

## ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE ET ANTIMICROBIENNE DES EXTRAITS DE *L'AUBEPINE MONOGYNE*

W. Bouzid, M. Yahia<sup>1</sup>, M. Abdeddaim<sup>1</sup>, M.C. Aberkane<sup>2</sup> et A. Ayachi<sup>3</sup>

Laboratoire de biotechnologie des molécules bioactives et de la physiopathologie cellulaire,  
Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Batna, Algérie

<sup>1</sup> Laboratoire de toxicologie, Département d'agronomie, Faculté des sciences, Université de  
Batna, Algérie

<sup>2</sup> Laboratoire de chimie et de chimie de l'environnement, Faculté des sciences, Université de  
Batna, Algérie

<sup>3</sup> Laboratoire de microbiologie, Département de vétérinaire, Faculté des sciences, Université  
de Batna, Algérie  
bouzid\_w@hotmail.fr

(Received 13 April 2010 - Accepted 20 July 2010)

### RESUME

*Les extraits naturels de plantes contiennent une variété de composés phénoliques auxquels sont attribuées diverses activités biologiques. Dans la présente étude on a tenté d'évaluer l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits organiques et de l'extrait aqueux préparés à partir de la partie comestible de *Crataegus monogyna* Jacq. L'analyse qualitative des extraits par chromatographie liquide à haute performance a révélé la présence probable de la quercétine dans l'EDm. L'estimation quantitative des polyphénols totaux (par la méthode de Folin-Ciocalteu), des flavonoïdes totaux (par la méthode au trichlorure d'aluminium) et des tanins condensés (par la méthode au trichlorure de fer) a montré que l'EDm et l'EMe sont les extraits les plus riches en ces composés. L'inhibition de l'oxydation couplée de l'acide linoléique  $\beta$ -carotène a été évaluée par le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène qui a montré une activité antioxydante considérable pour l'EDm (48.46% d'inhibition) et pour l'EMe (36.40% d'inhibition). L'évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits par la méthode de diffusion dans un milieu solide montre que les extraits EEp, EDm et EMe possèdent un pouvoir antibactérien sur la souche *Staphylococcus aureus* mais à des concentrations élevées, par contre, tous les extraits testés se sont révélés inactifs sur *Candida albicans*.*

**Mots clés:** *Crataegus monogyna* Jacq., extraits naturels, pouvoir antioxydant, pouvoir antimicrobien

### ABSTRACT

*Various biological activities are attributed to a great variety of phenolic compounds isolated from natural plants. This study presents an attempt to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of organic and aqueous extracts prepared from the edible part of *Crataegus monogyna* Jacq. Qualitative analysis of extracts by high performance liquid chromatography revealed the probable presence of quercetin in the EDm. The quantitative*

estimation of total polyphenols (by the Folin-Ciocalteu method), total flavonoids (by the method of aluminium trichloride) and condensed tannins (by the method of iron trichloride) showed that the EDm and EMe extracts are richer in these compounds. The inhibition of coupled oxidation of linoleic acid  $\beta$ -carotene was evaluated by the bleaching test of  $\beta$ -carotene, which showed a significant antioxidant activity for the EDm (48.46% inhibition) and the EMe (36.40% inhibition). The evaluation of the antimicrobial potency of the extracts by the agar diffusion method showed that the extracts EEp EDm and EMe have an antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* strain at high concentrations, whereas all extracts tested were inactive on *Candida albicans*.

**Keywords :** *Crataegus monogyna* Jacq, natural extracts, antioxidant potency, antimicrobial property

## INTRODUCTION

Les plantes médicinales sont à la fois un produit fini destiné à la consommation et une matière première pour l'obtention de substances actives. Elles représentent une source de revenu non négligeable pour de nombreuses populations. L'aubépine monogyne (*Crataegus monogyna* Jacq.) est un fruit très apprécié par la population algérienne et notamment les enfants. C'est une plante médicinale couramment utilisée en phytothérapie pour ses propriétés sédative, vasculoprotectrice et anti-oxydante (Baharun, 1997). La présente étude a porté sur la recherche de constituants chimiques et sur l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits organiques et de l'extrait aqueux, préparés à partir de la partie comestible de *Crataegus monogyna*. Pour cela on s'est fixé les objectifs suivants :

- Analyse quantitative et qualitative du contenu en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins des différents extraits de *Crataegus monogyna*.
- Evaluation de l'effet anti-lipoperoxydant des extraits en utilisant le système acide linoléique- $\beta$ -carotène.
- Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits par la méthode de diffusion en milieu solide.

## MATERIELS ET METHODES

### Matériel végétal

Il est constitué du fruit de *Crataegus monogyna* Jacq., récolté à N'gaous (région de Batna, Algérie) en automne 2007.

### Préparation des extraits

Différents types d'extraits ont été préparés à partir de la poudre de la partie charnue du fruit de *Crataegus monogyna* Jacq. Afin de préserver l'intégrité des molécules et de minimiser toute fermentation qui risquerait de dégrader les matières organiques, la partie charnue a été séchée à basse température puis broyée.

### **Macération**

Une macération aqueuse a été effectuée sur 50 g de poudre avec 500 ml d'eau distillée pendant 24 h. Après filtration, l'extrait a été lyophilisé (Sanogo *et al.*, 2006).

### **Extraction avec les solvants de polarité croissante**

250 g de poudre ont été extraits avec 2000 ml d'éther de pétrole et placés sous agitation pendant 24 h. Après filtration sur papier Watmann, le marc a été ensuite mis en agitation avec le dichlorométhane pendant 24 h, puis avec 2000 ml de méthanol (conformément à la technique utilisée ci-dessus). Les extraits etheropétrolique (EEp), dichlorométhanique (EDm) et méthanolique (EMe) ont été concentrés sous vide à 30° C au rotavapor (Diallo *et al.*, 2004).

### **Chromatographie liquide à haute performance**

La phase stationnaire est constituée d'une colonne gel de silice (C18) (phase inversée) de 125 mm par 4.6 mm. La phase mobile est un mélange ternaire de solvants, soit eau/méthanol/acide acétique (50:47:2.5,V/V/V), en mode isocratique (Amarowicz *et al.*, 2005). Les extraits analysés sont à des concentrations de 0.5 mg/ml pour les extraits EMe et EAq, et 2 mg/ml pour les extraits EEp et EDm, pour un volume injecté de 20 µl, le débit est réglé à 1 ml/min, la détection a été effectuée par un détecteur UV-Visible à une longueur d'onde de 254 nm.

### **Estimation quantitative des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et des tanins condensés**

La méthode de dosage des polyphénols totaux est celle de Folin-Ciocalteu (Li *et al.*, 2007). La méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) (Bahorun *et al.*, 1996) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans ces extraits. Le dosage des tanins condensés était réalisé selon la méthode au trichlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>) (Heimler *et al.*, 2006).

### **Activité antimicrobienne (Sacchetti *et al.*, 2005 ; Celiktas *et al.*, 2007)**

L'évaluation *in vitro* de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la technique de diffusion en milieu solide. Les souches microbiennes utilisées sont : trois espèces bactériennes de référence (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922), quatre souches de salmonelles isolées à partir d'organes de volailles malades (*Salmonella typhimurium* (STB4), *Salmonella typhimurium* (ST54), *Salmonella typhimurium*, (STC3), *Salmonella typhimurium* (ST1)) et une espèce fongique (*Candida albicans*) issues à partir des prélèvements de malades (selles). L'activité antimicrobienne est déterminée en terme de diamètre de la zone d'inhibition de croissance microbienne produite autour des disques après incubation.

### **Analyse statistique**

Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne ± SD. La différence entre le contrôle et les différents tests est déterminée par le test d'ANOVA univarié

suivi du test de Dunnet / Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les valeurs de  $p \leq 0.05$  sont considérées significatives.

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Extraits

Chaque extrait a été caractérisé par sa couleur et son rendement. Ces éléments sont présentés dans le Tableau 1.

TABLEAU 1

Masse, Rendement et Couleur des Extraits Obtenus

Extraits	Masse (g)	Rendement% Par rapport au poids du broyat	Couleur
EEp	1.57	0.62	Jaunâtre
EDm	0.46	0.18	Verdâtre
EMe	100	40	Marron
EAg	15	6	Orange

### Chromatographie liquide à haute performance

La quercétine, la catéchine et la rutine ont été utilisées comme témoins.

TABLEAU 2

Temps de Rétention des Témoins

Témoins	Temps de rétention
Quercétine	1.81
Catéchine	2.05
Rutine	3.45

Les chromatogrammes des témoins sont représentés dans les Figures 1, 2 et 3 respectivement. Les profils chromatographiques des extraits EAq, EMe, EDm et EEp sont représentés dans les Figures 4, 5, 6 et 7 respectivement.

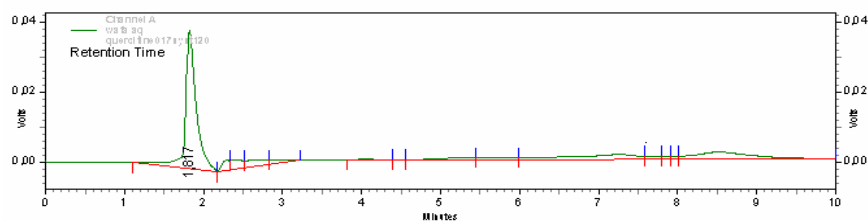


Figure 1. Chromatogramme de la quercétine.

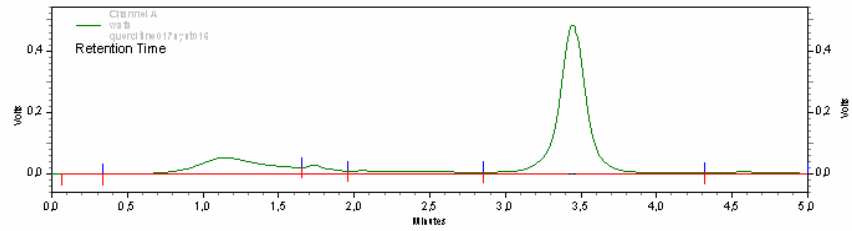


Figure 2. Chromatogramme de la rutine.

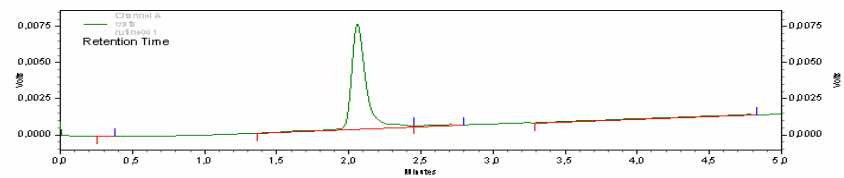


Figure 3. Chromatogramme de la catéchine.

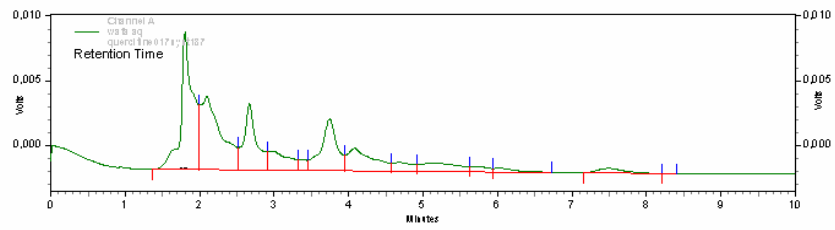


Figure 4. Profil chromatographique de l'EAQ.

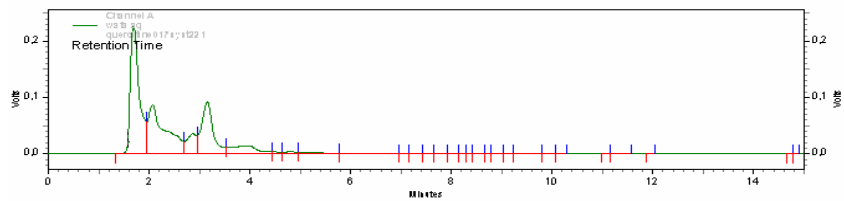


Figure 5. Profil chromatographique de l'EMe.

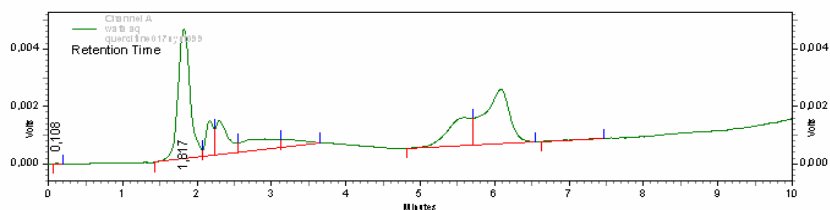


Figure 6. Profil chromatographique de l'EDm.

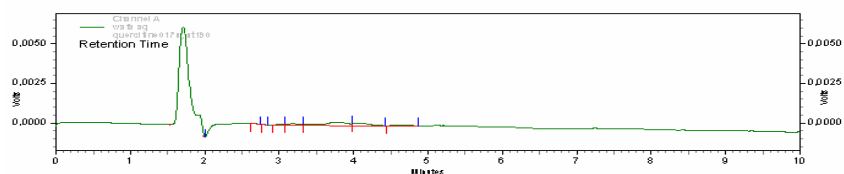


Figure 7. Profil chromatographique de l'EEp.

Après comparaison des temps de rétention des extraits avec ceux des témoins, on constate que L'EDm semble contenir la quercétine (temps de rétention : 1.81). Par contre la rutine et la catéchine ont été absentes dans tous les extraits analysés.

**Estimation quantitative des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et des tanins condensés**

**TABLEAU 3**

**Résultats du Dosage des Polyphénols Totaux, des Flavonoïdes Totaux et des Tanins Condensés dans les Extraits de *Crataegus monogyna***

Extraits	Polyphénols <sup>(a)</sup>	Flavonoïdes <sup>(b)</sup>	Tanins <sup>(c)</sup>
EEp	04.33 ±0.24	0.11 ± 0.1	0.0
EDm	17.87± 2.22	2.1 ±0.10	0.5 ± 0.35
EMe	21.72 ±6.10	3.2 ± 0.02	2.1± 0.01
EAg	11.61 ±0.51	1.45 ± 0.06	0.3 ± 0.1

(a) µg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (µg EAG/mg d'extrait).

(b) µg d'équivalent de quercétine par mg d'extrait (µg EQ/mg d'extrait)

(c) µg d'équivalent de catéchine par mg d'extrait (µg EC/mg d'extrait).

Les résultats du dosage révèlent que l'EMe est le plus riche en composés phénoliques, en flavonoïdes et en tanins, suivi par l'EDm, tandis que l'EEp est le plus pauvre en ces métabolites.

L'examen de ces résultats permet d'établir une corrélation linéaire non significative entre la teneur en flavonoïdes et en composés phénoliques ( $r^2 = 0.87$ ,  $P \leq 0.05$ ), et entre la teneur en tanins et en composés phénoliques ( $r^2 = 0.65$ ,  $P \leq 0.05$ ).

Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques. Des études ont montré que les facteurs extrinsèques (tels que les facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (Aganga, 2001 ; Pedneault *et al.*, 2001).

## Tests biologiques

### *Activité antioxydante*

#### *Technique de décoloration du $\beta$ -carotène*

D'après les résultats, on constate que le BHT et tous les extraits testés inhibent d'une manière significative ( $p \leq 0.05$ ) l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du  $\beta$ -carotène par rapport au contrôle négatif qui représente 100% de la peroxydation. L'EDm montre la plus grande activité inhibitrice avec une AAR estimée à 48.46%, mais cette valeur d'activité reste significativement inférieure ( $p \leq 0.001$ ) à celle du contrôle positif (BHT) qui représente 100% d'activité inhibitrice. L'EMe montre une AAR estimée à 36.40% suivie par l'EEp 24.59% qui est statistiquement supérieure à celle de l'EAq. Ce dernier représente l'extrait le moins actif (16.7%).

L'activité antioxydante de l'EDm est statistiquement supérieure à celle de l'EMe ( $p \leq 0.001$ ). Il existe probablement des différences qualitatives dans la nature des composés phénoliques (qui entrent dans la composition des extraits) influençant le pouvoir antioxydant des extraits. Les flavonoïdes glycosylés (EMe) ont une activité antioxydante inférieure à celle des flavonoïdes non glycosylés (EDm). Par exemple la rutine est presque dix fois moins active que la quercétine (Sokol-Letowska, 2007).

Selon Frankel et Meyer (2000), le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau. Ces deux auteurs ont proposé que les antioxydants apolaires montrent des propriétés antioxydantes car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi la prévention de la formation des radicaux lipidiques et l'oxydation du  $\beta$ -carotène.

Selon Liyana-Pathriana et Shahidi (2006), un extrait qui inhibe ou retarde le blanchissement du  $\beta$ -carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire.

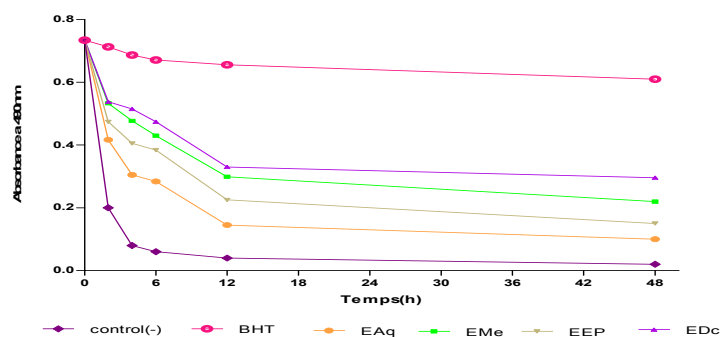


Figure 8. Cinétique de blanchissement du  $\beta$ -carotène à 490nm en absence et en présence des extraits de *Crataegus monogyna* et du BHT (chaque valeur représente la moyenne de trois essais).

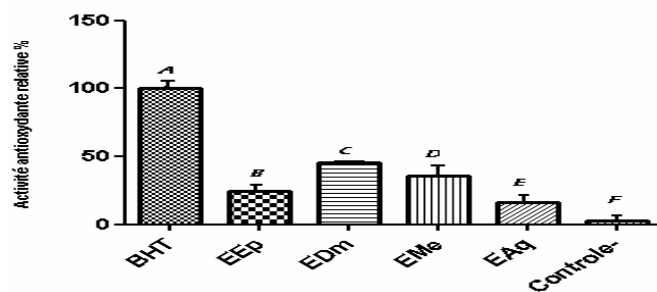


Figure 9. Activité antioxydante relative des extraits de *Crataegus monogyna* et du BHT dans le système  $\beta$ -carotène/acide linoléique (les valeurs sont la moyenne de trois essais  $\pm$  SD), les barres avec des lettres différentes indiquent des activités significativement différentes ( $p \leq 0.001$ ).

#### Evaluation de l'activité antimicrobienne

Au regard de ces résultats, on a observé que les extraits EEP, EDM, et l'EMe ont inhibé la croissance d'une seule souche *S. aureus* (bactérie à Gram positif). Ces extraits exercent une activité antibactérienne dose dépendante. La plus forte activité a été obtenue avec l'EEP avec un diamètre de zone d'inhibition de croissance de  $13.01 \pm 0.21$ mm (à la concentration de 1g/ml).

Certes l'activité inhibitrice des extraits organiques sur *S. aureus* est plus faible que celle due aux antibiotiques de référence; cependant ces extraits exercent une activité antibactérienne dans la mesure où ils ne sont pas des produits purs mais des extraits bruts (Werner *et al.*, 1998 ; Sanogo *et al.*, 2006).



TABLEAU 4

Activité Antibactérienne de l'EEp, EDm, EMe et l'EAq (Diamètres des Zones d'Inhibition de Croissance des Cultures Bactériennes en mm)

Extraits	Diamètres des zones d'inhibition de croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> *(mm)					
	Dilutions des extraits					
	1g/ml	1g/2ml	1g/4ml	1g/10	1g/20ml	1g/50ml
EEp	13.01±0.21	12.2 ±0.26	11.15 ± 1.4	9.8±00	8.00± 1.1	-
EDm	12.00± 1.01	10.2 ±0.5	9.4 ± 1.4	8.25 ±1.2	7.00± 0.5	-
EMe	9.05 ± 1.1	8.02 ±0.1	7 ± 0.4	-	-	-
EAq	-	-	-	-	-	-

\* : diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques (diamètre du disque inclus). Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions.

(-) : pas d'inhibition.

L'activité antibactérienne de l'EEp sur *S. aureus* pourrait s'expliquer par la présence probable des huiles essentielles, des coumarines et des triterpènes (Yukiko *et al.*, 2002; Soharb *et al.*, 2001; Surveswaran *et al.*, 2007).

L'activité antibactérienne sur *S. aureus* des extraits EDm et l'EMe pourrait s'expliquer par la présence de différents constituants, notamment les flavonoïdes, les tanins, les acides phénoliques, les terpènes et les pectines. L'EMe renferme une quantité appréciable de polyphénols mais il n'a montré qu'une faible activité inhibitrice sur la souche *S. aureus*. Il se peut que son activité soit masquée par la présence des sucres (Scalbert, 1991 ; Bruneton, 1993 ; Elegami *et al.*, 2002 ; Hatano *et al.*, 2005 ; Sanogo, 2006 ; Surveswaran *et al.*, 2007).

D'après les résultats obtenus, on remarque que indépendamment de la nature de l'extrait ou de sa concentration, les bactéries à Gram(-) possèdent une forte résistance. Cette résistance n'est pas surprenante, elle est en relation avec la nature de leurs membranes externes (imperméable à la plupart des agents biocides) (Faucher & Avril, 2002). Dans ces conditions expérimentales, l'extrait aqueux et les extraits organiques n'ont donné aucune activité inhibitrice sur la souche clinique *Candida albicans*.

## CONCLUSION

Dans le présent travail, on a tenté de contribuer à la valorisation de l'aubépine monogyne en Algérie en établissant une relation entre sa composition chimique et ses activités biologiques. L'analyse qualitative des extraits EDm et EMe a été effectuée par HPLC. L'étude de l'effet anti-lipopéroxydant a montré que les extraits EDm et EMe sont les plus actifs comme inhibiteurs de l'acide linoléique, couplée à celle du  $\beta$  carotène. L'évaluation du pouvoir antibactérien a révélé que les extraits organiques possèdent un pouvoir antibactérien, dose-dépendant, sur la souche *Staphylococcus aureus*. Ces résultats préliminaires sont intéressants et on pense poursuivre les investigations sur ce fruit.

## REFERENCES

- Aganga, A.A., Mosase, K.W. 2001. Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capussa*, *Ziziphus mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 107-113.
- Amarowicz, R., Troszynska, A., Shahidi, F. 2005. Antioxydant activity of almond seed extract and its fractions. *J. of Food Lipids*, 12: 344-358.
- Bahorun, T. 1997. Substances naturelles actives, la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research*, Conseil Mauritus, Amas.
- Bahorun, T., Grinier, B., Trotin, F., Brunet, G., Pin, T., Luncky, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, C. and Pinkas, M. 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, 46(11): 1086-1089.
- Bruneton, J. 1993. *Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales*. 2<sup>ème</sup> édition, Tec et Doc (Ed.), Paris, 914p.
- Celiktas, O.Y., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Verdar Sucan, O., Baser, K.H.C. 2007. Antimicrobial activities of methanolic extract and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100: 553-559.
- Diallo, D., Sanogo, R., Yasambou, H., Traoré, A., Coulibaly, K. and Maiza, A. 2004. Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae) utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C. R. Chimie*, 7: 1073-1080.
- Elegami, A.A., Elnino, E.I., Eltohami, M.S., Muddathist, K. 2002. Antibacterial activity of some species of family *Combretaceae*. *Phytotherapy Research*, 16: 555-561.
- Faucher, J.L., Avril, J.L. 2002. *Bactériologie générale et médicale*. Tome 1, Ellipses (Ed.), Paris, 214p.
- Frankel, E.N., Meyer, A.S. 2000. The problems of using one dimensional method to evaluate multifunctional food and biological antioxidant. *J. of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1925-1940.
- Hatano, T., Kusuda, M., Inada, K., Ogawa, T.O., Shiota, S., Tsuchiya, T., Yoshida, T. 2005. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 66: 2047-2055.
- Heimler, D., Vignolini, P., Din, M.G., Vinueri, F.F., Ronani, A. 2006. Antiradical activity and polyphenol composition of local *Brassicaceae* edible varieties. *Food Chemistry*, 99: 464-469.
- Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B.D., Polissiou, M., Sokmen, A. 2007. Investigation of the antioxydant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, 100: 584-589.
- Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Tian, Y. 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102: 771-776.
- Liyana-Pathriana, C.M., Shahidi, F. 2006. Antioxydant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 477-485.
- Pedneault, K., Leonhart, S., Angenol, L., Gosselin, A., Ramputh, A. et Arnason, J.T. 2001. *Influence de la culture hydroponique de quelques plantes médicinales sur la*

- croissance et la concentration en composés secondaires des organes végétaux.* Texte de conférence, 5<sup>ème</sup> colloque sur les produits naturels d'origine végétale, Université Laval, Qc, Canada, 1-5.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Mansredini, S., Radice, M. and Irimi, R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobial in food. *Food Chemistry*, 91: 621-632.
- Sanogo, R., Diallo, D., Diarra, S., Ekoumon, C., Bougoudougou, F. 2006. Activité antibactérienne et antalgique des deux recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite au Mali. *Mali Medical*, 1: 18-24.
- Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883.
- Soharb, M.H., Rahman, M.E., Hassan, C.M., Rashid, M.A. 2001. Antibacterial activity of *Claussena heotaphylla*. *Fitoterapia*, 72: 547-549.
- Sokol-Letowska, A., Oszmianski, J., Wojdylo, A. 2007. Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap. *Food Chemistry*, 103: 853-859.
- Surveswaran, S., Cai, Z.Y., Cark, H., Sun, M. 2007. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidant from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, 102: 938-953.
- Werner, F., Paul, O.O., Rainer, A. 1998. Antibacterial activity of East African medicinal plants. *J. of Ethno Pharmacology*, 60: 79-84.
- Yukiko, T., Shikishima, Y., Takaishi, I., Shibata, H. and Higuti, T. 2002. Coumarins and gamma pyrone derivatives from *Prangos pabularia*: antibacterial activity and inhibition of cytokine release. *Phytochemistry*, 59: 649-654.