

Après 24 heures d'incubation à 37°C, l'activité antibactérienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour des disques contenant l'extrait à tester. D'après Ponce *et al.*, (2003), la sensibilité à l'extrait a été classée par le diamètre des zones d'inhibition :

- Non sensible (-) pour les diamètres moins de 8mm.
- Sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14mm.
- Très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19mm.
- Extrêmement sensible (+++) pour les diamètres supérieurs à 20mm.

2.4. Analyses statistiques

Les données des paramètres morphologiques, phytochimiques et biologiques sont analysées en utilisant le système d'analyse statistique (SAS 9.1). Les résultats sont exprimés sous forme de valeurs moyennes \pm Ecart type de la moyenne de trois répétitions. Les différences entre les échantillons sont évaluées par analyse de variance à un facteur (ANOVA) et test de Duncan de gamme multiples. Elles sont considérées significatives à des valeurs de $p < 0,05$, hautement significative pour $p < 0,01$ et très hautement significative pour $p < 0,001$. L'évaluation de la corrélation entre les différents paramètres est assurée en déterminant le coefficient de Pearson.

Une analyse en composantes principales (ACP) et une classification hiérarchique (ACH) sont établies au moyen du logiciel STATISTICA (StatSoft version 13.5) afin de déterminer les relations entre provenances.

3. Evaluation de l'activité antifongique

3.1. Origine et choix de souches fongiques

Les souches fongiques utilisées dans cette étude sont choisies sur la base de leur implication fréquente dans la contamination et l'altération des produits alimentaires. Les souches testées sont : *Botrytis cinerea* et *Fusarium graminearum*.



- ***Botrytis cinerea*** : c'est le champignon responsable de la moisissure grise (*gray mold*) sévissant fréquemment sur tomate, comme sur de nombreuses autres cultures légumières. Tous les organes aériens peuvent être affectés, les principaux symptômes se manifestent essentiellement lors de la mise à fruits et sur les tiges.
- ***Fusarium graminearum*** : Ce champignon est l'un des agents pathogènes responsables de fusarioses chez les céréales, notamment la fusariose du blé et la fusariose du maïs. Ces maladies, outre les pertes de rendement, provoquent des contaminations des grains récoltés par des mycotoxines dangereuses pour la santé humaine et animale.

L'isolement (trois répliques), la culture (sur milieu frais stérile de Potato Dextrose Agar et incubée à 27 ° C) et l'identification (clés taxonomiques) des champignons utilisés ont été réalisés à l'Institut Nationale de Recherche Agronomiques de Tunis (INRAT).

3.2. Méthode de diffusion de disque

Tout d'abord, l'activité antifongique a été déterminée par la méthode de diffusion de disque. Elle est réalisée dans des boîtes de Pétri contenant 25 ml du milieu de Potato Dextrose Agar (PDA) (Fig. 4). Le milieu PDA est d'abordensemencé avec un fragment d'une colonie fongique de 10mm de diamètre prélevé d'une culture âgée de sept jours dans le milieu PDA ; ensuite un morceau de 1 cm² de papier Wattman est déposé au centre de la boîte de Pétri. Les papiers sont imbibés, de différents volumes d'eugénol ou d'huile essentielle non diluée. Les concentrations testées s'étalent de 100 à 1200 µl/l. Le témoin non traité a été préparé dans les mêmes conditions avec un morceau de papier imprégné d'eau distillée. Afin d'empêcher la fuite des composés volatils de la culture, les boîtes sont scellées hermétiquement avec du Parafilm. Les cultures sont incubées à 25 °C pendant sept jours. Chaque essai est répété trois fois

Une huile essentielle capable d'inhiber la croissance d'un champignon peut avoir un effet antifongique fongicide sur ce champignon. Afin de déterminer la nature de cet effet, Une huile est considérée comme fongistatique lorsque la taille de la croissance fongique augmente ; dans le cas contraire et en absence de croissance, l'huile est qualifiée de non fongistatique



Figure 4 : Schéma simplifié du principe de la méthode de diffusion

4. Evaluation de l'activité insecticide

4.1. Origine et choix de l'insecte utilisé

Pour tester l'activité insecticide de l'HE d'*Origanum glandulosum*, nous avons travaillé sur des huiles essentielles extraites d'origan de 5 provenances différentes et un insecte qui est la *Tribolium castaneum* ou tribolium rouge de la farine (Red flour beetle) (Fig. 5). *Tribolium* est une espèce d'insectes de la famille des Tenebrionidae. Elle attaque essentiellement à la farine ou à la semoule, aux grains de céréale (blé, maïs et riz), et plus exceptionnellement aux fruits desséchés (raisins, figues, abricots). L'insecte est obtenu à partir de l'Institut National des Recherches Agronomiques de Tunisie (INRAT).

4.2. Milieux alimentaires

Un seul type de farine a été utilisé comme milieu alimentaire. Ce milieu a été choisi et préparé en collaboration avec l'INRAT.

4.3. Effet bio-insecticide de l'HE

Pour évaluer l'effet bio insecticide de l'HE brute, cette dernière a été administrée aux insectes (*Tribolium castaneum*) par saturation de leur environnement.

a. Méthode expérimentale : l'expérience a été réalisée pour contrôler la survie et la dynamique des insectes ravageurs dans la farine. Trois concentrations d'huiles essentielles pour chaque provenance (0.25, 0.5 et 1 μ l) et quatre temps d'incubation (1, 3, 5 et 24h) ont été testées. Le milieu alimentaire a été infesté à raison de 10 adultes par *Tribolium castaneum*. 36 boîtes



de pétri ont été préparés, contenant chacune la même quantité de farine. Chaque boîte est divisée en deux parties l'une contenant l'HE et l'autre servie de témoins. Toutes les bites ont été incubées au laboratoire à la température ambiante de 25°C et à une humidité relative 70% de HR.

Après 1, 3, 5 et 24h d'incubation, les boîtes ont été prélevées, pour le dénombrement des insectes ajoutés survivants.



Figure 5: Schéma simplifié du principe de la méthode d'évaluation de l'effet bio insecticide de l'HE d'Origan

d. Estimation de l'effet de l'HE sur la survie et la dynamique des insectes. Pour estimer l'effet bio pesticide de l'HE, cette dernière a été administrée aux insectes par saturation de leur environnement (par inhalation). Ainsi, la dose de l'HE a été pulvérisée sur un papier plissé déposé dans une boîte contenant 30g de farine et infestés par 10 adultes.

Le taux de mortalité est estimé par le pourcentage d'adultes morts après la saturation de leur milieu avec l'HE durant 1, 3, 5 et 24h. Pour les différentes provenances, trois répétitions sont réalisées pour chaque traitement. Les témoins ne reçoivent aucun traitement.

Tableau 2 : Doses d'HE, temps et solvants testées

Huile	Dose (μ l)	Time (h)	HO9
	0,25	1	73,33
		3	-80,00
		5	80,00
		24	80,00
	0,5	1	100,00
		3	86,67
		5	86,67
		24	46,67
	1	1	80,00
		3	80,00
		5	66,67
		24	33,33



e. Test de répulsivité

Ce teste consiste à étudier l'effet répulsif de l'HE d'origan, sur le ravageur *Tribolium castaneum*. Pour cela, nous avons suivi le protocole suivant :

- Découpage de deux parties égales d'un papier avec une longueur équivalente à la longueur de la boîte.
- Pulvériser une partie du papier avec la dose d'HE (0.25, 0.5 et 1 μ l) et garder l'autre partie du papier sans traitement.
- Après évaporation du solvant, les deux parties du papier sont rassemblées par un ruban adhésif.
- 10 adultes seront déposés au milieu de la boîte
- Au bout 1, 3, 5 et 24h, on dénombre les insectes retrouvés sur chaque côté du papier (Fig. 6).



Figure 6. Estimation de l'effet répulsif sur les adultes

Le pourcentage de répulsion (PR) est calculé comme suit :

NC : le nombre d'insectes présents sur la partie du papier non traitée

NT : le nombre d'insectes présents sur la partie du papier traitée avec une dose d'**HE** brute.

Le pourcentage de répulsion moyen pour chaque dose est calculé

L'huile sera attribuée à l'une des différentes classes répulsives selon le classement de Mc Donald *et al.* (1970) (Tableau 3).



Tableau 3. Pourcentage de répulsion selon Mc Donald *et al.* (1970)

Classe	Intervalle de répulsion	Propriété de la substance testée
0	PR<0.1%	Non répulsive
1	10-20%	Très faiblement répulsive
2	20-40%	Faiblement répulsive
3	40-60%	Modérément répulsive
4	60-80%	Répulsive
5	80-100%	Très répulsive



Résultats et discussions

A. Activités biologiques d'*Origanum vulgare*

I. Introduction

Origanum vulgare est une plante aromatique et médicinale vivace appartenant à la famille des Lamiacées. L'espèce est naturellement distribuée. L'espèce est endémique des régions algérienne et tunisienne. Ce genre a des activités biologiques importantes et agit contre différents types de maladies et est utilisé à des fins culinaires et économiques. En outre, il est également utilisé comme additif alimentaire. Ils sont également riches en substances amères. Les composés phytochimiques des espèces d'*Origanum* ont un intérêt accru en raison de leurs propriétés antimicrobiennes, antifongiques, insecticides et antioxydantes. Les huiles essentielles des espèces d'origan sont de riches sources de carvacrol, un composant d'une importance biologique particulière. Il est connu pour ses activités antibactériennes et antifongiques, ses effets antispasmodiques, son inhibition de l'acétylcholine estérase, l'inhibition de la peroxydase lipidique, son effet de piégeage des radicaux et son activité dépressive cardiaque. Les investigations phytochimiques de l'espèce ont abouti à l'extraction d'autres composés bioactifs importants. Cela indique la nécessité d'une étude approfondie pour la valorisation des informations supplémentaires sur l'importance médicinale, les activités biologiques et les propriétés de l'huile d'*Origanum vulgare*.

II. Ethnopharmacologie et Propriétés phytothérapeutique d'*Origanum vulgare*

Origanum vulgare a une grande importance dans l'industrie comme épices et comme conservateur alimentaire naturel et en phytothérapie et pharmacie. Il a une activité antifongique et antioxydante. Le genre *Origanum* se caractérise par une grande diversité morphologique et chimique. En raison de la variabilité des caractéristiques chimiques et aromatiques, les plantes d'*Origanum* sont largement utilisées dans les industries agricoles, pharmaceutiques et cosmétiques comme herbe culinaire, substances aromatisantes de produits alimentaires, alcooliques et parfumerie pour leur parfum épicé. Les espèces d'*Origanum* séchées sont utilisées pour la production d'huile essentielle et d'eau aromatique et elles sont utilisées comme



stimulants, analgésiques, expectorants, sédatifs et antiparasitaires dans la médecine populaire, mais surtout pour les troubles gastro-intestinaux. La sous-espèce *glandulosum* est utilisée non seulement comme tisane par la population locale, mais aussi pour soigner plusieurs maladies telles que les rhumatismes, la toux, le rhume et les troubles digestifs. Avec sa teneur élevée en huiles volatiles, il a été rapporté que l'origan possède divers avantages médicaux. pharmaceutiques, cosmétiques et de la parfumerie, ainsi que pour l'aromatisation et la conservation de plusieurs produits alimentaires.

III. Activités biologiques d'*Origanum vulgare*

1. Activité antioxydante

Les valeurs d'IC50 de piégeage des radicaux DPPH des huiles essentielles et extraits d'*O. glandulosum* variaient de 55 à 85 mg L⁻¹ (tableau 2). Les différentes accessions étudiées ont présenté une activité antioxydante variable selon les provenances. L'activité de piégeage des radicaux DPPH augmente avec la teneur totale en composés phénoliques des huiles essentielles (Activité 3.2). L'huile essentielle d'*O. glandulosum* des sites du Nord de la Tunisie a une teneur en polyphénols élevée et par conséquent une activité antioxydante élevée. Heo et al.³² ont fait référence à l'existence d'une corrélation entre le contenu phénolique total dans les extraits végétaux et l'activité de piégeage du DPPH.

Notre étude sur les huiles essentielles d'*O. glandulosum* de différentes provenances du nord de la Tunisie) a montré des valeurs d'activité antioxydante plus élevées par rapport à celles obtenues à partir d'*O. glandulosum* d'Algérie. Ce travail montre que les huiles essentielles d'origan tunisien sont de puissants antioxydants naturels et peuvent ainsi piéger les radicaux libres et réduire le taux de peroxydation des lipides.

L'activité antioxydante observée dans les huiles essentielles d'*O. glandulosum* est principalement due à la présence de carvacrol et de thymol. La présence d'autres composés supplémentaires comme le γ -terpinène,... semble également être importante.



D'après Mechregui et al. 2015, les huiles essentielles et extraits, criblés pour l'effet inhibiteur de l' α -amylase, ont montré une forte capacité à inhiber la dégradation de l'amidon par l' α -amylase pancréatique et salivaire. Les extraits et les huiles essentielles d'*O. vulgare* ont montré une activité antioxydante substantielle et un effet inhibiteur détectable sur l'activité de l' α -amylase, il pourrait donc être utilisé comme ingrédient conservateur naturel dans les industries alimentaires et/ou pharmaceutiques. L'huile essentielle d'*Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. de Tunisie et l'extrait de MeOH présentaient la capacité antioxydante et l'activité de chélation des métaux les plus élevées. Ils ont également montré la plus grande capacité de dégradation de l'amidon par l' α -amylase pancréatique ainsi que l'EtOH et les extraits aqueux. Les résultats montrent que le type de solvant d'extraction a fortement influencé les propriétés antioxydantes des extraits obtenus.

Les huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* récoltées au stade végétatif en Tunisie, étaient dominées par la fraction des monoterpènes oxygénés (66,18% à 78,17%), le carvacrol étant le composant principal de toutes les huiles (jusqu'à 65,01%). Les autres composants principaux étaient le p-cymène (9 %) et l'ylterpinène (4,25 %). Les tests DPPH et FRAP ont montré que les feuilles d'*O. vulgare* ont une puissante activité antioxydante comparable à celle du Trolox. L'huile essentielle a été criblée pour son effet inhibiteur de l' α -amylase, a montré une forte capacité à inhiber la dégradation de l'amidon par le pancréas et l' α -amylase salivaire. Ces résultats montrent que l'huile essentielle d'*O. glandulosum* pourrait être considérée comme un antioxydant naturel et un agent antidiabétique et pourrait être utile dans les industries pharmaceutiques et alimentaires. Il y a un grand intérêt pour les sources naturelles d'antioxydants pour prévenir l'oxydation des aliments et de minimiser les dommages oxydatifs aux cellules vivantes. *O. glandulosum* offrir une approche thérapeutique au traitement de l'hyperglycémie en diminuant la libération de glucose à partir de l'amidon et pourrait avoir un potentiel d'utilisation dans le traitement du diabète sucré et de l'obésité [15]. L'analyse de l'huile

2. Activités antibactériennes

Les huiles essentielles *O. vulgare* subsp. *glandulosum* tunisien ont également été évaluées pour leur action antimicrobienne. Les résultats obtenus à partir de la méthode de diffusion sur disque de gélose ont indiqué que les huiles utilisées présentaient une activité antimicrobienne plus forte sur les germes par rapport à l'antibiotique témoin. L'examen de l'activité antimicrobienne par la



méthode de diffusion sur disque de gélose, a révélé que l'huile d'*O. glandulosum* est antibactérienne.

L'étude de l'activité par la méthode de diffusion sur disque de gélose et la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) contre deux souches, une bactérie à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et une bactérie à Gram négatif (*Escherichia coli*). Les souches microbiennes employées ont montré un degré important de sensibilité aux huiles essentielles.

En Tunisie, *O. vulgare* subsp. *glandulosum* a montré un rendement élevé d'huiles riches en carvacrol, thymol, p-cymène, ... et un haut pouvoir d'activité antibactérienne contre les bactéries Gram (-) et Gram (+). La phase volatile de l'origan a révélé une activité antibactérienne sur *E. coli* et *S. aureus*. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des phases volatiles pour *E. coli* et *S. aureus* ont été enregistrés chez l'origan des sites du Nord.

Chez *O. vulgare* subsp. *glandulosum*, les huiles essentielles testées représentent une source de substances antibactériennes naturelles à utiliser dans les systèmes pathogènes pour empêcher la croissance des bactéries.

3. Activités antifongiques

L'évaluer du pouvoir antifongique des échantillons des huiles essentielles d'Origan obtenu par distillation contre les champignons suivants : *Fusarium* de blé (*Fusarium graminearum*) et *Botrytis cinerea* par les méthodes de diffusion de disque et par dilution en agar. L'observation visuelle de la croissance fongique (CF) de *Fusarium* après 7 jours d'incubation à $25 \pm 1,5^\circ\text{C}$. dans le blanc, l'HE et les dilutions montre que le pouvoir antifongique est directement lié à leurs compositions chimiques terpeniques. Les huiles essentielles des différents sites d'origan possèdent des propriétés antifongiques contre les champignons utilisés. Cette activité antifongique est fortement liée à la nature de l'huile essentielle utilisée, sa composition chimique et sa concentration. De grandes différences existent également entre les champignons, notamment en ce qui concerne leur sensibilité à l'effet antifongique des différentes huiles essentielles d'origan.

En présence d'huile essentielle une inhibition de la croissance des deux champignons a été observée pour toutes les concentrations testées. L'huile essentielle d'origan a exercé une remarquable activité inhibitrice sur les agents pathogènes. *Botrytis cinerea* a été le plus



sensible, il a été inhibé à partir d'une concentration de 126 $\mu\text{l/l}$. La concentration de 150 $\mu\text{l/l}$ a été suffisante pour provoquer une inhibition totale de la croissance de *Fusarium graminearum* et de *B. cinerea*. Le présent travail confirme l'activité antifongique de l'huile essentielle

L'HE d'Origan étudiée dans notre étude a montré une forte activité antifongique sur les souches testées avec une CMI allant de 0,125 % v/v (sur *Botrytis cinerea*) à 0,5% v/v (sur *Fusarium graminearum*). Nos résultats sont conformes à ceux rapportés par d'autres travaux sur les propriétés inhibitrices antimicrobiennes de l'origan. A.R. Khosravi et al. [74] ont pu obtenir une inhibition de la pousse de 16 isolats de *C. glabrata* avec un DI de 18 à 40mm et une CMI allant de 0,5 à 1100 mg/ml. P. Pozzatti et al. [69] ont mis en évidence l'effet inhibiteur des HE de l'Origan vis-à-vis de *C. albicans* et de *C. dubliniensis*, Les CMI étaient de 0,05 mg/ml et 0,2 mg/ml. L'équipe de Maarif et al. [75] quant à elle, a rapporté l'activité antifongique de l'HE de l'Origan sur *C. albicans*, *A. niger*, *T. rubrum* et *M. canis* avec des CMI de 2.5, 1.25, 0.312 et 0.156 % (v/v) respectivement. Dans les travaux de Bonjar et al. [61], *S. aureus*, *S. epidermidis* et *B. cereus* se sont révélés tous sensibles à l'HE *Origanum majorana* iranienne avec un DI allant de 7 à 14mm

4. Activités insecticides

Les huiles essentielles extraites par hydrodistillation de la plante aromatique *Origanum glandulosum* de différentes localités, ont été testées à différentes doses sur les adultes de *Tribolium castaneum* ou tribolium rouge de la farine, à une température de 25 °C et une humidité relative de 70 %. La DL50 calculée après 5h d'exposition, montrent que les huiles essentielles testées sont très toxiques sur *Tribolium* (Fig. 7).

Les résultats des tests de toxicité montrent que les échantillons d'huile d'origan ont une activité insecticide importante. En effet, la mortalité des insectes variable avec les concentrations des huiles utilisées. La toxicité des huiles essentielles sont importantes pour toutes les concentrations utilisées. Le taux de mortalité augmente avec la dose utilisée, à une dose de 0.5 μl le taux de mortalité enregistré est de 100% (pour une heure). Ces résultats suggèrent que l'huile d'origan (*Origanum glandulosum* (Desf.)) a des propriétés insecticides importantes et peut être utile comme protecteur naturel contre *Tribolium castaneum* ou tribolium rouge de la farine pour remplacer les insecticides synthétiques.



L'analyse de la composition chimique montre la richesse des huiles essentielles en composés connus pour leurs propriétés insecticides comme l' α -pinène, le limonène, le carvacrol, et le thymol, ce qui explique les résultats obtenus. Khalfi et al. (2008) ont extrait l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* par décapage à la vapeur d'eau pour étudier l'effet insecticide sur l'insecte ravageur *Rhizopertha dominica* céréale. Trois modes de pénétration étaient le contact, l'ingestion, le contact et l'inhalation. L'huile d'origan présente une activité insecticide et induisent chez les femelles des trois coléoptères étudiés une réduction significative de la ponte par rapport à celui dans le contrôle.

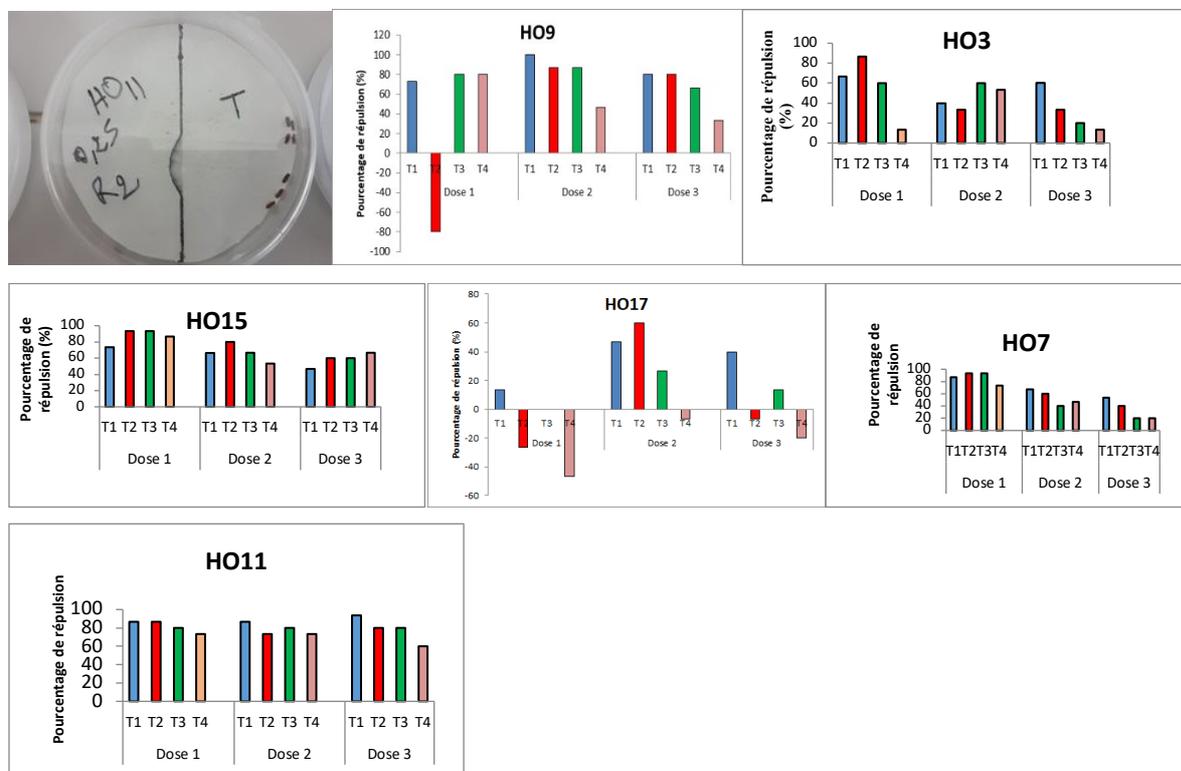


Figure 7 : Test bioinsecticide des huiles de différentes localités d'Origanum

Conclusions

Origanum glandulosum est une solution rentable source d'ingrédients aux activités biologiques différentes, qui peut être exploité dans des préparations alimentaires et pharmaceutiques.

D'après notre étude nous avons abouti aux conclusions suivantes :



- Le rendement d'extraction en huile essentielle de la partie aérienne d'*O. glandulosum* par hydrodistillation atteint un maximum de l'ordre de 4.8 % à un temps optimal
- L'analyse des HE par GC-MS montre une richesse en carvacrole (41.68%) et thymol
- Une grande activité antioxydante par piégeage du radical DPPH• de l'huile essentielle brute d'origan. Les huiles essentielles ont montré des activités antioxydantes élevées. Ces résultats indiquent que les huiles essentielles d'origan pourraient être utilisées comme ressource potentielle d'antioxydants naturels pour l'industrie alimentaire
- L'étude de l'activité antibactérienne de l'HE de l'origan contre 2 souches de bactéries révèle que il est classée comme agent antibactérien sensible.. Cette activité est attribuée au constituant majoritaire : terpinène-4-ol.
- L'activité antifongique de contre *Botrytis cinerea* et *Fusarium graminearum*, montre que : Les différents échantillons d'huile inhibent la croissance fongique de *Botrytis cinerea* et *Fusarium graminearum* grâce à leurs compositions chimiques.
- L'activité bioinsecticide contre *Tribolium castaneum* montre que l'huile d'origan (*Origanum glandulosum* (Desf.)) a des propriétés insecticides importantes et peut être utile comme protecteur naturel contre *Tribolium castaneum* ou tribolium rouge de la farine pour remplacer les insecticides synthétiques.



B. Activités biologiques de *Rosa sp.*

I. Evaluation de l'Activité antioxydante chez le genre *Rosa*

1. Introduction

Le stress oxydant est l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées actives (EOA). Il s'agit de radicaux libres qui sont des entités chimiques très instables et réactionnelles par la présence d'un électron libre dans leur structure. Ces radicaux sont toxiques et produisent des dégâts cellulaires importants à travers le déclenchement de cassures et de mutation au sein de l'ADN, l'inactivation de diverses enzymes, la modification des structures protéiques, l'oxydation des sucres et l'induction de peroxydation lipidique. Le stress oxydant est ainsi induit suite à un déséquilibre lié soit à une production accrue d'EOA soit à une diminution de la capacité de défense antioxydante.

Les antioxydants constituent un vaste monde de molécules qui peuvent être synthétisées par l'organisme ou apportées par l'alimentation. On distingue :

- Des antioxydants enzymatiques assurant la réparation des dommages oxydatifs au niveau des protéines ou de l'ADN et ayant comme cofacteurs les oligo-éléments (sélénium, cuivre et zinc).
- Des antioxydants non enzymatiques comme les vitamines C et E, les caroténoïdes, les polyphénols....

De nombreux composés phytochimiques sont considérés comme des composants alimentaires protecteurs en raison de leur potentiel défensif contre les EOAs nuisibles dans le corps humain. Ces dernières années, de nombreuses méthodes d'analyse ont été développées pour déterminer l'activité antioxydante dans les aliments et les systèmes biologiques. Ces



méthodologies peuvent être divisées, selon l'objectif souhaité, en des essais visant à évaluer le degré de stress oxydatif d'un composé biologique comme les lipides, les protéines ou l'ADN, et en des essais par lesquels la capacité d'une substance à piéger les radicaux libres est mesurée.

Les antioxydants peuvent désactiver les radicaux par deux mécanismes majeurs, transfert d'atomes d'hydrogène (TAH) et transfert d'électrons simple (SET). Le dosage *in vitro* de capacité des substances à piéger les radicaux libres peut être assuré grâce à un certain nombre de test parmi lesquels on peut citer :

- La méthode de DPPH. Ce procédé est basé sur l'activité de piégeage radicalaire des antioxydants vers le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH•). Le radical libre DPPH• est réduit à l'hydrazine correspondante lorsqu'il réagit avec les donneurs d'hydrogène.
- La méthode d'ABTS ou TEAC, (*Trolox equivalent antioxidant capacity*) : Capacité de réduction du radical-cation ABTS^{+•} (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). Le test TEAC est basé sur la capacité des antioxydants à inhiber l'anion radicalaire de l'ABTS^{+•}

Bien que les essais TEAC et DPPH soient habituellement classés en tant que réactions SET, ces deux radicaux peuvent en fait être neutralisés soit par réduction directe via des transferts d'électrons, soit par piégeage radicalaire par transfert d'atomes d'hydrogène.

- La méthode de FRAP ou « Ferric Reducing Antioxidant Power Assay » : Cet essai est initialement appliqué au plasma mais il est utilisé aussi pour évaluer l'activité antioxydante de différents extraits végétaux. Le test est basé sur la capacité des antioxydants à réduire un analogue de ferroïne, le complexe Fe³⁺ du tripyridyltriazine Fe(TPTZ)³⁺, au complexe Fe (TPTZ)²⁺. La réaction d'analyse se produit par transfert d'électrons.
- La méthode d'ORAC ou capacité d'absorption des radicaux oxygénés : Ce test mesure l'inhibition des oxydations induites par le radical peroxyde et reflète ainsi l'activité antioxydante classique de rupture de chaîne radicalaire par transfert d'atomes H. Dans l'essai de base, le radical peroxyde réagit avec une sonde fluorescente pour former un produit non fluorescent, qui peut être quantifié facilement par fluorescence. La capacité antioxydante est déterminée par une diminution du taux et de la quantité de produit formé au cours du temps.



2. Méthodologie

Dans cette étude, quatre tests d'évaluation du pouvoir antioxydant ont été appliqués dont: trois agissant par transfert d'électron (DPPH, TEAC et FRAP) et un test évaluant l'action antioxydante par transfert d'atome d'hydrogène (ORAC).

2.1. Test DPPH

Ce test consiste à étudier l'activité antiradicalaire des différents extraits en utilisant le 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) comme radical libre relativement stable. Des différentes dilutions de l'extrait à tester et du standard employé (TROLOX) doivent être préalablement préparées. La solution mère de DPPH est d'une concentration de 100 mM. Un volume de 75µl de chaque dilution est ajouté à 3ml de la solution de DPPH puis incubé après agitation, à l'obscurité pendant 20 min. La lecture de l'absorbance est effectuée contre le méthanol à 517 nm. Les tests sont répétés trois fois et les résultats sont estimés à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec le standard (0–1.5 mM) et exprimés ainsi en mmol d'équivalent de TROLOX par gramme d'extrait (mmol TE g⁻¹ d'extrait).

2. 2. Test TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

La capacité des extraits à piéger l'ABTS^o + peut être évaluée par l'utilisation du test TEAC. En bref, une solution d'ABTS 1,7 mM est mélangée au persulfate de potassium (K₂S₂O₈) dissous dans de l'eau déminéralisée (4,3 mM), puis incubée à l'obscurité à une température ambiante pendant 12 à 16 heures. Ce mélange est dilué jusqu'à donner une absorbance de 0,7 (± 0,02). Par conséquent, une série de solution d'extrait de la plante et du standard (TROLOX) à différentes concentrations est préparée en dissolvant les échantillons dans les solvants convenables (méthanol ou DMSO). Cent µl de chaque dilution sont ajoutés à 2 ml de la solution préparée ABTS^{o+} et incubé par la suite à l'obscurité pendant 6 min. L'absorbance se mesure à 734 nm et les résultats sont déterminés à partir de la courbe d'étalonnage et ils sont exprimés en mmol d'équivalents de Trolox / g d'extrait. Toutes les expériences doivent s'effectuer en deux répétitions et au moins en deux occasions distinctes.

2. 3. Pouvoir réducteur du fer par test de FRAP

La capacité de réduction du fer dans les extraits végétaux se détermine en utilisant la méthode FRAP. Le réactif FRAP doit être préparé et maintenu dans un bain-marie à 37 °C durant la manipulation. Il contient une solution chlorhydrique de TPTZ (2,4,6-tris [2-piridyle]-



S-triazine) (10 mM), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM) et du tampon d'acétate d'éthyle (300 mM, à pH 3,6) (1: 1: 10, v / v / v). Une série de solution des extraits végétaux à différentes concentrations est préparée. Cinquante μl de chaque échantillon sont ajoutés à 1 ml de réactif de FRAP et incubé à 20 ° C pendant 4 min. Le standard utilisé est le $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ avec une gamme de concentration allant de 0 à 1 mM. L'absorbance se mesure à 593 nm et les résultats sont estimés à partir de la courbe d'étalonnage du standard et exprimés en mmol d'équivalents Fe^{2+} par g d'extrait (mmol Eq Fe^{2+} g⁻¹ extrait).

2. 4. Test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Le dosage de la capacité anti-oxydante par le test ORAC est une analyse spectrofluorimétrique permettant la mesure de la capacité des échantillons à piéger les radicaux libres et à empêcher la dégradation de la fluorescéine par oxydation en présence de l'APPH [2,2'-azobis (2-amidinopropane) dichlorhydrate]. Le protocole de ce test est détaillé ainsi : 1200 μl de fluorescéine (117 nm) sont mélangés avec 200 μl de chacune des dilutions de l'extrait ou de Trolox ou du tampon phosphate (75 mM, pH 7,4) en tant que blanc. Les solutions sont incubées à 37°C pendant 15 min. L'AAPH fraîchement préparée (600 μl , 40 mM) est ajoutée au mélange et la fluorescence de dégradation est enregistrée toutes les 30 s pendant 90 min en utilisant un spectrofluorophotomètre sous les conditions d'excitation et d'émission à 485 nm et à 520 nm respectivement. Les expériences doivent être effectuées en triplicata. Les courbes décroissantes sont tracées donnant l'intensité de la fluorescence en fonction du temps et l'aire de la région (AUC) entre les deux courbes de distribution (en présence ou non de l'antioxydant) est calculée. Le potentiel antioxydant est quantifié à partir de la courbe d'étalonnage de l'analogue de la vitamine E ou TROLOX pour une gamme de concentrations allant de 0 à 75 μM . Les résultats sont exprimés en mmol d'équivalents Trolox par gramme d'extrait sec (mmol TE g⁻¹d'Extrait).

3. Résultats

I. Activité Anti-oxydante évaluée chez le genre Rosa

Le pouvoir anti-oxydant est déterminé pour les extraits organiques des feuilles et des tiges des trois rosiers (*Rosa canina* RC, *Rosa moschata* RM et *Rosa sempervirens* RS) et des cynorrhodons de RC et RS. Cette activité a été évaluée aussi chez les extraits aqueux des fleurs de *R. moschata*.



1. Pouvoir antioxydant des extraits de *Rosa canina*

1.1. Organes végétatifs

L'évaluation du pouvoir antioxydant chez *Rosa canina* a montré une activité importante variant entre 0,47 et 2,76 mmol équivalent Trolox /g d'extrait sec (mmol ET/g ES) si le potentiel est mesuré par test DPPH et entre 0,94 et 2,77 mmol ET/g ES et 0,91 et 4,34 mmol Fe²⁺ équivalents /g ES pour les tests TEAC et FRAP, respectivement. Les tiges montrent une activité légèrement plus importante comparée à celle des feuilles et les extraits méthanoliques sont les plus actifs. Pour l'évaluation du potentiel antioxydant par transfert d'atome d'hydrogène (test ORAC), l'activité des organes végétatifs est aussi importante et elle varie entre 7,75 et 17,06 mmol ET/g ES. Les extraits du solvant moyennement polaire (acétate d'éthyle) sont plus actifs et les tiges présentent une activité plus importante comparée à celle des feuilles (Tableau 4)

Tableau 4: Activité antioxydante des extraits organiques des feuilles et des tiges de *Rosa canina*.

Test antioxydant ^{1,2}	Feuilles		Tiges	
	Extrait	Extrait	Extrait	Extrait
	EtOAc	MeOH	EtOAc	MeOH
DPPH	0,49 ±	2,42 ± 0,17	0,47 ± 0,09	2,76 ±
	0,07			0,18
TEAC	0,94 ±	2,59 ± 0,22	1,00 ± 0,05	2,77 ±
	0,05			0,13
FRAP	0,91 ±	4,08 ± 0,3	1,25 ± 0,12	4,34 ±
	0,09			0,26
ORAC	7,75 ±	5,58 ± 0,19	17,06 ± 0,53	9,92 ±
	0,17			0,58

¹ Les résultats DPPH, TEAC et ORAC sont exprimés en mmol équivalent Trolox /g d'extrait sec.

² Les résultats FRAP sont exprimés en mmol d'équivalents Fe²⁺ /g d'extrait sec.

1.2. Cynorrhodons

L'évaluation du pouvoir antioxydant des cynorrhodons de *Rosa canina* montre une activité plus importante exercée par l'extrait méthanolique des akènes comparés aux péricarpes et aux autres extraits obtenus par le solvant moyennement polaire, le chloroforme (Fig. 7).

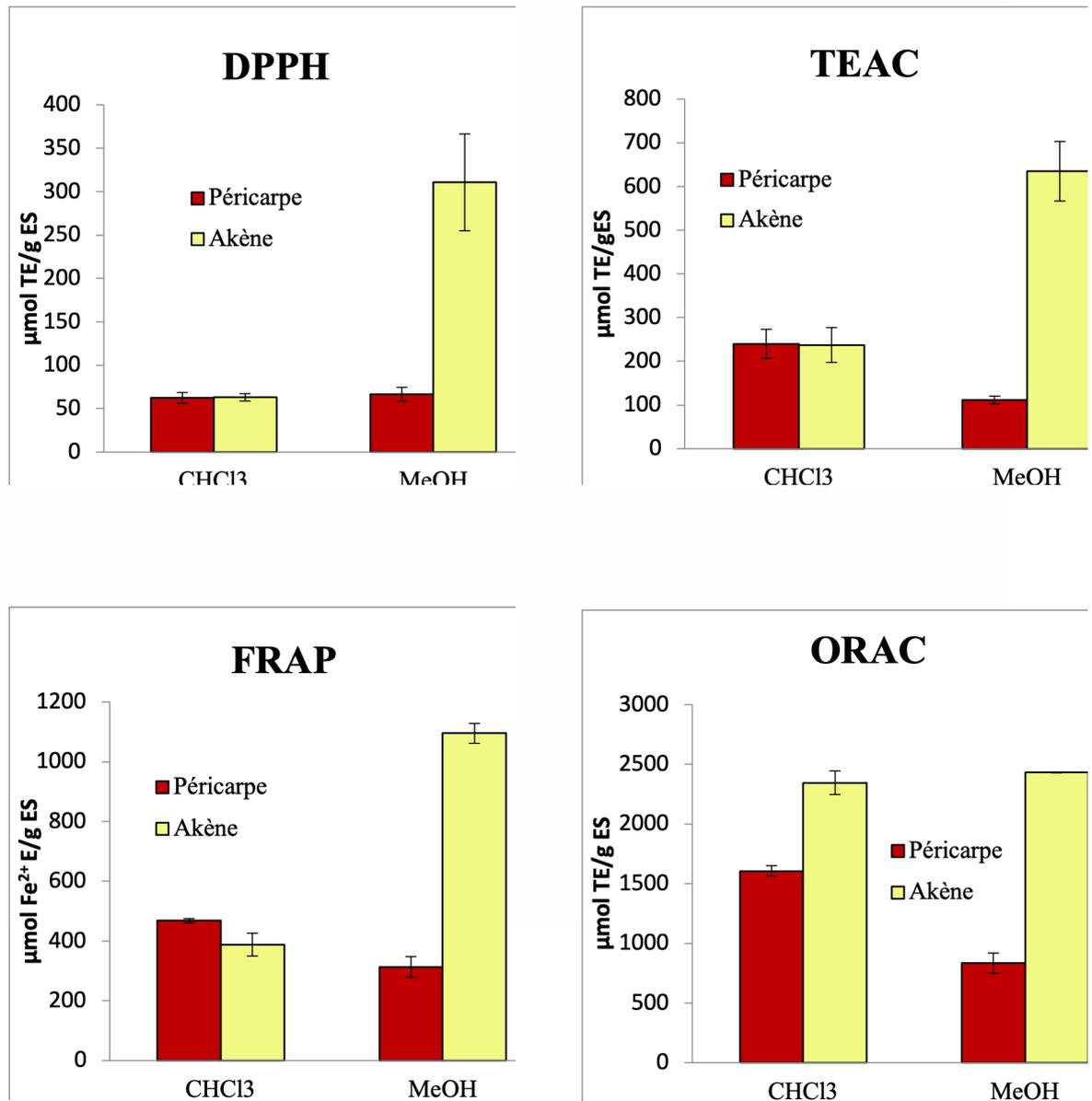


Figure 7 : Activité antioxydante des extraits organiques des péricarpes et akènes de *Rosa canina*.

2. Pouvoir antioxydant des extraits de *Rosa sempervirens*

2.1. Organes végétatifs

Rosa sempervirens a prouvé une activité antioxydante très importante que ce soit avec les feuilles ou les tiges. Les potentiels anti-radicalaires des organes végétatifs de *R. sempervirens* mesurés par les tests DPPH, TEAC et ORAC sont compris entre 0,95 et 2,33, 1,63 et 2,56 et



4,03 et 6,09 mmol ET/g ES, respectivement. Pour le test FRAP, les valeurs varient entre 2,1 et 3,67 mmol Fe²⁺ équivalents /g ES. L'activité exercée par les extraits méthanoliques est plus importantes quel que soit l'organe et les feuilles renferment les molécules les plus actives comparées aux tiges (Tableau 5).

Tableau 5: Activité antioxydante des extraits organiques des feuilles et des tiges de *Rosa sempervirens*.

Test antioxydant ^{1,2}	Feuilles		Tiges	
	Extrait		Extrait	
	EtOAc	MeOH	EtOAc	MeOH
DPPH	1,44 ± 0,37	2,31 ± 0,15	0,95 ± 0,23	2,33 ± 0,11
TEAC	1,69 ± 0,12	2,56 ± 0,22	1,63 ± 0,07	2,11 ± 0,13
FRAP	2,86 ± 0,01	3,67 ± 0,08	2,1 ± 0,11	2,81 ± 0,1
ORAC	5,73 ± 0,22	6,09 ± 1,36	4,03 ± 0,16	5,64 ± 1,36

¹ Les résultats DPPH, TEAC et ORAC sont exprimés en *mmol équivalent Trolox /g d'extrait sec*.

² Les résultats FRAP sont exprimés en *mmol d'équivalents Fe²⁺ /g d'extrait sec*.

2.2. Cynorrhodons

Les cynorrhodons de *Rosa sempervirens* possède une activité antioxydante très importante. L'étude a montré des résultats différents entre akènes et péricarpe et en fonction du type de l'extrait. Les extraits méthanoliques des akènes possèdent un pouvoir antioxydant plus important comparé à ceux chloroformique du même organe et aux différents extraits des péricarpes (Fig. 7).

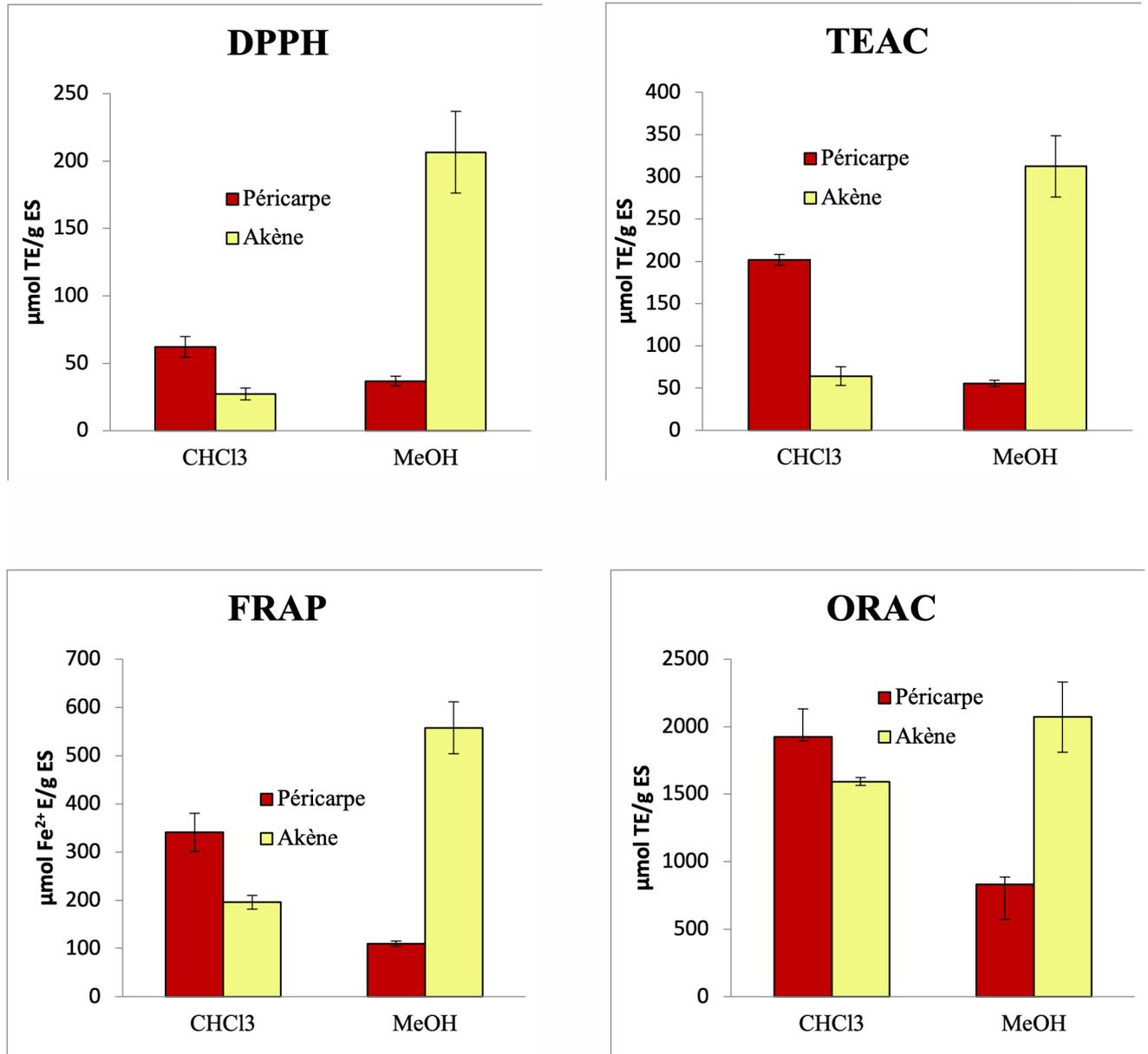


Figure 7 : Activité antioxydante des extraits organiques des péricarpes et akènes de *Rosa sempervirens*.



3. Pouvoir antioxydant des extraits de *Rosa moschata*

3.1. Organes végétatifs

Les feuilles et les tiges de *Rosa moschata* possèdent des activités antioxydantes très importantes et ne pr sentrant pas de différences significatives. Les extraits méthanoliques sont plus actifs quel que soit l'organe et les résultats varient entre 0,24 et 2,45 mmol ET/g ES pour le test DPPH, entre 0,43 et 3,08 mmol ET/g ES pour le test TEAC, 0,73 et 4,89 mmol Fe²⁺ équivalents /g ES pour le test FRAP et enfin entre 4,62 et 7,52 mmol ET/g ES pour l'indice d'ORAC (**Tableau 6**).

Tableau 6: Activité antioxydante des extraits organiques des feuilles et des tiges de *Rosa moschata*.

Test antioxydant ^{1,2}	Feuilles		Tiges	
	Extrait		Extrait	
	EtOAc	MeOH	EtOAc	MeOH
DPPH	0,28 ± 0,03	2,45 ± 0,20	0,24 ± 0,03	2,35 ± 0,26
TEAC	0,50 ± 0,01	3,03 ± 0,15	0,43 ± 0,02	3,08 ± 0,17
FRAP	0,99 ± 0,02	4,04 ± 0,22	0,73 ± 0,02	4,89 ± 0,21
ORAC	6,49 ± 0,21	6,8 ± 0,98	4,62 ± 0,08	7,52 ± 0,98

¹ Les résultats DPPH, TEAC et ORAC sont exprimés en mmol équivalent Trolox /g d'extrait sec.

² Les résultats FRAP sont exprimés en mmol d'équivalents Fe²⁺ /g d'extrait sec.

3.2. Fleurs

L'extrait aqueux des fleurs de *Rosa moschata* présente une activité antioxydante rangeant entre 1400 et 3000 µmol TE/g ES prouvée par les tests DPPH, TEAC et ORAC ainsi qu'un pouvoir dépassant les 2000 µmol Fe²⁺ E/g ES déterminé par le test FRAP (**Figure 8**).

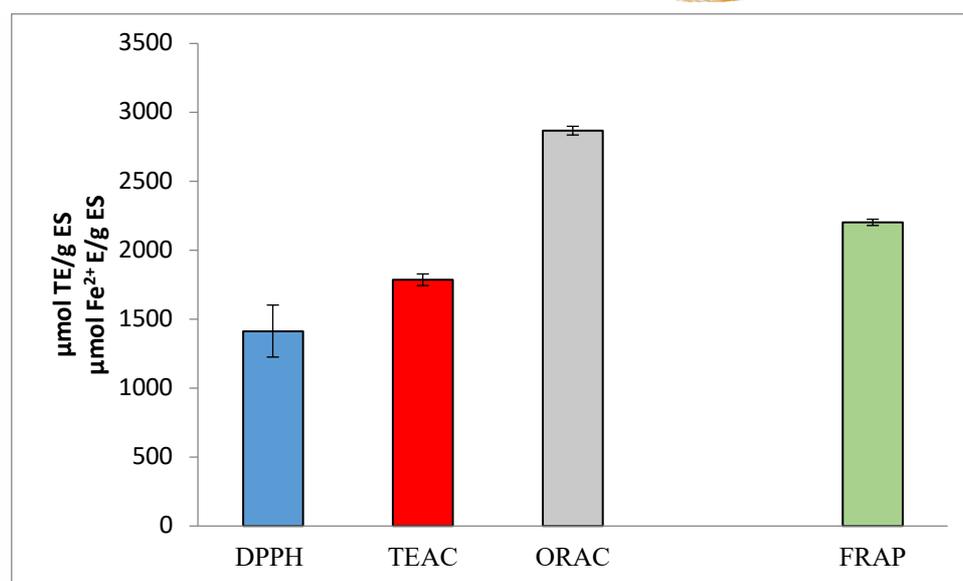


Figure 8 : Activité antioxydante des extraits aqueux des fleurs de *Rosa moschata*.

Les résultats DPPH, TEAC et ORAC sont exprimés en *mmol équivalent Trolox /g d'extrait sec* et ceux de FRAP sont exprimés en *mmol d'équivalents Fe²⁺ /g d'extrait sec*.

4. Discussion

Nowak et Gawlik-Dziki (2007) ont déjà signalé que les espèces de *Rosa* présentaient un pouvoir élevé de piégeage des radicaux libres grâce aux extraits méthanoliques de leurs feuilles.

Nos résultats sont en corrélation positive avec des études antérieures décrivant l'effet significatif des extraits méthanoliques des feuilles de *R. canina* et *R. sempervirens* sur le piégeage des radicaux DPPH et ABTS (Ghazghazi et al., 2010; Ghazghazi et al., 2012). Il a été démontré que ces capacités antioxydantes sont dépendantes de la provenance des plantes étudiées (Ghazghazi et al., 2010; 2012).

L'évaluation de la capacité anti-radicalaire par tests DPPH, TEAC et FRAP a montré que les extraits MeOH possèdent un pouvoir antioxydant plus fort que ceux de l'acétate d'éthyle que ce soit avec les feuilles ou les tiges des rosiers étudiés. Ces résultats sont en corrélation positive avec les rapports précédents indiquant que les activités antioxydantes peuvent être influencées par le système d'extraction et la polarité de solvant (Turkmènes et al., 2006; Handa et al., 2016). Turkmènes et ses Collaborateurs (2006) ont rapporté que des extraits de thé noir obtenus en utilisant des solvants de polarité élevée ont montré des capacités de piégeage des radicaux plus élevées que celles données par les extraits obtenus avec des solvants de faible polarité. Ceci



peut être dû à leur capacité à dissoudre un groupe défini de composés bioactifs ou des molécules antioxydantes qui affectent l'estimation de l'activité anti-oxydante (Zhou et Yu, 2004).

Les résultats de la méthode ORAC sont différents comparés aux valeurs obtenues par les autres tests antioxydants. Ceci peut être attribuée à sa propriété d'assurer la détection de la chaîne hydrophile et lipophile brisant la capacité antioxydante en présence de radicaux peroxy. Ces différences entre résultats étaient également en raison de l'implication de deux mécanismes d'action antioxydants différents ; piégeage des radicaux libres par transfert d'atome d'hydrogène (TAH) ou par transfert monoélectronique (SET, Single Electron Transfer). Ainsi, il est difficile de comparer entre les méthodes qui utilisent des principes différents pour déterminer la capacité antioxydante (Dai et Mumper, 2010; Prior, 2015). L'examen des résultats indique une bonne corrélation avec des études antérieures qui ont rapporté que les espèces de *Rosa* présentaient un pouvoir antioxydant important et pourraient être considérés comme une source potentielle d'antioxydants naturels et des aliments fonctionnels (Ghazghazi et *al.*, 2010; Ghazghazi et *al.*, 2012, Nadpal et *al.*, 2016).

Les activités antioxydantes peuvent être estimées en fonction de la richesse des plantes en composés bioactifs. Par conséquent, l'accumulation de métabolites secondaires dans les plantes dépend de plusieurs facteurs tels que le cycle phénologique, morphogénétique, génétique, environnement, etc. Ces composés constituent un groupe diversifié de molécules dérivées de métabolites primaires et impliqués en tant que mécanisme de défense dans l'adaptation des plantes à leur environnement (Verma et Shukla, 2015).

La présence de molécules bioactives antioxydantes est affectée par les parties et les tissus végétaux (Macheix et *al.*, 2005; Deng et *al.* 2015).



5. Evaluation de l'Activité antibactérienne chez le genre Rosa

Dans cette partie, nous avons étudié l'activité antibactérienne des extraits des feuilles de *Rosa sempervirens* avec des solvant organiques de différentes polarités (éthanol 100%, éthanol 80%, acétone 100%, acétone 80% , n-hexane) en utilisant la méthode de diffusion sur disque, qui est une technique qualitative basée sur la mesure de diamètre de la zone d'inhibition, en millimètre (mm), qui apparait autour du disque imprégné d'extrait de plante (Fig. 9).

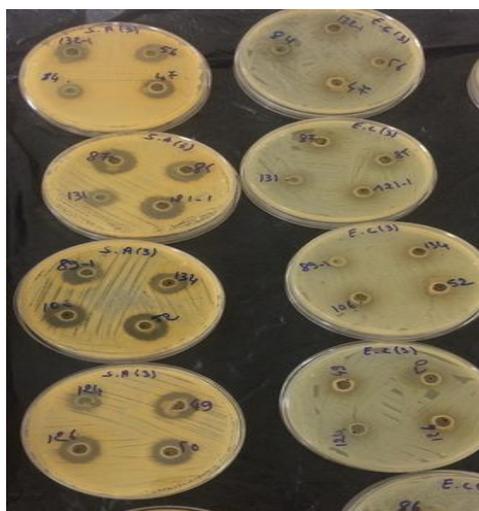


Figure 9 : Effet de l'extrait de *Rosa sempervirens* sur les bactéries testées

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien des extraits des feuilles de *Rosa sempervirens* de chaque solvant organique vis-à-vis de deux germes pathogènes dont une bactérie à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et une bactérie à Gram négatif (*Escherichia coli*), un extrait est considéré comme actif lorsqu'il induit une zone d'inhibition. Les résultats des diamètres d'inhibition sont illustrés dans les tableaux ci-dessous (Tableau 7).

D'après les résultats de ces tableaux, pour (Acétone 80%) la zone d'inhibition est nulle. la même chose pour (éthanol 80%) et (éthanol 100%) qu'on trouve des résultats presque nulles. ce qui signifie que ses extraits n'agissent pas sur la multiplication de *Escherichia coli*. L'échantillon d'OD ne montre pas une activité contre *Escherichia coli* pour (η -hexane), (Acétone 100%) et (Acétone 80%) mais la bactérie se trouve peu sensible pour l'extrait éthanolique 100%. Cependant, la zone d'inhibition observée pour les extraits éthanoliques s'explique par la présence d'éthanol qui a un effet sur la croissance de cette bactérie.



Escherichia coli était peu sensible aux extraits η -hexane et Acétone 100%.

Tableau 7: Diamètres des zones d'inhibition pour *Escherichia coli* par la méthode de disque pour les extraits de cinq solvants

Accessions	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)				
	n-hexane	acétone 100%,	éthanol 100%	acétone 80%	éthanol 80%
Tb1	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
Tb2	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
OM1	8 (+)	13 (+)	12 (-)	0 (-)	0 (-)
OM2	8 (+)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
OUE1	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
OUE2	0 (-)	12 (+)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
RAS1	0 (-)	13 (+)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
Tab2	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
Tab4	0 (-)	12 (+)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
OS1	0 (-)	14 (+)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
OS2	10 (+)	14 (+)	12 (-)	0 (-)	0 (-)
OS3	0 (-)	10 (+)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
OD	0 (-)	0 (-)	19 (+)	0 (-)	14 (-)
RJ1	10 (+)	11 (+)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
RJ2	0 (-)	12 (+)	13 (-)	0 (-)	0 (-)
SM	0 (-)	11 (+)	0 (-)	0 (-)	0 (-)

NB : zone d'inhibition pour l'éthanol =10mm, zone d'inhibition pour le DMSO=0mm,

Non sensible (-), Sensible (+)

Pour les trois extraits (η -hexane), (Acétone 100%) et (éthanol 100%) on observe une très faible activité contre *Escherichia coli*. ce que signifie que la plante n'a pas d'activité antibactérienne pour cette bactérie à Gram négatif.



Tableau 8 : Diamètres des zones d'inhibition pour *Staphylococcus aureus* par la méthode de disques pour les extraits de cinq solvants

Accessions	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)				
	n-hexane	acétone 100%	éthanol 100%	acétone 80%	éthanol 80%
Tb1	0 (-)	11 (+)	13 (-)	0 (-)	18 (+)
Tb2	0 (-)	18 (++)	20 (+)	20 (++++*)	27 (++)
OM1	0 (-)	17 (++)	18 (+)	26 (+++)	17 (-)
OM2	8 (+)	16 (++)	21 (+)	0 (-)	21 (+)
OUE1	8 (+)	16 (++)	16 (-)	15 (++)*	17 (-)
OUE2	0 (-)	16 (++)	21 (+)	25 (++++*)	23 (+)
RAS1	0 (-)	14 (+)	22 (+)	10 (+*)	21 (+)
Tab2	0 (-)	15 (++)	17 (-)	23 (+++)	20 (+)
Tab4	0 (-)	14 (+)	17 (-)	0 (-)	20 (+)
OS1	0 (-)	18 (++)	16 (-)	20 (++++*)	15 (-)
OS2	0 (-)	16 (++)	18 (+)	18 (++)	18 (+)
OS3	0 (-)	0 (-)	15 (-)	14 (+*)	10 (-)
OD	0 (-)	17 (++)	17 (-)	19 (++)	21 (+)
RJ1	18 (+++)	17 (++)	19 (+)	14 (+*)	20 (+)
RJ2	0 (-)	15 (++)	17 (-)	20 (+++)	11 (-)
SM	0 (-)	11 (+)	17 (-)	16 (++)	15 (-)

NB : zone d'inhibition pour l'éthanol =10mm, zone d'inhibition pour le DMSO=0mm,

* : quelques colonies qui poussent dans la zone d'inhibition

Non sensible (-), Sensible (+), Très sensible (++) , Extrêmement sensible (+++)

D'après les résultats de ce tableau (26), les extraits des feuilles du *Rosa Sempervirens* avec des solvants organiques de différentes polarités (éthanol 100%, éthanol 80%, acétone 100%, acétone 80%, η -hexane), ont montré un seuil d'efficacité variable pour la bactérie à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) testée en générant un important diamètre d'inhibition.

Les extraits des feuilles avec l'acétone 100% ont montré une meilleure activité inhibitrice de *S. aureus* principalement les échantillons de OS1, RJ2, OUE2, Tb2, OM1, Tab2. Par contre pour l'extrait des feuilles de OS3, la bactérie reste insensible pour l'acétone 100%, alors qu'elle est sensible pour acétone 80% avec quelques colonies qui poussent dans la zone d'inhibition.



Staphylococcus aureus était peu sensible aux extraits de(η -hexane) dont la majorité d'échantillons n'a aucun effet inhibiteur contre cette bactérie sauf pour l'extrait des feuilles de l'accessions de RAS1 et RJ1 qui présentent une activité remarquable que ce soit avec du (η -hexane) et ou encore avec l'acétone 100%.

D'après les résultats obtenus, il apparaît que l'extrait des feuilles de l'échantillon de l'accession de RJ1 présente une activité antibactérienne puisque la bactérie présente une sensibilité vis-à-vis ces extraits de différentes polarités.

Pour la majorité d'échantillons, s'est avérée que *Staphylococcus aureus* était sensible aux extraits Acétone 80% avec un diamètre d'inhibition important.

Pour les trois extraits (Acétone 100%), (Acétone 80%), (éthanol 80%) on observe une importante activité contre *Staphylococcus aureus*. Ce qui pourrait être expliqué par une activité antibactérienne de ces extraits des feuilles contre les bactéries à Gram positif.

Par conséquent, le test de diffusion par disque a montré que les différents extraits organiques ne présentent pas une véritable activité antibactérienne contre la bactérie à Gram négatif (*Escherichia coli*), par contre, la sensibilité de bactérie à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) est importante. Ces résultats sont confirmés par l'étude de (Haouchine & Khennache, 2017) et qu'elles ont avérées que l'extrait de *Rosa sempervirens* présente une activité importante contre les bactéries à Gram positif avec une zone d'inhibition qui peut atteindre 25.67 mm comme *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*. Cependant, le test de diffusion sur milieu gélosé a montré que tous les extraits n'ont aucun effet sur les bactéries Gram (-) testées à savoir *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. Dans d'autre étude, les souches bactériennes à Gram positif ont montré une bonne sensibilité essentiellement *Staphylococcus aureus* aux huiles essentiels de *Artemisia absinthium L* (Leila Riahi et al, . 2015).

La différence de sensibilité observée entre les souches testées peut être due à la différence pariétale des deux types de bactéries. En effet, les bactéries à Gram positif possèdent une paroi exclusivement de peptidoglycane épais semblent être plus favorables à la pénétration des phytomolécules qui atteindraient facilement leurs cibles intracellulaires. Par contre, les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane externe composée de phospholipides qui interféreraient avec les molécules, rend leur passage à travers la paroi difficile surtout les composés hydrosolubles (Wan et al., 1998 ; Tian et al., 2009 ; Soundararajan et al., 2012).



6. Conclusions

Les différentes espèces de *Rosa* sont largement répandues dans le monde. Elles sont utilisées dans de nombreux domaines (agroalimentaire, cosmétique, aromathérapie...), et ce pour leurs vertus et leur grande richesse en composés bioactifs qui leur donnent des propriétés biologiques importantes.

Nous avons étudié la composition phénolique de *Rosa*. Les résultats de notre travail ont révélé que l'analyse quantitative des extraits organiques des feuilles a mis en évidence la présence d'une quantité importante de polyphénols totaux et de flavonoïdes qui varient entre les sites.

Les composés phénoliques sont des substances de survie pour la plante. D'une part, ils sont nécessaires pour sa croissance et son développement naturel. D'autre part, ces métabolites secondaires présentent un mécanisme de défense contre les bactéries pathogènes (bactéries, champignons) et aussi contre les conditions climatiques défavorables.

Le pouvoir de piégeage du radical DPPH est défini par la IC_{50} qui varie selon le type d'extrait et aussi se différencie d'une région à une autre. Les sites qui ont un pouvoir anti-radicalaire important appartiennent aux sites du Nord Tunisien.

L'évaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur milieu gélosé a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien des extraits des feuilles de la *Rosa*, de chaque solvant organique vis-à-vis de deux germes pathogènes dont une bactérie à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et une bactérie à Gram négatif (*Escherichia coli*). Les résultats ont montré une activité contre la bactérie à Gram positif alors que contre la bactérie à Gram négatif (*E.coli*) aucune activité n'a été observée.