



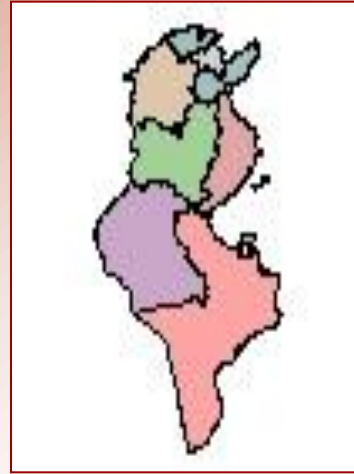
Halophytes et Biomolécules

Ksouri Riadh

Laboratoire d'Adaptation des Plantes aux Stress Abiotiques, CBBC, Pole Technologique de Borj-Cédria, BP 901, 2050 Hammam-lif, Tunisie



***Sebkhas
(Kairouan)***



***Zones sablonneuses
(Jerba)***



***Marécages
(Korba)***



***Zones rocheuses
(Monastir)***

Différents biotopes

Stress abiotiques

Salinité importante



Luminosité excessive



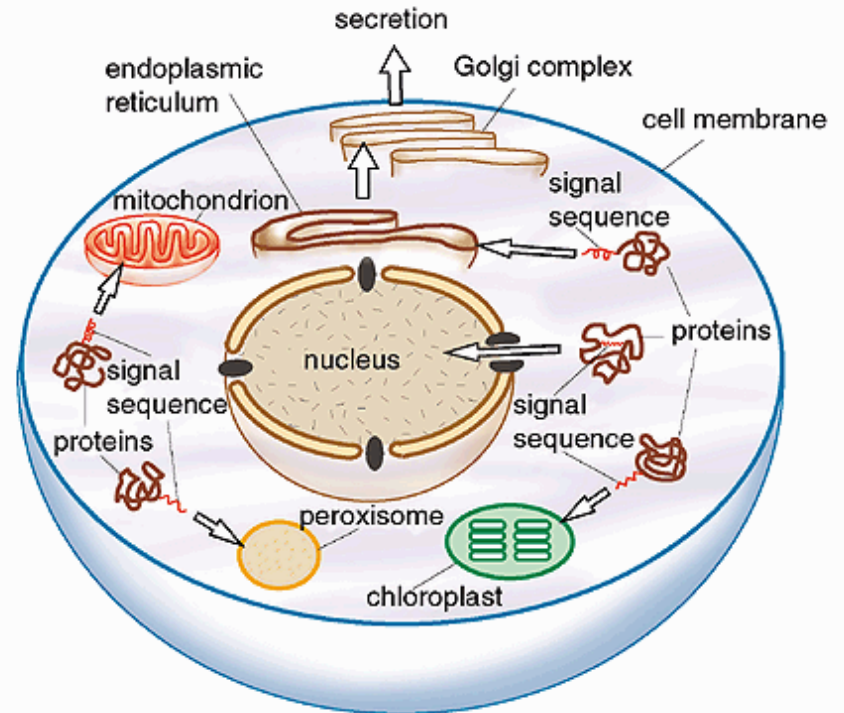
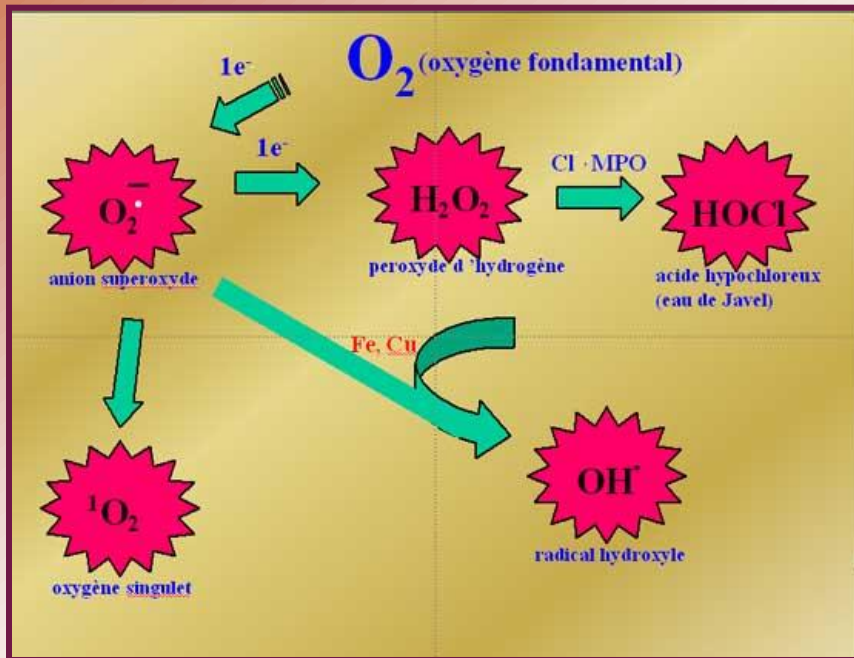
Sécheresse



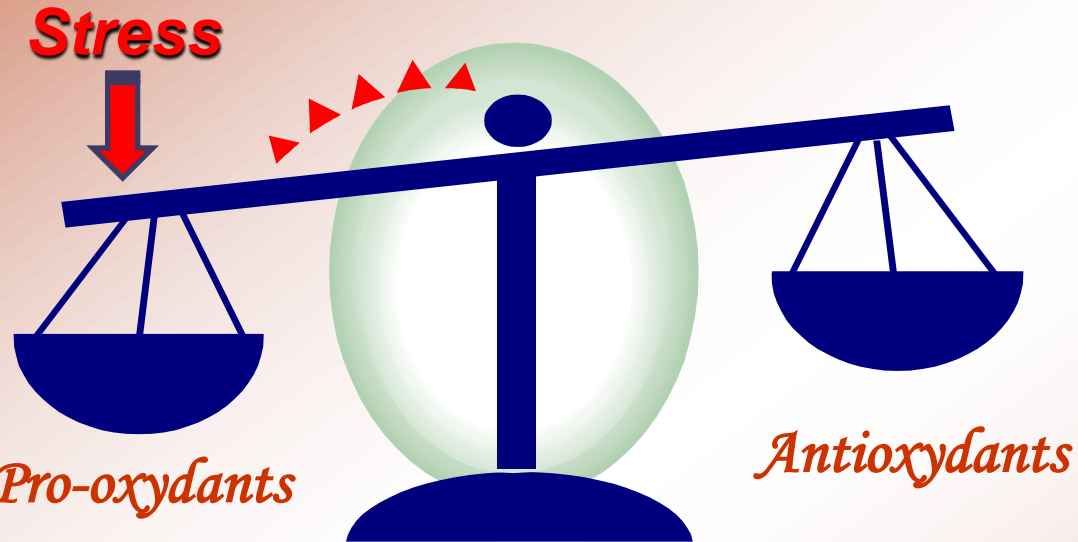
Températures extrêmes



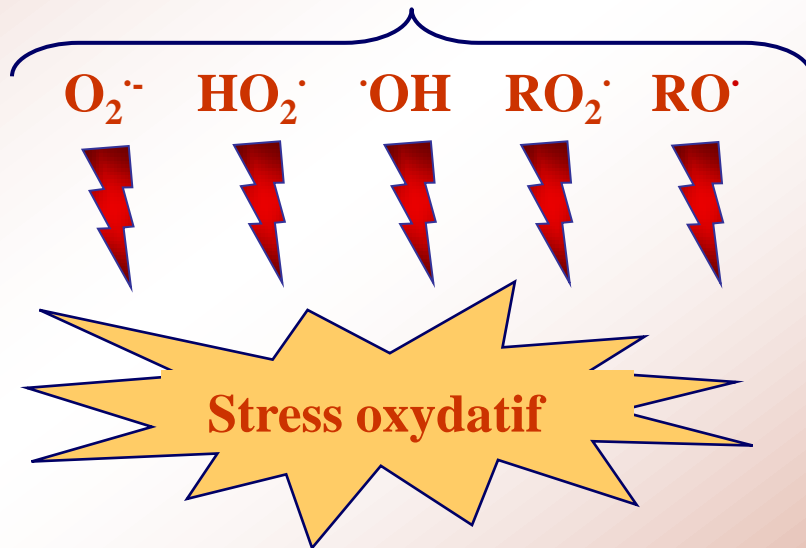
Espèces Oxygénées activées



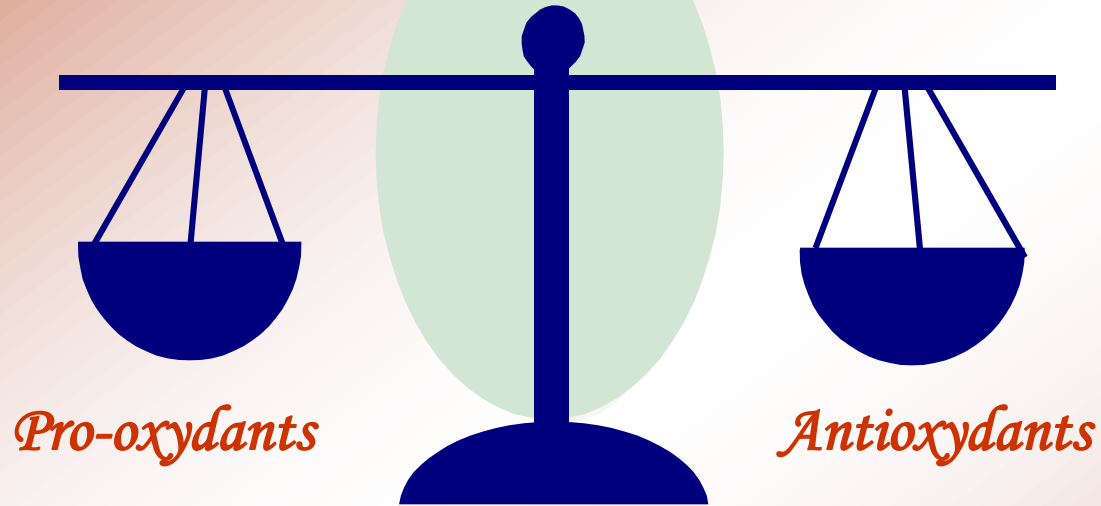
En conditions de Stress



Production excessive des EOA



En conditions normales



fonctions essentielles EOA

Apport d'énergie
Détoxification
Molécules signales
fonction immune

Effets délétères des EOA

EOA

Peroxydation des lipides

Oxydation des protéines

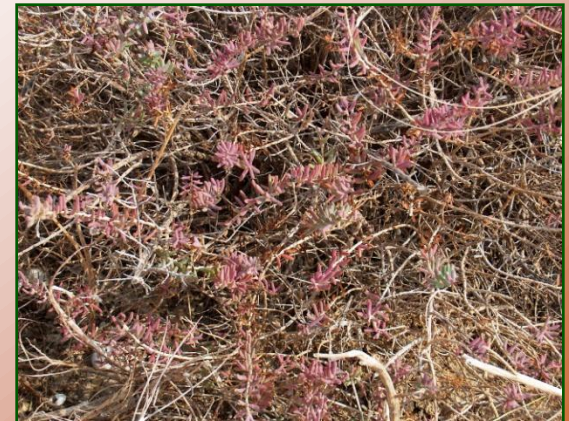
Mutations de l'ADN

Oxydation des sucres

Inactivation des enzymes

Sénescence des cellules

Apoptose cellulaire



Halophytes: Biosynthèse de substances de stress

enzymes Antioxydantes

Superoxide dismutase

Glutathion peroxydase

Catalase

Ascorbate peroxidase

Molécules non-enzymatiques antioxydantes

Vitamines (A, C et E)

Huiles essentielles

Caroténoïdes

Glutathion

Solutés compatibles

Composés phénoliques

Composés phénoliques

Ces composés possèdent un noyau aromatique portant un ou plusieurs groupement hydroxyl



Monophénol

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires dérivant de la voie des shikimates et des phénylpropanoïdes

Class

Structure

Monophénols

C_6

Acides hydroxybenzoïques

C_6C_1

Acides hydroxycinnamiques, phénylpropanoïdes
(Coumarines, isocoumarines, chromones, chromènes)

C_6C_3

Flavonoïdes, isoflavonoïdes

$C_6C_3C_6$

Lignanes, néolignanes

$(C_6C_3)_2$

Biflavonoïdes

$(C_6C_3C_6)_2$

Lignines

$(C_6C_3)_n$

Tanins condensés (Proanthocyanidines)

$(C_6C_3C_6)_n$

Activités et intérêts des Polyphénols

Ces composés ont un large spectre d'activités physiologiques et ils occupent une grande importance grâce à leurs multiples vertus et applications.

Applications pharmaceutique et médicale

Activité antioxydante

Activité antimicrobienne

Activité Antitumorale

Activité vasodilatatrice

Activité anti-inflammatoire

Applications industrielles

Industrie alimentaire
(conservation)

Cosmétique
(contre le vieillissement cellulaire)

Travaux Pratiques

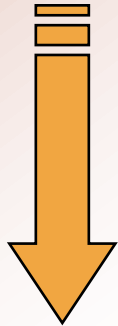
La présence du stress oxydatif chez les plantes est marquée par



Indicateurs du stress oxydatif

La biosynthèse des antioxydants naturels

Activités antioxydantes



Malondialdéhyde (MDA)

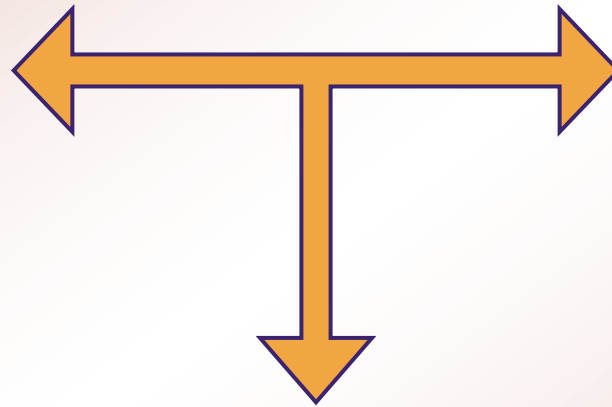
Les polyphénols

DPPH

Indicateurs du stress oxydatif

*Peroxydation
lipidique (dosage du
malondialdéhyde,
MDA)*

*Dosage du peroxyde
d'hydrogène
(H_2O_2)*



*Réduction de l'intégrité
membranaire (dosage de la fuite
des électrolytes)*

Manipulation I

Extraction et dosage du malonyldialdéhyde (MDA)

Principe

La méthode la plus utilisée pour l'estimation *in vitro* de la peroxydation des lipides dans les systèmes biologiques est le dosage du malonyldialdéhyde (MDA) par la réaction de l'acide thiobarbiturique (TBA).

La réaction de dosage du MDA repose sur la formation en milieu acide et à chaud entre le MDA et deux molécules de TBA, d'un pigment rouge absorbant à 532 nm

Extraction et dosage du malonyldialdéhyde (MDA)

Les mesures sont réalisées sur des feuilles de plantes témoins et stressées.

Extraction:

- 100 mg de matière fraîche sont broyés, avec une pincée de sable stérile, dans 1 ml d'acide trichloracétique (TCA, 0.1 %).
- Centrifugation pendant 15 min à 15000xg à 4 °C, et le surnageant est conservé.

Dosage:

- Incuber un milieu réactionnel contenant 250µl du surnageant et 1 ml d'acide thiobarbiturique TBA (0.5 %) (préparé dans le TCA à 20 %) pendant 30 min, dans un bain-marie à 95 °C.
- La réaction est arrêtée par un refroidissement immédiat dans de la glace pilée pendant 10 min.
- Centrifugation 10 min à 10000xg
- Récupération du surnageant pour le dosage, par colorimétrie, des lipoperoxydes. L'absorbance est lue à 532 nm contre un blanc contenant 0.5 % TBA et 10 % TCA.

Après soustraction de l'absorbance non spécifique lue à 600 nm, la concentration du malondialdéhyde est calculée à l'aide de son coefficient d'extinction ($155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Extraction et dosage des polyphénols totaux

Extraction



Séchage

*Air libre + ombre +
température ambiante*



Broyage et extraction

*Poudre fine +
Solvant polaire*



Manipulation II

Quantification des polyphénols

Principe de la réaction

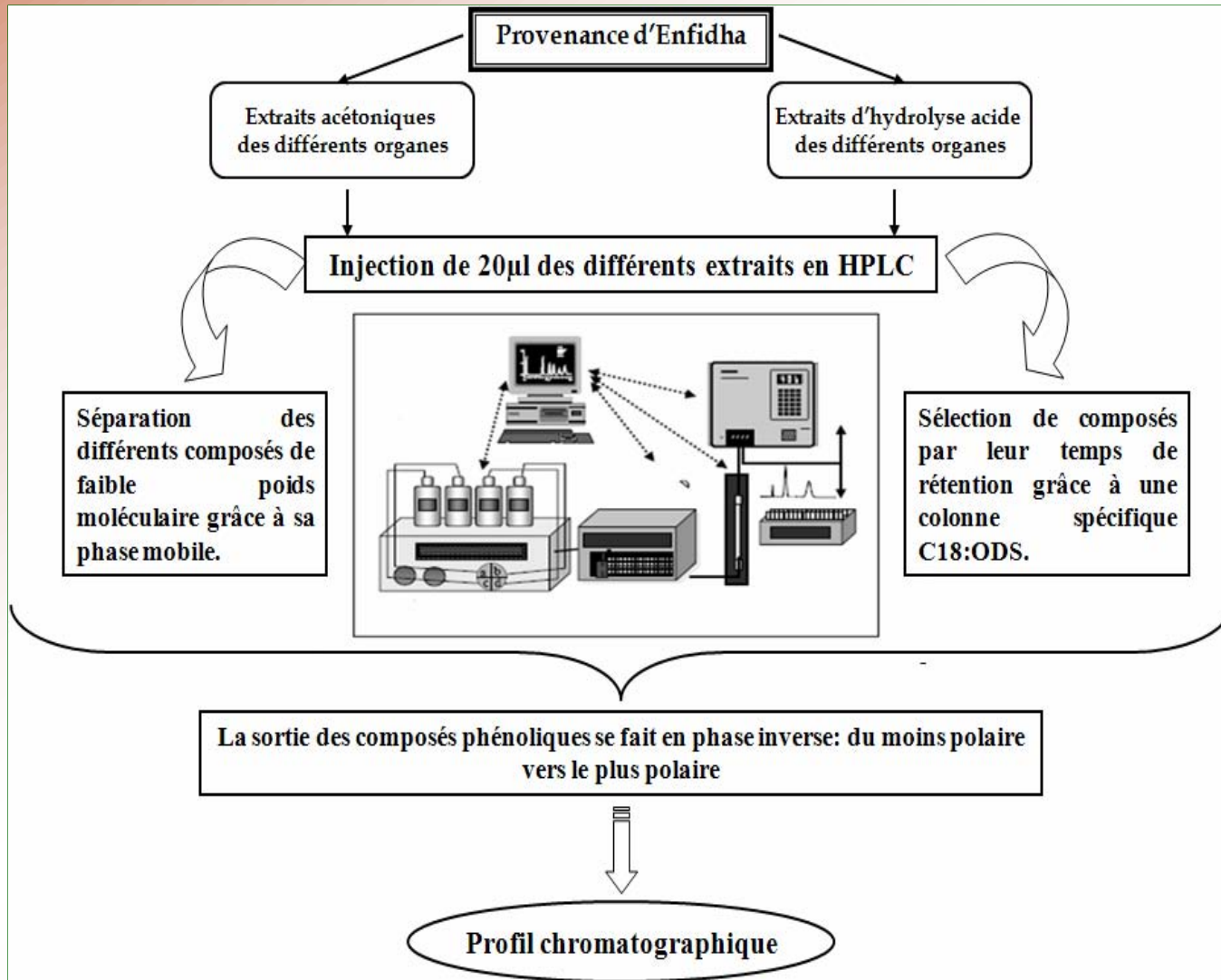
Le dosage des polyphénols se fait avec le réactif de Folin-Ciocalteu qui, en milieu alcalin, se réduit en oxyde de tungstène et de molybdène donnant une couleur bleue en présence de polyphénols.

Protocole expérimental

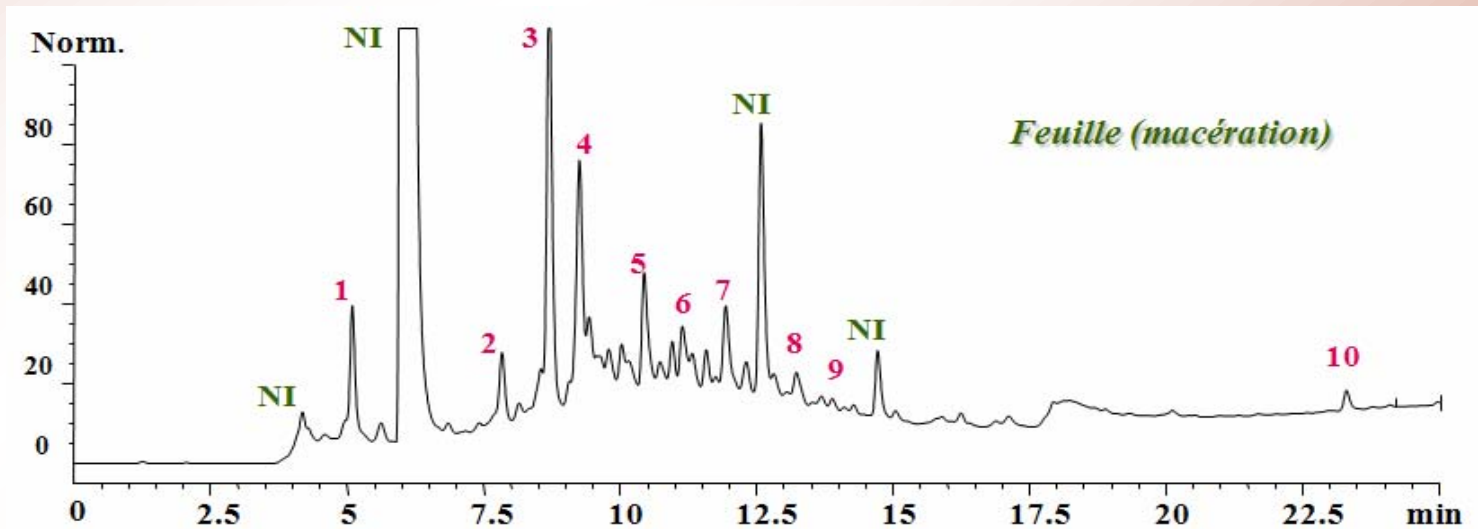
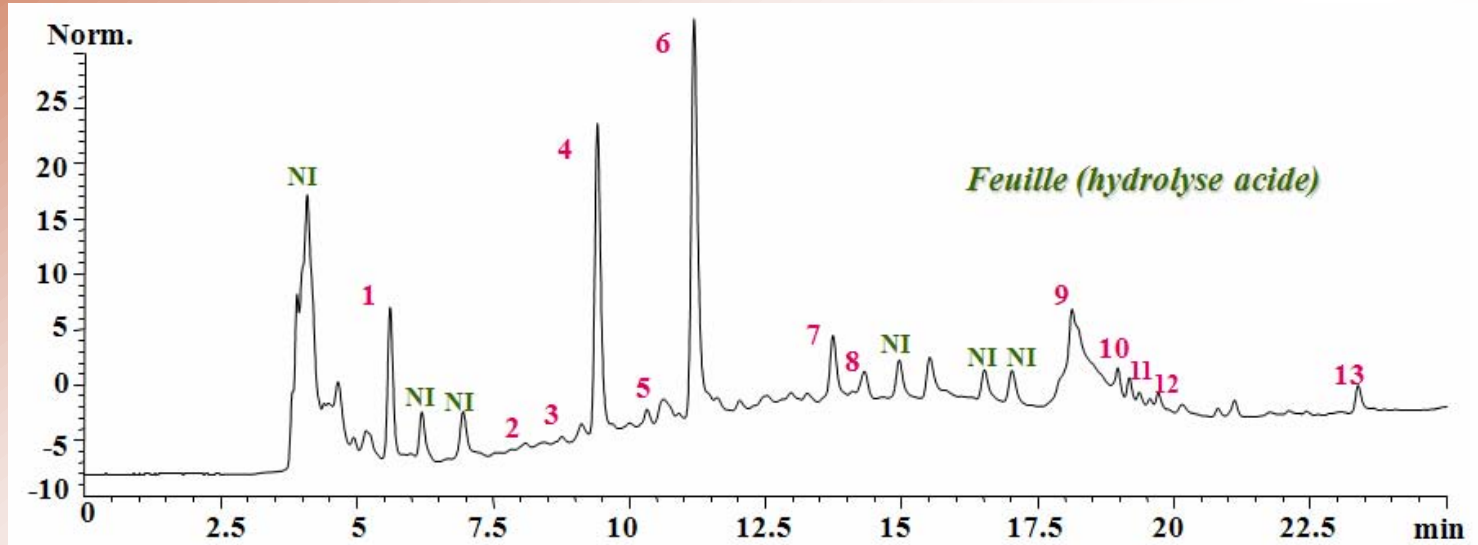
- Une prise de 125 μl de l'extrait dilué (selon le solvant et l'organe) est mélangé avec 500 μl d'eau distillée et 125 μl de réactif de Folin-Ciocalteu.
- Après une agitation vigoureuse du mélange suivie d'un repos de 3 minutes, une prise de 1250 μl de $\text{CO}_3(\text{Na})$ 2 à 7 % est additionnée.
- Enfin le mélange obtenu est ajusté par de l'eau distillée à 3 ml.
- Après un repos de 90 minutes à l'obscurité, la lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 760 nm

La gamme étalon est préparée avec de l'acide gallique à des concentrations variables de 50, 100, 200, 300, 400, 500 mg.l^{-1} . Les teneurs en polyphénols sont exprimées en mg d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mgEAG.g^{-1} MS).

Identification des composés phénoliques par RP-HPLC

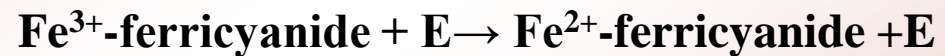


Identification des principaux composés phénoliques à partir des profils chromatographiques



Différents tests d'activités antioxydantes

Pouvoir réducteur



Pouvoir chélateur



Activité antiradicalaire

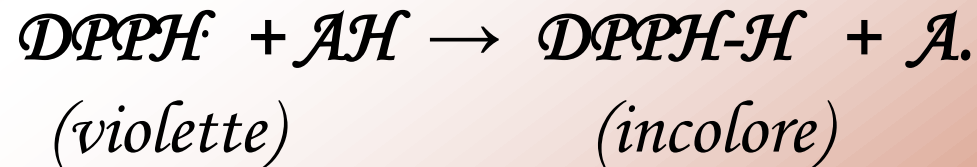


Manipulation III

Activité antiradicalaire (test DPPH)

(i) Principe

L'activité antiradicalaire est mesurée par la dégradation du DPPH : 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl, qui est un radical synthétique présentant une intense coloration violette. La couche électronique de ce radical est saturé en contact d'antioxydants, ce qui explique la disparition de sa coloration. Cette décoloration explique le pouvoir de l'extrait de la plante à piéger ce radical, qu'on peut détecter par un spectrophotomètre-UV.



(ii) Mesure de l'activité

- Un aliquote de 1ml de l'extrait à différentes concentrations (1,10, 100 et 200 µg/ml), est mélangé avec 250 µl d'une solution de DPPH (0.2 mM).
- Après une agitation vigoureuse du mélange, il est conservé au repos pendant 30min à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre -UV visible, en se référant à un témoin sans extrait.

Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois.

L'activité antiradicalaire est estimée en pourcentage d'inhibition grâce à la formule suivante :

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

PI : pourcentage d'inhibition.

DO témoin : absorbance du témoin.

DO extrait : absorbance de la solution d'extrait.

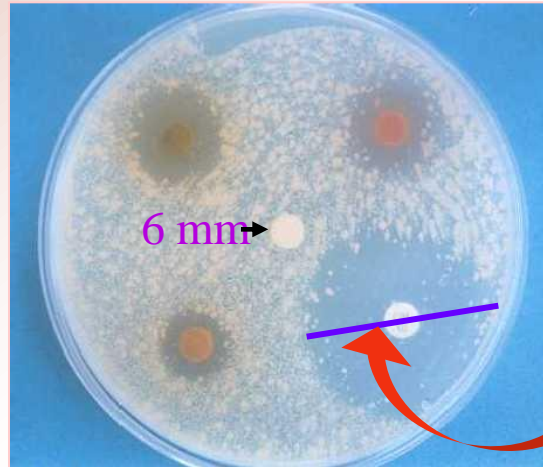
La réalisation de la cinétique de cette activité a permis de déterminer les concentrations qui correspondent à 50 % d'inhibition (CI_{50}); la valeur de CI_{50} la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée. La valeur de CI_{50} est exprimée en $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (3 répétitions pour chaque concentration).

Activités antibactérienne et antifongique

L'activité antimicrobienne est déterminée par la méthode d'*Aromatogramme*

Culture des souches des bactéries et des levures sur les boîtes de Pétri.

On met des disques de 6 mm sur les tapis des bactéries et des levures.



On imbibe les disques par 10 μ l d'extraits de concentration 100 mg.ml⁻¹.

Incubation à 37° C pendant 24 H et mesure du diamètre de zone d'inhibition.

Souches bactériennes

Staphylococcus epidermidis CIP 106510
Staphylococcus aureus ATCC 25923
Echerichia coli ATCC 35218
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
Micrococcus luteus NCIMB 8166

Souches de levure

Candida kefyr
Candida holmii
Candida albicans
Candida sake
Candida glabrata

Activité antibactérienne

Diamètre de zone d'inhibition (mm \pm SD)

Les bactéries	Feuille	Fleur	Tige	Galle	Antibiotique
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7.33 \pm 0.58	8.33 \pm 0.58	9.66 \pm 0.58	10 \pm 0	30
<i>Staphylococcus aureus</i>	8.66 \pm 0.58	8 \pm 0	10.33 \pm 0.58	10 \pm 0	22
<i>Echerichia coli</i>	7 \pm 0	7 \pm 0	-	7 \pm 0	27
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	7 \pm 0	7 \pm 0	16
<i>Micrococcus luteus</i>	8 \pm 0	9.33 \pm 0.58	12 \pm 0	13.66 \pm 0.58	26

L'activité est absente si la zone d'inhibition est < 1 mm ; activité est faible si (ZI) est de 1mm; activité moyenne si (ZI) est entre 2-3 mm; activité assez élevée si (ZI) est entre 4-5 mm ; activité élevée si (ZI) est entre $> 6-9$ mm; activité très élevée si (ZI) est > 9 .

Activité antifongique

Diamètre de zone d'inhibition (mm \pm SD)

	Feuille	Fleur	Tige	Galle	Antibiotique
Les bactéries					
<i>Candida albicans</i>	7 \pm 0	-	-	8 \pm 0	27
<i>Candida kefyr</i>	7 \pm 0	7 \pm 0	-	7.66 \pm 0.58	30
<i>Candida holmii</i>	8 \pm 0	-	7 \pm 0	7 \pm 0	22
<i>Candida sake</i>	7 \pm 0	-	7 \pm 0	7 \pm 0	16
<i>Candida glabrata.</i>	7.33 \pm 0.47	-	7 \pm 0	8 \pm 0	22

L'activité est absente si la zone d'inhibition est < 1 mm ; activité est faible si (ZI) est de 1 mm; activité moyenne si (ZI) est entre 2-3 mm; activité assez élevée si (ZI) est entre 4-5 mm ; activité élevée si (ZI) est entre $> 6-9$ mm; activité très élevée si (ZI) est > 9 .