Etude phytochimique de quelques plantes extrêmophiles tunisiennes et exploration de leurs activités biologiques

Ramla Sahli

▶ **To cite this version:**

Ramla Sahli. Etude phytochimique de quelques plantes extrêmophiles tunisiennes et exploration de leurs activités biologiques. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II; Université de Carthage (Tunisie), 2017. Français. NNT : 2017LIL2S016 . tel-01858408

HAL Id: tel-01858408
https://theses.hal.science/tel-01858408

Submitted on 20 Aug 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Lille 2
Ecole Doctorale Biologie Santé
***
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
Laboratoire de pharmacognosie
***
Institut Charles Violette

Université de Carthage
***
Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie
***
Laboratoire des Plantes Aromatiques et Médicinales
Centre de Biotechnologie de Borj Cédria

THESE DE DOCTORAT

En "Sciences du médicament et des autres produits de santé" et En "Génie Biologique"

ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE QUELQUES PLANTES EXTREMOPHILES TUNISIENNNES ET EXPLORATION DE LEURS ACTIVITES BIOLOGIQUES

Présentée par :
Ramla SAHLI

Encadrée par :
Pr. Sevser Sahpaz
Pr. Riadh Ksouri
Co-encadrée par :
Dr. Céline Rivière

Soutenue le 13 juillet 2017, devant le Jury composé comme suit :

Pr. Dominique Laurain-Mattar	Université de Lorraine	Président
Pr. Ameur Cherif	Université de la Manouba	Examinateur
Pr. Jean-Michel Mérillon	Université de Bordeaux	Rapporteur
Pr. Imene Ouzari	Université de Tunis El Manar	Rapporteur
Pr. Sevser Sahpaz	Université de Lille 2	Directrice de thèse
Pr. Riadh Ksouri	Université de Carthage	Directeur de thèse

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2016/2017

À mes soeurs,

À mes parents

Merci !

Ce travail est le fruit de collaborations forgées sur la sincère volonté d'offrir une contribution, quelle qu'elle soit, à la recherche.

Je tiens à remercier les Professeurs Sevser Sahpaz et Riadh Ksouri, mes directeurs de thèse, pour avoir généreusement accueilli mon projet de thèse ; étant prompts à répondre à mes sollicitations, et ayant apporté le recul nécessaire sur certains problèmes qui me semblaient insolvables au premier abord.

Un remerciement tout particulier à mon encadrante, le Dr Céline Rivière, qui a directement adopté mon projet de thèse ; et qui m'a toujours accordé patience, soutien et confiance, me guidant constamment vers de nouvelles connaissances et formations enrichissantes. Ses compétences, notamment en identification structurale des molécules d'origine naturelle, m'ont été très précieuses. Par ailleurs, je n'oublierai jamais ces moments plus informels, qui ont été l'occasion pour moi de ne jamais se sentir dépaysée.

Les Professeurs Jean-Michel Mérillon, Hadda-Imene Ouzari, Ameur Cherif et Dominique Laurain-Mattar, qui ont accepté de siéger dans le jury de cette thèse, doivent aussi trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je suis très reconnaissante aux Drs Karin Séron et Yves Rouillé, ainsi qu'à Marie-Emmanuelle Sahuc, du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL, Institut Pasteur de Lille), pour avoir apporté la plus grande contribution scientifique à ce travail et pour avoir conduit la recherche jusqu'au bout afin de caractériser le mode d'action du dehydrojuncusol, nouvel inhibiteur du virus de l'hépatite C. Je les remercie également pour s'être rendus disponibles afin de nous communiquer le détail d'avancement de leurs expériences lors de multiples réunions.

Je remercie très sincèrement le Dr Ali Siah pour avoir soutenu vivement ce travail en y apportant une approche plutôt originale qui s'est avérée très prometteuse ; et pour m'avoir offert des compétences précieuses, avec toute attention et patience. Je remercie également toute l'équipe du laboratoire de Biotechnologie et Gestion des Agents Pathogènes en Agriculture (ISA, Institut Charles Violette), en particulier le directeur, le Professeur Patrice Halama, et les doctorantes Samara et Myriam, pour leur accueil chaleureux et pour leur soutien technique.

Je remercie très chaleureusement, le Dr Christel Neut, pour avoir porté un grand intérêt à ce travail en accueillant vivement mes manipulations dans le laboratoire de bactériologie (INSERM U995, Université de Lille 2), mais également en acceptant de faire partie de mon comité de suivi de thèse. L'éclairage en bactériologie qu'elle a su apporter dans le

cadre de ce travail a été un atout indéniable. Je remercie aussi toute l'équipe du laboratoire de bactériologie, y compris Oumaïra, Isabelle, Séverine, Carole et Charlotte pour leur soutien, aussi bien sur le plan technique, que par l'ambiance fort conviviale qu'elles offrent.

Je remercie le Professeur Joëlle Quetin-Leclercq pour avoir suivi de près mon travail en mettant à disponibilité les compétences du laboratoire de pharmacognosie (Université Catholique de Louvain) au service de ce travail, et en acceptant d'être membre de mon comité de suivi de thèse, m'apportant ainsi de précieux conseils. Je remercie également le Dr Joanne Bero et Claire Beaufay pour avoir participé vivement à ce travail en effectuant les analyses de cytotoxicité et en offrant les mesures nécessaires pour que nous puissions suivre et comprendre les expériences effectuées.

Je suis très redevable au Professeur Nathalie Azaroual qui a généreusement assisté mes multiples expériences RMN et qui s'est montrée particulièrement attentive à l'égard de ce travail en nous offrant ses compétences dans l'élucidation structurale d'une de nos molécules, et ceci malgré son emploi du temps très chargé. Je remercie aussi toute l'équipe du Laboratoire d'Application de Résonance Magnétique Nucléaire (LARMN, Université de Lille 2), en particulier Vincent et Alexandre pour leur assistance et leur bienveillance, mais également Pierre de m'avoir formée pour réaliser les expériences RMN.

Je remercie vivement toute l'équipe du Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses (CUMA-Université de Lille 2), le Professeur Jean-François Goossens, et l'ensemble de ses collègues (Nathalie Duhal, Céline Lenglart, Mike Howsam, Mostafa Kouach, Brigitte Callens), qui ont su se rendre disponibles pour effectuer les analyses en spectrométrie de masse nécessaires à ce travail, et ceci malgré les multiples charges qui leurs sont attribuées.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire des Plantes Aromatique et Médicinales (CBBC) en Tunisie, en particulier au Dr Abderrazak Smaoui qui m'a fortement soutenue lors du long travail d'identification des plantes, en mettant à ma disposition ses compétences en botanique. Je remercie également Khaoula, Ahmed et Emna, pour toute l'aide qu'ils m'ont apporté.

Je remercie aussi Jennifer, Vincent, Thierry, Simon, Malika, Cécile et Ayano qui ont veillé, avec compassion, au bon déroulement de ce travail, en offrant toute l'assistance technique, des conseils pratiques, la maintenance des équipements et encore un soutien lors des moments difficiles. Je n'oublierai pas non plus toutes nos discussions enrichissantes et parfois mêmes hilarantes !

A mes collègues et amis, Ameni, Lætitia, Rym, Hishda, Moussa (Diop), Cédric, Charlie, Maryam et particulièrement Moussa, merci infiniment pour avoir rendu mon aventure de recherche agréable et passionnante, tous mes encouragements pour la suite !

A mes sœurs Insaf et Emna, les mots me manquent pour vous remercier, le support que vous m'avez apporté est tout simplement inestimable.

A mes parents, un merci ne serait répondre à votre soutien, sans vous, je n'aurais pas pu mener à bien ce travail.

SOMMAIRE

INTRODUCTION 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 4

I. Les plantes extrêmophiles réservoirs de biomolécules 5

I.1. Les plantes xérophytes 5

I.2. Les plantes halophytes 5

I.3. Le système antioxydant des halophytes et des xérophytes, une forme d'adaptation performante 6

I.4. Les halophytes et les xérophytes, sources riches en composés phénoliques 6

II. Les composés phénoliques 8

II.1. Les acides phénoliques 9

II.1.1. Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque 9

II.1.2. Les dérivés de l'acide hydroxycinnamique 10

II.2. Les flavonoïdes 10

II.2.1. Les flavonoïdes au sens strict 11

II.2.2. Les autres flavonoïdes 13

II.3. Les stilbénoïdes 13

II.3.1. Les stilbènes et les bis(bibenzyls) 14

II.3.2. Les phénanthrènes 14

II.4. Les tanins 15
II.4.1. Les tanins galliques ou hydrolysables 15
II.4.2. Les tanins condensés 15
III. La richesse des plantes halophytes et xérophytes en polyphénols leur procurent diverses vertus antimicrobiennes 16
III.1. Applications dans la lutte biologique contre les pathogènes des plantes cultivées 17
III.1.1. Les polyphénols offrent aux halophytes et aux xérophytes un pouvoir antifongique prometteur sur les pathogènes des cultures 17
III.1.2. *Zymoseptoria tritici*, un des pathogènes menaçants des cultures de blé… 18
III.2. Applications dans la santé humaine.....22
III.2.1. Les halophytes et les xérophytes, des sources prometteuses en polyphénols anti-infectieux.....22
III.2.2. Le problème de résistance aux antibiotiques 24
III.2.3. L'hépatite C, une maladie persistante dans le secteur de la santé publique 28
IV. Cas des plantes étudiées.....34
IV.1. Exploration des plantes halophytes et xérophytes dans leurs biotopes 34
IV.2. Présentation des plantes étudiées, utilisations traditionelles et données phytochimiques et pharmacologiques 36
IV.2.1. *Silene succulenta* Forsk. 36
IV.2.2. *Atriplex tatarica* L. 37
IV.2.3. *Aeluropus littoralis* Parl.....39
IV.2.4. *Limonium virgatum* Willd. 40
IV.2.5. *Juncus maritimus* Lamk 43
IV.2.6.*Atractylis serratuloides* (Cass.) Sieber ex Cass. 48
IV.2.7.*Scabiosa atropurpurea* L. subsp. *maritima* (L.) Fiori & Paoli 50
IV.2.8.*Cirsium scarbrum* (Poir.) Bonnet & Barratte 51
RESULTATS 57
I. Criblage biologique des plantes halophytes et xérophytes et initiation du fractionnement bioguidé pour les plantes les plus actives 59
II. *Cirsium scabrum* : isolement et caractérisation des composés responsables de son activité cytotoxique et révélation de son potentiel antibactérien 99
III. *Juncus maritimus* : activités antivirale (virus de l'hépatite C) et antibactérienne 127

III.1. Identification du composé responsable de l'activité de *J. maritimus* sur le virus de l'hépatite C et caractérisation de son activité.....127

III.2.Purification de composés minoritaires et analyse de leurs activités sur le virus de l'hépatite C.....156

III.2.1. Processus de purification des composés.....157

III.2.2. Identification de certains des composés isolés.....159

III.2.3. Analyse de l'activité de certains des composés purifiés sur le virus de l'hépatite C (VHC).....161

III.3. Fractionnement bioguidé du sous-extrait responsable de l'activité antibactérienne de *J. maritimus* et détermination des composés les plus actifs.....162

III.3.1. Analyse de l'activité antibactérienne sur une nouvelle collection de bactéries à Gram positif.....162

III.3.2. Détermination de la CMB du sous-extrait le plus actif sur les souches *Streptococcus dysgalactiae* T46C14 et *Streptococcus pyogenes* 13240.....163

III.3.3. Détermination de la CMB du sous-extrait le plus actif sur d'autres souches de *S. pyogenes*.....165

III.3.4. Localisation des composés potentiellement actifs sur *S. pyogenes* 16135.....166

III.3.5. Analyse de l'activité antibactérienne des composés purifiés sur *S. pyogenes* 16135.....166

IV. Exploration des effets des plantes halophytes et xérophytes sur la santé du végétal, l'exemple de la septoriose du blé.....168

CONCLUSION GENERALE.....195

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Voiesde biosynthèse simplifiée des flavonoïdes 9

Figure 2. Structure de base des flavonoïdes 10

Figure 3. Structure de base des différentes classes des flavonoïdes 11

Figure 4. Structures de base de stilbénoïdes.....14

Figure 5. Exemples de dérivés phénanthréniques chez des halophytes (Juncus) 14

Figure 6. Exemples d'ellagitanins chez une espèce halophyte (*Terminalia catappa*, Combretacées) 15

Figure 7. Cycle biologique simplifié de *Mycosphaerella graminicola* 19

Figure 8. Lésions sporulantes à la surface d'une feuille de blé 20

Figure 9. Mode d'action des antibiotiques.....25

Figure 10. Virus de l'hépatite C : schéma de la structure et organisation du génome...29

Figure 11. Principales étapes du cycle de réplication du VHC.....31

Figure 12. Schéma récapitulatif des modes d'action d'inhibiteurs du VHC d'origine naturelle 32

Figure 13. Localisation des zones investiguées sur la carte de la Tunisie 34

Figure 14. *Silene succulenta* : sur terrain et collectée 36

Figure 15. *Atriplex tatarica* : sur terrain et collectée.....37

Figure 16. *Aeluropus littoralis* : sur terrain et collectée 39

Figure 17. *Limonium virgatum* : sur terrain et collectée 40

Figure 18. *Juncus maritimus* : sur terrain et collectée 43

Figure 19. Structure de base des phénanthrènes et des dérivés 9,10-dihydrophénanthrènes 46

Figure 20. Structure de base des phénanthraquinones 46

Figure 21. Structure de base des phénanthrènes dimériques (liaison en C-1-1') 46

Figure 22. Exemples de phénanthrènes monomériques dans le genre *Juncus*. 47

Figure 23. *Atractylis serratuloides* : sur terrain et collectée 48

Figure 24. *Scabiosa maritima* : sur terrain et collectée 50

Figure 25. *Cirsium scabrum*: sur terrain et collectée 51

Figure 26. Schéma de biosynthèse de certaines familles de triterpènes 54

Figure 27. Exemples de triterpènes retrouvés dans plusieurs espèces de *Cirsium* 55

Figure 28. Structure chimique du feruloyl tyramine 62

Figure 29. Structure chimique de la lutéoline 62

Figure 30. Molécules identifiées dans le sous-extrait éther de pétrole des feuilles de *Cirsium scabrum* 102

Figure 31. Structures chimiques du juncusol et du dehydrojuncusol 128

Figure 32. Chromatogramme de JMR-MC 156

Figure 33. Stratégie de purification des composés à partir de JMR-MC 158

Figure 34. Structures chimiques des composés identifiées (JMR-MC) 160

Figure 35. Localisation des composés purifiés sur le chromatogramme de JMR-MC 160

Figure 36. Effets des composés (juncunol, C10 et C12) sur l'inhibition des 3 étapes principales du cycle du VHC, en comparaison avec le dehydrojuncusol 161

Figure 37. Schéma de la plaque utilisé pour les essais contre *S. dysgalactiae* et *S. pyogenes* 164

Figure 38. Structure chimique de la lutéoline 201

Figure 39. Structure chimique du dehydrojuncusol.....201

Figure 40. Structure chimique du juncunol 203

Figure 41. Structure chimique de la lutéoline 204

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Exemples de dérivés de l'acide benzoïque identifiés chez des plantes halophytes 9

Tableau 2. Exemples de dérivés de l'acide hydroxycinnamique rencontrés chez des plantes halophytes.....10

Tableau 3. Exemples de flavones et de flavonols identifiés chez certaines plantes halophytes 12

Tableau 4. Exemples de flavanones identifiées chez des halophytes 12

Tableau 5. Molécules purifiées à partir d'espèces du genre *Limonium*.....42

Tableau 6. CMI (µg/mL) des sous extraits de JMR-CE, qui sont actifs sur les souches bactériennes (Gram +).....163

Tableau 7. CMI et CMB (µg/mL) observées pour JMR-MC contre 8 souches de *S. pyogenes* 165

Tableau 8. CMI et CMB (en µg/mL) enregistrées pour les composés testés sur *S. pyogenes* 16135 166

Tableau 9. Conditions de collectes des échantillons de rhizomes de *Juncus maritimus* (JMR2 à JMR7).....169

LISTE DES ABREVIATIONS

AG : Acide Gallique

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CI_{50} : La concentration inhibitrice à 50%

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CPC : Chromatographie de Partage Centrifuge

CSRW : extrait méthanolique des feuilles de *Cirsium scabrum*

CSPE : sous-extrait éther de pétrole des feuilles de *Cirsium scabrum*

CSMC : sous-extrait dichlorométhane des feuilles de *Cirsium scabrum*

CSEA : sous-extrait acétate d'éthyle des feuilles de *Cirsium scabrum*

CSBt : sous-extrait butanol des feuilles de *Cirsium scabrum*

CSW : sous-extrait aqueux des feuilles de *Cirsium scabrum*

DAA : "Direct Acting Antivirals"

JFH1 : "Japanese fulminant hepatitis-1"

JMR-CE : extrait méthanolique des rhizomes de *Juncus maritimus*

JMR-MC : sous-extrait dichlorométhane des rhizomes de *Juncus maritimus*

JMR-EA : sous-extrait acétate d'éthyle des rhizomes de *Juncus maritimus*

JMR-H_2O : sous-extrait aqueux des rhizomes de *Juncus maritimus*

HR-MS : spectrométrie de masse haute résolution

LVS-CE : extrait méthanolique des tiges de *Limonium virgatum*

LVS-MC : sous-extrait dichlorométhane des tiges de *Limonium virgatum*

LVS-EA : sous-extrait acétate d'éthyle des tiges de *Limonium virgatum*

LVS-But : sous-extrait butanol des tiges de *Limonium virgatum*

LVS-H_2O : sous-extrait aqueux des tiges de *Limonium virgatum*

LVL-CE : extrait méthanolique des feuilles de *Limonium virgatum*

LVL-MC : sous-extrait dichlorométhane des feuilles de *Limonium virgatum*

LVL-EA : sous-extrait acétate d'éthyle des feuilles de *Limonium virgatum*

LVL-But : sous-extrait butanol des feuilles de *Limonium virgatum*

LVL-H_2O : sous-extrait aqueux des feuilles de *Limonium virgatum*

PHH : hépatocytes humains primaires

RMN : Résonance magnétique nucléaire

VHC : Virus de l'Hépatite C

INTRODUCTION : quelques éléments de contexte

Les produits d'origine naturelle prennent de plus en plus une place importante dans l'industrie pharmaceutique et agronomique. En effet, un certain nombre de produits chimiques issus de la synthèse organique nécessite une pharmacovigilance en raison de leurs effets indésirables. Les stratégies de recherche de substances naturelles actives à partir de plantes sont souvent basées sur des approches ethnobotaniques, mettant en avant l'utilisation de ces plantes en médecine traditionnelle par les populations locales. Mais les plantes médicinales ne représentent pas l'unique réservoir en molécules potentiellement actives. De nouvelles approches ont fait leur preuve, notamment, la prise en compte de l'écosystème dans lequel se développent les espèces végétales. En effet, l'exposition aux contraintes environnementales stimule, chez certains types de plantes, des réponses d'adaptation parmi lesquelles l'accumulation de molécules issues du métabolisme secondaire, qui se sont avérés actives contre différentes pathologies végétales et humaines.

Cette caractéristique est bien illustrée chez les plantes halophytes et xérophytes. Ce sont des végétaux qui se développent de manière optimale dans des conditions abiotiques extrêmes. Dans bien des cas, leurs vertus sont corrélées à leur capacité à tolérer le stress oxydatif liée à une accumulation excessive d'oxydants qui vient altérer le développement de la plante. Ces plantes développent ainsi un système antioxydant performant, souvent corrélé à une

grande biodisponibilité en polyphénols (Ksouri *et al.,* 2009 ; Ksouri *et al.,* 2012). Ces composés sont largement connus pour leur potentiel antioxydant, mais également pour leur pouvoir antimicrobien qui couvre un large éventail de pathogènes qui touchent la santé humaine et celle du végétal.

Les molécules aux propriétés antimicrobiennes peuvent être soit accumulées de manière constitutive, on parle alors de phytoanticipines, ou être synthétisées *de novo* lors de l'interaction avec l'agent pathogène, et sont alors nommées, phytoalexines (Macheix et *al*., 2005). Certaines halophytes se trouvent alors dotées d'un pouvoir antifongique qui peut être exploité pour protéger des cultures contre les attaques de pathogènes. Ceci est illustré chez une halophyte, *Cakile maritima* (Brassicacées) qui a montré des activités antifongiques contre des pathogènes de cultures (Sellam *et al.,* 2007). L'étendue des vertus antimicrobiennes des halophytes et des xérophytes inclut un large panel de pathogènes qui touchent la santé humaine. A titre d'exemple, l'extrait d'une xérophyte, *Cirsium tenoreanum* (Asteracées) possède une activité antibactérienne sur différentes souches bactériennes humaines, qui se trouve liée à la présence majoritaire de polyphénols (Loizzo *et al.,* 2009). Egalement, l'extrait d'une halophyte, *Plantago major* (Plantaginaceae), riche en polyphénols, s'est montré actif contre une série de virus (virus de l'herpès simplex et adenovirus) (Chiang *et al.*, 2002).

Face à l'émergence du phénomène de résistance aux traitements actuels, que ce soit en santé humaine, ou dans le secteur agricole, des stratégies sont désormais mises en place vers un renouvellement des biomolécules d'origine synthétique. A l'instar de certains micro-organismes tels que *Penicillium* ou *Streptomyces* qui ont servi de source d'antimicrobiens, les plantes halophytes et xérophytes sont à intégrer dans les nouvelles stratégies de recherche.

Dans le cadre de la valorisation des ressources végétales natives des biotopes salins et arides de la Tunisie dans les domaines pharmaceutique et agricole, un travail de criblage a donc été réalisé pour explorer la composition chimique et les activités biologiques de plantes halophytes et xérophytes tunisiennes. Il s'agit de 3 xérophytes : *Atractylis serratuloides* (Cass.) DC. (Asteracées), *Cirsium scabrum* (Poir.) Bonnet & Barratte (Asteracées), *Scabiosa maritima* L. (Caprifoliacées) ; et de 5 halophytes : *Limonium virgatum* (Willd.) Fourr. (Plumbaginacées), *Juncus maritimus* Lam. (Juncacées), *Silene succulenta* Forssk. (Caryophyllacées), *Atriplex tatarica* L. (Amaranthacées) et *Aeluropus littoralis* (Gouan) Parl. (Poacées).

Ce criblage a été élaboré de manière à analyser, dans un premier temps, les effets biologiques de ces plantes sur la santé santé humaine. Le contenu des plantes sélectionnées en

polyphénols a d'abord été analysé, puis des tests d'activités biologiques ont été mis en place pour évaluer leurs activités antiradicalaire, antibactérienne (sur 35 souches Gram + et -, et une levure) et antivirale (virus de l'hépatite C). La cytotoxicité de ces plantes a également été évaluée sur une lignée cancéreuse de macrophages dérivés d'un réticulosarcome de souris, J774, ainsi que sur une lignée non-cancéreuse, WI-38.

Dans un second temps, le criblage a concerné les effets biologiques des plantes étudiées en santé du végétal, en particulier sur l'agent causal le plus fréquent de la septoriose du blé (*Zymoseptoria tritici*). Pour cette étude, une exploration de l'effet des conditions édaphiques et physiologiques sur les propriétés antifongiques de *J. maritimus* a été initiée.

Ce criblage vise à révéler de nouvelles ressources en molécules bioactives. Nous avons donc, suite au criblage, ciblé les plantes les plus actives de manière à déterminer les composés à l'origine des activités biologiques. Pour cela, différentes stratégies de fractionnement bioguidé ont été mises en œuvre. Certaines molécules ont été purifiées et isolées par différentes techniques chromatographiques, puis identifiées par différentes techniques spectroscopiques. L'activité biologique de ces molécules a ensuite été évaluée et pour certaines d'entre elles, des études ont été mises en place pour comprendre leur mécanisme d'action.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les plantes extrêmophiles réservoirs de biomolécules

Il s'agit de végétaux qui se développent de manière optimale dans des conditions abiotiques extrêmes, au sein desquelles d'autres végétaux ne peuvent subsister. Ce sont des plantes qui, de par la nature spécialement sévère de leur milieu, ont subi une forte pression de sélection qui s'est traduite par leur capacité d'adaptation.

On distingue les halophytes, plantes tolérantes à la salinité, des xérophytes qui sont plutôt tolérantes aux conditions de sécheresse. Bien que tolérantes à des conditions abiotiques différentes, leur mécanisme de réponses à ces contraintes se rejoignent dans la mesure où la contrainte saline se traduit chez la plante par une situation de déficit en eau sur le plan physiologique.

I.1. Les plantes xérophytes

Les xérophytes peuplent les biotopes secs ou arides correspondant à un manque d'eau ou à sa faible disponibilité, notamment les zones à pluviosité réduite et les zones arides et sahariennes. Leurs capacités à subsister à de telles conditions est régie par deux stratégies adaptatives, la limitation des pertes d'eau ou le stockage de l'eau. Les xérophytes qui sont capables de limiter les pertes d'eau sont dites sclérophytes (laurier-rose ; olivier ; ect.). Ce sont des plantes coriaces caractérisées par un épiderme à cuticule épaisse qui permet de limiter la transpiration (Vartanian *et al.,* 1984). Une autre forme de limitation des pertes d'eau se traduit par différents dispositifs de protection des stomates (stomates dans des cryptes pilifères, tissu bulliforme permettant l'enroulement de la feuille, poils gardant une atmosphère humide...). Les malacophytes sont des plantes succulentes caractérisées par un parenchyme aquifère à cellules hypertrophiées et à mucilages qui leur confère la capacité de rétention de l'eau (Aloès, Liliacées ; *Mesembryanthemum*, Aizoacées ; ect.) (Vartanian *et al.,* 1984).

I.2. Les halophytes

Les halophytes couvrent les sols salins, y compris les régions côtières, les marais et les sebkhas (bassin occupant le fond d'une dépression à forte salinité). La contrainte saline induit des changements au niveau du statut hydrique de la plante, réduit le contenu relatif en eau des feuilles, diminue la transpiration et l'absorption hydrique par les racines, d'où une convergence des mécanismes d'adaptation avec ceux des xérophytes. On retrouve donc des réponses au stress salin par la réduction des surfaces foliaires permettant la diminution des pertes d'eau, mais aussi des mécanismes de stockage de l'eau grâce à la succulence caulinaire

et foliaire (parenchyme aquifère). Il existe aussi d'autres types de mécanisme, notamment par des glandes excrétrices de sel au niveau des feuilles (Tamaris, Tamaricacées) ou encore par un développement important du parenchyme palissadique (Atriplex, Chénopodiacées ; Criste-marine, Apiacées) (Vartanian *et al.*, 1984).

I.3. Le système antioxydant des halophytes et des xérophytes, une forme d'adaptation performante

La capacité d'adaptation des xérophytes et des halophytes ne se restreint pas aux formes anatomiques ; elle implique une large gamme de mécanismes physiologiques et biochimiques. Sur le plan biochimique, les réponses aux stress hydriques et salins, incluent l'induction de processus de détoxification des espèces oxygénées réactives.

En effet, les conditions contraignantes de l'environnement des végétaux renforcent le pool des plantes en espèces oxygénées réactives (EOR) induisant une situation de stress oxydatif. Cette situation se traduit par une rupture d'un équilibre existant entre les « antioxydants » et les « oxydants » entraînant de multiples dégâts comme l'oxydation des bases de l'ADN ou la modification de la fluidité membranaire, dont les conséquences sont néfastes pour l'intégrité de la cellule (Demidchik, 2015). Ainsi, ces conditions imposent un grand défi pour les végétaux qui ne sont pas natives des biotopes arides et salins. Chez ces végétaux, l'adaptation se traduit, en réponse au stress oxydatif, par des réorientations métaboliques vers la constitution d'une certaine capacité antioxydante déterminant une résistance inachevée pouvant aboutir à la sénescence de l'individu. En contre partie, les halophytes et les xérophytes ont acquis au cours de l'évolution et sous la pression de sélection de l'environnement des mécanismes adaptées au stress oxydatif. Ils se trouvent équipés par un arsenal antioxydant performant leur procurant une maîtrise de l'équilibre oxydatif, et donc la possibilité de se développer, d'une manière optimale, dans les biotopes salins et arides.

I.4. Les halophytes et les xérophytes, sources riches en composés phénoliques

Le système antioxydant des halophytes et des xérophytes met en œuvre différentes lignes de défense antioxydantes. Celles-ci comprennent des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques qui contrôlent les niveaux des oxydants et réparent les dommages oxydatifs cellulaires. La composante non enzymatique est représentée par les antioxydants de faible

poids moléculaire qui sont connus par leur rôle de ″piégeurs de radicaux libres″ tels que les vitamines C et E, les terpènes et les phénols (Matkowski, 2008). Différentes études qui ont exploré le pouvoir antioxydant des halophytes et des xérophytes se sont focalisées sur des composés largement connus pour leur pouvoir antioxydant, les polyphénols, révélant qu'ils occupent une position déterminante dans la composante non enzymatique du système antioxydant des halophytes et des xérophytes (Falleh *et al.*, 2008 ; Falleh *et al.*, 2009 ; Ksouri *et al.*, 2009 ; Ksouri *et al.*, 2012).

En effet, les stress hydriques et salins affectent négativement les contenus en polyphénols dans les tissus des végétaux non tolérants à la salinité et à la sécheresse, qui se trouve également comme étant l'une des causes de la vulnérabilité de leur système antioxydant. La diminution des composés phénoliques prend origine de la perturbation des principaux processus de l'activité vitale de la plante suite à un choc hydrique ou salin (Stocker, 1961). La capacité photosynthétique des plantes se voit toujours diminuée dans ces conditions (Maximov, 1931), de ce fait, les produits initiaux de la biosynthèse des polyphénols pourraient faire défaut. La baisse de la transpiration et la fermeture des stomates sont aussi observées. Ils sont suivis d'une augmentation de la température au niveau des feuilles (Zeltich, 1967) qui pourrait être une cause de la diminution des taux de polyphénols. Les contraintes de salinité et de sécheresse peuvent également engendrer un choc osmotique (Kursanov, 1952). Dans ce cas, le principal système énergétique des plantes cesse de fonctionner pendant une période prolongée. Ce qui, à son tour, entraîne inévitablement un ralentissement des processus synthétisants, et parmi eux, très vraisemblablement, ceux impliqués dans la formation des noyaux aromatiques.

D'autre part, les situations de stress entraînent des modifications physiques des membranes chloroplastiques ou bien leur destruction, provoquant la libération dans le cytoplasme de certaines enzymes telles que les hydrolases et les oxydases contenues initialement dans les organites cellulaires (Stocker, 1961). La disparition de la compartimentation faciliterait, soit la dégradation des molécules phénoliques, par la mise en contact avec des enzymes, soit leur migration vers d'autres organes.

L'ensemble de ces phénomènes sont observées à une très faible échelle chez les halophytes et les xérophytes. A titre d'exemple, une xérophyte, *Gossypium anomalum* (Malvacées) soumise à un choc hydrique, n'a montré qu'une très faible diminution de son contenu en polyphénols ; alors que d'autres espèces de *Gossypium* qui ne sont pas résistantes à la sécheresse ont montré une baisse importante en polyphénols (Brzozowska et Hanower, 1976). Pour certaines halophytes, l'accumulation en composés phénoliques est stimulée dans des conditions de

salinité accentuées. L'exemple de *Anethum graveolens* cultivée dans un milieu à forte salinité, s'est montré capable de quadripler le contenu phénolique dans les racines et de le tripler au niveau des pousses (Mehr *et al*.,2012). Cet enrichissement en polyphénols totaux est un mécanisme d'adaptation des plantes à la salinité car les composés phénoliques améliorent les effets ioniques de NaCl dans les tissus (Parida *et al*., 2004).

II. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires qui constituent un des groupes le plus représenté et largement distribué dans le monde végétal avec plus de 8000 structures phénoliques. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction: éther, ester, hétéroside (Bruneton, 2015 ; Šaponjac *et al.*, 2016).

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies de biosynthèse:

- La voie des phénylpropanoïdes (C6-C3) ou de l'acide shikimique qui conduit à la synthèse de certains acides aminés aromatiques comme la L-phénylalanine et/ou la L-tyrosine, puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs dérivés comme les coumarines.

- La voie des flavonoïdes, combinant la voie des phénylpropanoïdes et celle de l'acide acétique conduisant aux polyacétates. Les acides benzoïques, composés en C6-C1, sont issus de la dégradation oxydante des acides cinnamiques ou *p*-hydroxy-cinnamiques ce qui conduit à la formation d'acides hydroxybenzoïques. L'élaboration du squelette flavonoïde en C6-C3-C6 est effectuée par la chalcone synthase. Pour que cette enzyme soit fonctionnelle, il faut que l'acide *p*-coumarique soit activé sous la forme d'acide *p*-coumarique-Coenzyme A par une CoA-ligase non spécifique. Le précurseur ainsi activé pourra réagir avec trois molécules de malonyl-CoA. Par la suite, la cyclisation du triacétate s'effectue selon la réaction de Claisen et conduit à la formation d'une chalcone, la 4,2′,4′,6′-tetrahydroxychalcone (Bruneton, 2015). Une cyclisation conduira à l'obtention du noyau flavone, intermédiaire de la synthèse des flavonoïdes, des tanins condensés et des anthocyanes (figure 1).

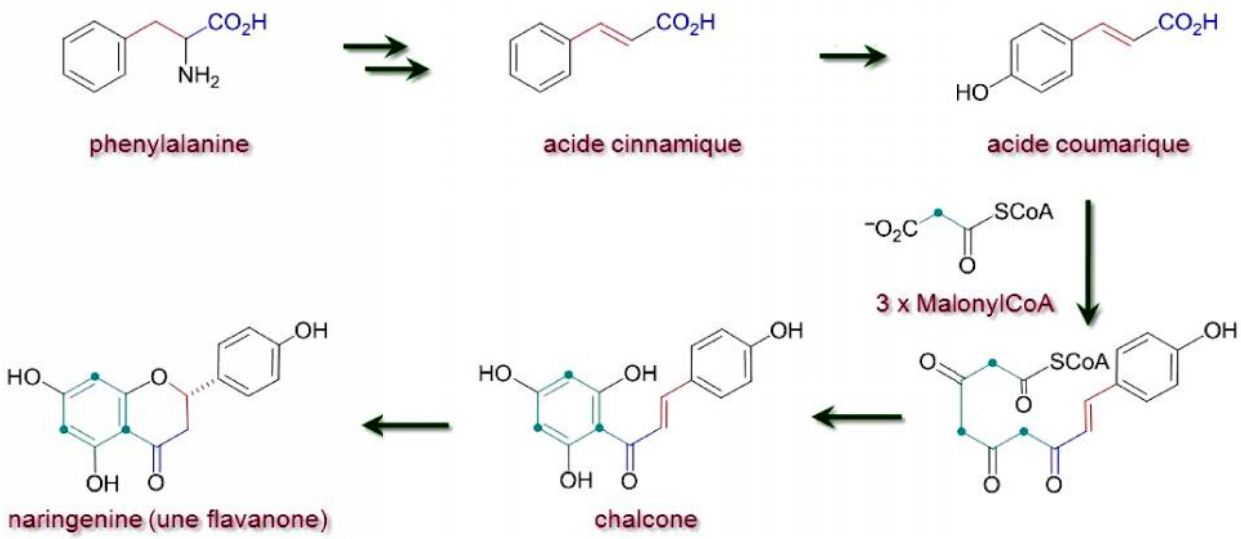


Figure 1. Voie de biosynthèse simplifiée des flavonoïdes

Il existe donc différentes classes de polyphénols, on y trouve les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbénoïdes et les tanins.

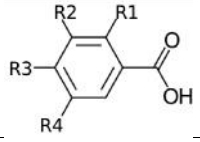
II.1. Les acides phénoliques

Un acide-phénol (ou acide phénolique) est un composé organique possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (Ignat *et al*., 2011). Ils sont représentés par deux sous-classes, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques.

II.1.1. Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque

Ils dérivent de l'acide benzoïque et ont une structure de base de type C6-C1 (Ignat *et al*., 2011). Ces acides hydroxybenzoïques sont très communs, aussi bien sous forme libre que sous forme d'esters ou d'hétérosides (Bruneton, 2015). (Tableau 1).

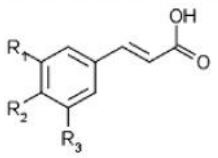
Tableau 1. Exemples de dérivés de l'acide benzoïque identifiés chez des plantes halophytes (Ksouri *et al*., 2012)

Squelette	Composé	R_1	R_2	R_3	R_4
	Acide vanillique	H	OCH_3	OH	H
	Acide gallique	H	OH	OH	OH

II.1.2. Les dérivés de l'acide hydroxycinnamique

Ils ont une structure de base de type C6-C3 (Ignat *et al*., 2011). Les fonctions phénols (OH) de ces dérivés peuvent aussi être méthylés (-O-CH_3) (Tableau 2).

Tableau 2. Exemples de dérivés de l'acide hydroxycinnamique rencontrés chez des plantes halophytes (Ksouri *et al*., 2012).

Squelette de base	Composé	R_1	R_2	R_3
	Acide *p*-coumarique	H	OH	H
	Acide férulique	OCH_3	OH	H
	Acide caféique	OH	OH	H

II.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux. Ils interviennent aussi dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes (Bruneton, 2015). Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. On dénombre près de 6500 flavonoïdes répartis en 12 classes (Stöckigt *et al*., 2002) et leur nombre ne cesse d'accroitre. Par définition, les flavonoïdes sont des composés qui ont en commun la structure en C6-C3-C6 du diphénylpropane (Figure 2), les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C (De Rijke *et al*., 2006).

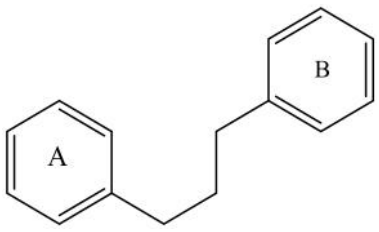


Figure 2. Structure de base des flavonoïdes

On peut distinguer dans les flavonoïdes *lato sensus*, les flavonoïdes (*stricto sensu*) qui regroupent les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les aurones et chalcones ; des dérivés flavaniques, isoflavonoïdes et anthocyanosides (figure 3).

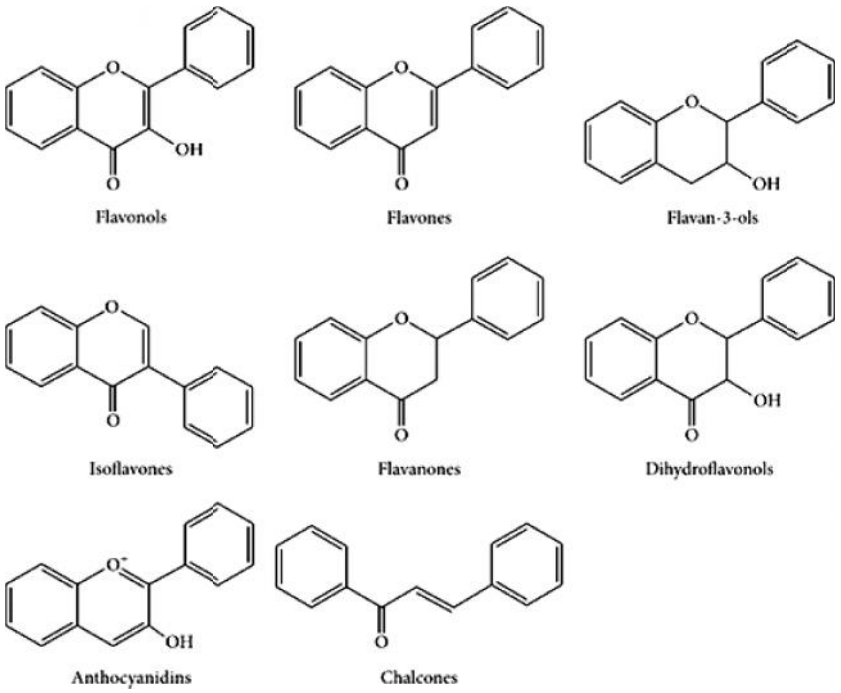


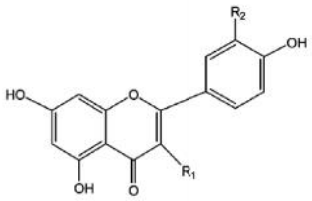
Figure 3. Structure de base des différentes classes des flavonoïdes

II.2.1. Les flavonoïdes au sens strict

Flavones, flavonols

Il s'agit des composés les plus nombreux de ce groupe. Dans ces molécules, le cycle A est dans 90% des cas substitué à deux hydroxyles phénoliques en C5 et en C7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou estérifiés, l'un d'entre eux peut être engagé dans une liaison hétérosidique (Bruneton, 2015). Le cycle B est substitué dans 80% des cas en C4', les substituants sont des groupes –OH ou $–OCH_3$ (Bruneton, 2015). Les flavones et les flavonols, ainsi que leurs hétérosides est universelle, mais certains schémas de substitution sont spécifiques à certaines familles. Le tableau 3 présente des exemples de flavones et de flavonols identifiés chez des plantes halophytes.

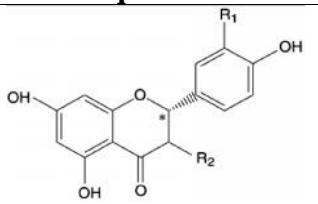
Tableau 3. Exemples de flavones et de flavonols identifiés chez certaines plantes halophytes (Ksouri *et al*., 2012)

Squelette	Composé	R_1	R_2
	Apigénine	H	H
	Lutéoline	H	OH
	Kaempférol	OH	H
	Quercétine	OH	OH

Flavanones et dihydroflavonols

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2,3 et par la présence de centres d'asymétrie (Bruneton, 2015). Chez les flavanones naturelles, le C2 est de configuration 2S, alors que les dihydroflavonols sont de configuration 2*R*, 3*R*, le phényle et l'hydroxyle étant en position *trans.* Le tableau 4 présente des exemples de flavanones identifiés chez des plantes halophytes.

Tableau 4. Exemples de flavanones identifiées chez des halophytes (Benaissa *et al.*, 2013)

Squelette	Composé	R_1	R_2
	Naringénine	H	H
	Eriodictyol	H	OH

Chalcones, aurones

Les chalcones dépourvues de l'hétérocycle central, sont caractérisés par la présence d'un chaînon tricarboné, cétonique, α,β-insaturé (Ferrazzano *et al.*, 2011). Si les substitutions sur le noyau A sont souvent identiques à celles des autres flavonoïdes, le noyau B est fréquemment monosubstitué ou non substitué (Bruneton, 2015). Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidènecoumaranone.

II.2.2. Les autres flavonoïdes

Anthocyanosides

Ce sont les pigments les plus répandus chez les plantes vasculaires (Castañeda-Ovando *et al*., 2009). Ils sont responsables de la coloration rouge, rose, mauve, pourpre, bleue ou violette de la plupart des fleurs et des fruits (Wu *et al*., 2006). Leur structure de base est caractérisée par un noyau « flavylium » généralement glucosylé en position C3 ; les génines sont alors dits anthocyanidols et les hétérosides appelés anthocyanosides (Souquet *et al*., 2000). Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, et par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule (Castañeda-Ovando *et al*., 2009).

Dérivés flavaniques

Les flavan-3-ols peuvent avoir deux origines selon l'épimère en 3. Les (2S,3S)-flavan-3-ols (comme la (+)-catéchine) proviennent de la réduction d'un précurseur flavan-3,4-diol par une leucoanthocyanidol réductase, alors que les (2R,3R)-flavan-3-ols proviennent de la réduction d'anthocyanidols par une anthocyanidol réductase. Ces flavan-3-ols représentent l'élément structural de base des tanins condensés (Bruneton, 2015).

Isoflavonoïdes

Ces composés sont moins répandus taxonomiquement que les précédants et se retrouvent principalement chez les Fabacées où ils sont très actifs en tant que phytoalexines synthétisés par exemple en réponse à une attaque par un pathogène (Ferrazzano *et al*., 2011). Cette spécificité est probablement due à la présence dans cette famille de l'enzyme responsable du réarrangement du 2-phénylchromone (flavone) au 3-phénylchromone (isoflavone) (Bruneton, 2015). Parmi tous les isoflavonoïdes répertoriés dans le règne végétal, la catégorie la plus largement représentée est celle des isoflavones non glycosylées. Les isoflavones glycosylées quant à elles, existent mais sont plus rares (*O*-glycosylées et exceptionnellement *C*-glycosylées).

II.3. Les stilbénoïdes

Cette nomination souligne la parenté biogénétique avec les flavonoïdes. Les stilbénoïdes regroupent les composés qui possèdent deux noyaux benzéniques séparés par un pont éthane ou éthène (bibenzyls et stilbènes), ainsi que les produits qui leur sont biosynthétiquement rattachés (phénanthrènes, 9,10-dihydrophénanthrènes…) (figure 4) (Bruneton 2008).

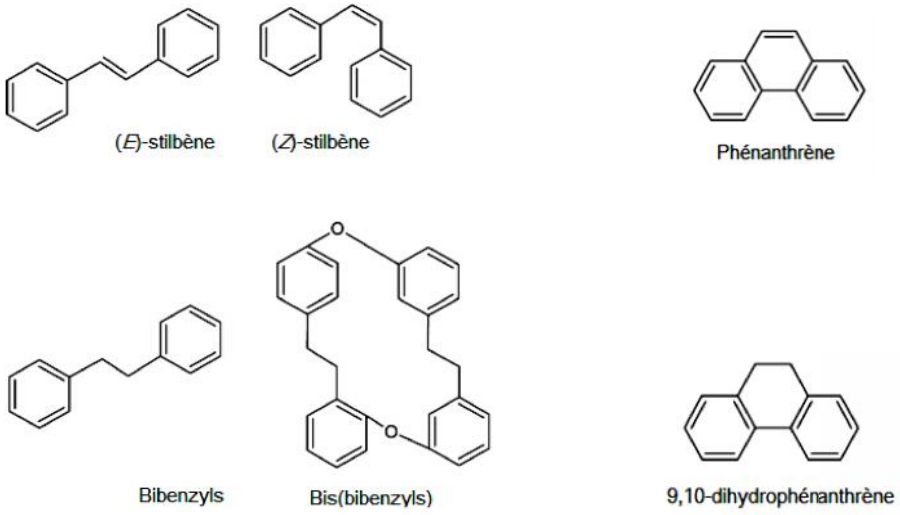


Figure 4. Structures de base de stilbénoïdes

II.3.1. Les stilbènes et les bis(bibenzyls)

Les stilbènes ont une structure en C6-C2-C6 : deux cycles benzéniques sont reliés par deux carbones, eux-mêmes unis par une double liaison. Ils existent généralement sous la forme (*trans*-1,2-diphényléthylène (*E*-Stilbène). Ils peuvent être libres ou hétérosidiques, parfois polymériques. Ils sont présents dans de nombreuses familles de végétaux supérieurs (la vigne, l'arachide…). Les bis(bibenzyls), rares chez les végétaux, sont caractéristiques des Hépatiques (Bruneton, 2008).

II.3.2. Les phénanthrènes

Les phénanthrènes sont formés par trois cycles benzéniques. Ils existent sous forme, monomérique, dimérique et trimérique ; plus de 200 structures sont caractérisées. Ils sont surtout présents dans une cinquantaine d'espèces d'Orchidacées (Bruneton, 2008). La figure 5 présente des exemples de dérivés phénanthréniques identifiés chez des plantes halophytes.

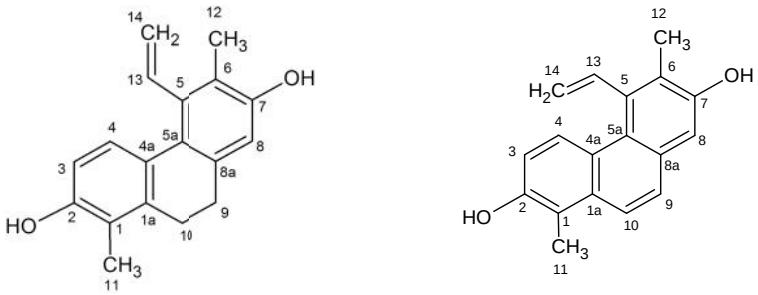


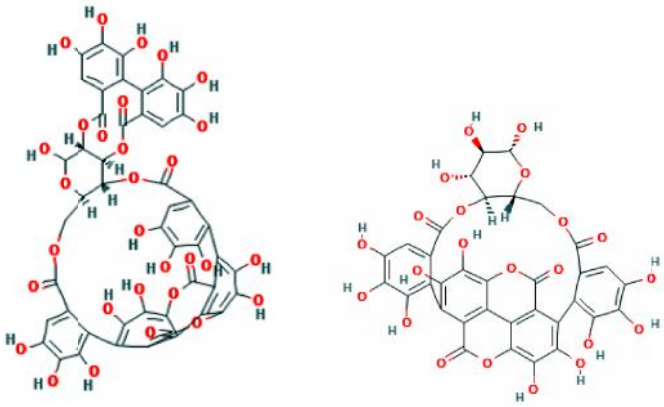
Figure 5. Exemples de dérivés phénanthréniques chez des halophytes (Juncus) (El-Shamy *et al.*, 2015)

II.4. Les tanins

Les tanins représentent une classe très importante de polyphénols localisés dans les vacuoles (Aguilera-Carbo *et al.*, 2008). Ce sont des composés phénoliques ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 Da et qui présentent, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (Fogliani, 2002). Sur le plan structural, on distingue les tanins hydrolysables, esters d'acide phénolique, des tanins condensés plutôt des polymères de polyhydroxyflavan-3-ols (Fogliani, 2002).

II.4.1. Les tanins galliques ou hydrolysables

Ce sont des esters de l'acide gallique ou de ses dérivés, en particulier l'acide ellagique, associés à un polyol (habituellement le glycose) (Clifford, 2000). Ils sont divisés en ellagitanins et en gallotanins. Ces tanins subissent facilement une hydrolyse acide et basique, ils s'hydrolysent aussi sous l'action enzymatique (Conrad *et al*., 1998). La figure 6 présente des exemples d'ellagitanins chez les halophytes.



Punicalagine **Punicaline**

Figure 6. Exemples d'ellagitanins chez une espèce halophyte (*Terminalia catappa* (Combretacées)) (Ksouri *et al*., 2012).

II.4.2. Les tanins condensés

Appelés aussi proanthocyanidines, les tanins condensés sont des polyphénols de masse molaire élevée. Ils résultent de la polymérisation autooxydative ou enzymatique des unités de flavan-3,4-diols liées majoritairement par les liaisons C4-C8 (parfois C4-C6) des unités adjacentes, et se nomment ainsi proanthocyanidines de type B. Lorsque la condensation se produit entre les unités adjacentes par la liaison C4-C8 et par une liaison d'éther additionnelle entre C2 et C7, les proanthocyanidines sont dits de type A (Wollgast *et al*., 2000).

III. La richesse des plantes halophytes et xérophytes en polyphénols leur procurent diverses vertus antimicrobiennes

Les plantes halophytes et xérophytes présentent une grande biodisponibilité en polyphénols, qui peut être considérée, en soit, comme une forme d'adaptation au stress oxydatif. Ceci dans la mesure où ce stress se trouve être responsable de la diminution des polyphénols chez les végétaux non tolérants à la salinité et à la sécheresse comme conséquence de la vulnérabilité de leur système antioxydant.

Les composés phénoliques sont largement connus pour leur pouvoir antioxydant. Celui-ci réside dans l'élément structural fondamental qui les caractérise, soit la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction: éther, ester, hétéroside (Bruneton, 2008; Šaponjac et *al*., 2016). Cette particularité structurale donne à la fonction phénol un caractère plus acide que les autres groupements alcools : elle perd facilement un proton pour former l'ion phénoxy. La perte d'un hydrogène engendre la formation d'un radical fortement stabilisé par mésomérie. C'est cette réactivité chimique qui confère aux composés phénoliques leur caractère antioxydant (Naczka et Shahidi, 2004).

Les sites et le nombre des groupements hydroxyles sur les groupes phénoliques sont également supposés être reliés à leur toxicité envers les microorganismes. En effet, le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité (Cowan, 1999). Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés et plus ils sont inhibiteurs des microorganismes (Scalbert, 2005). Les polyphénols sont en effet dotés d'activités antimicrobiennes. La diversité structurale existante au sein des polyphénols s'accompagne par des différences en terme d'activités antimicrobiennes qui couvre un large panel de pathogènes. La capacité que procurent les composés phénoliques aux plantes halophytes et xérophytes pour résister aux agressions de l'environnement se trouvent donc impliquée dans d'autres applications, notamment contre des pathogènes de plantes cultivées, et même des pathogènes qui touchent la santé humaine.

III.1. Applications dans la lutte biologique contre les pathogènes des plantes cultivées

III.1.1. Les polyphénols offrent aux halophytes et aux xérophytes un pouvoir antifongique prometteur sur les pathogènes des cultures

Les polyphénols, constituants naturels des défenses du végétal

Les polyphénols sont des constituants des défenses naturelles des végétaux contre l'attaque des pathogènes. Ils sont impliqués dans différentes lignes de défense. Ils interviennent comme des phytoanticipines suivant des barrières physiques, mais aussi par leur présence dans les tissus végétaux avant l'infection. Les phytoanticipines peuvent inclure des acides phénoliques, des flavonols, des isoflavones) (Lattanzio *et al.,* 2001). Les polyphénols interviennent également par leur rôle de phytoalexines, qui sont synthétisés *de novo* lors de l'infection. Ceux-ci comprennent les isoflavonoïdes, les flavans, les stilbènes et les phénanthrènes (Lattanzio *et al.,* 2001). Différents exemples de phytoanticipines et de phytoalexines ont été trouvés chez les plantes cultivées. Pour les phytoanticipines, des acides féruliques, p-coumariques et syringique sont généralement trouvés dans les cultivars de blé (Vidhyasekaran, 2008). Pour les phytoalexines, peu sont en relation avec la résistance variétale (Corbaz, 1990). L'exemple le plus connu est celui du resvératrol, un stilbène produit par la vigne en réponse à une attaque par un pathogène (*Botrytis cinerea*).

Les polyphénols, dans la lutte biologique des pathogènes de cultures

La performance du système de défense des cultures qui est perpétuellement confronté aux attaques des pathogènes, peut devenir insuffisante face à certaines invasions, notamment le cas des variétés sensibles d'une même culture, ou lorsque l'individu végétal se trouve fragilisé par les contraintes de l'environnement. Des solutions chimiques sont souvent déployées à grande échelle, offrant satisfaction à court terme, mais qui ont cumulé des dégâts au niveau du cultivar. La fortification du système de défense des cultures par des composés phénoliques s'est introduite dans la recherche de substances actives dans le domaine de la lutte biologique.
Certains acides phénoliques (l'acide chlorogénique, l'acide quinique, l'acide férulique, ect.) sont des inhibiteurs *in vitro* de différents agents pathogènes fongiques des cultures (Lattanzio *et al.,* 2001). Alors que d'autres (acide 2,5-dihydroxybenzoïque et l'acide 2,5-dimetoxybenzoïque) sont efficaces *in vivo* contre la germination des spores et la croissance mycélienne de champignons pathogènes de différentes cultures (*Botrytis cinerea, Sclerotinia sclerotiorum, Penicillium digitatum,* ect.) (Lattanzio *et al.,* 1996).

Les composés phénoliques semblent inhiber le développement de pathologies végétales par différents mécanismes impliquant l'inhibition des enzymes fongiques extracellulaires (cellulases, pectinases, laccase, xylanase, ect.), l'inhibition de la phosphorylation oxydante des champignons, la limitation des substrats utilisés par le pathogène, et l'activité antioxydante dans les tissus végétaux (Jersh *et al.*, 1989 ; MacRae *et al.*, 1984 ; Scalbert, 1991). Pour cette dernière, les plantes halophytes et de xérophytes se sont introduites comme des ressources en composés antimicrobiens.

Potentialités des halophytes et des xérophytes contre les pathogènes des cultures

Différents exemples de ces plantes ont montré une activité antifongique sur des pathogènes de plantes cultivées, notamment *Thellungiella salsuginea* (Brassicacées) (Pedras *et al.*, 2009) et *Cakile maritima* (Brassicacées) (Sellam *et al.*, 2007) qui ont montré des activités antifongiques sur divers pathogènes des Brassicacées (*Alternaria brassicicola*, *Leptosphaeria maculans*, *Rhizoctonia solani* et *Sclerotinia sclerotiorum*). Les phénanthrènes, connus pour leur rôle de phytoalexines antifongiques chez les Orchidées (Bruneton, 2015), sont retrouvés chez certaines halophytes, notamment chez les Juncacées. Il a été suggéré qu'un phénanthrène (le juncusol) de *Juncus roemerianus* régulerait les populations de *Bacillus* dans les marais (Chapatwala *et al.*, 1981). L'emploi des halophytes et des xérophytes dans la lutte contre des pathogènes qui touchent les plantes cultivées se voit d'être exploité, particulièrement dans le secteur du blé qui est placé en avant dans les stratégies d'amélioration de la production.

III.1.2. *Zymoseptoria tritici*, un des pathogènes menaçants des cultures de blé

Le blé est la culture la plus répandue au monde. Au sein de l'Union européenne, le blé est passé de la deuxième culture alimentaire la plus importante (après le riz) au statut de la céréale la plus importante (Fones et Gurr, 2015). Les parasites et les agents pathogènes constituent un défi sérieux et persistant pour l'industrie du blé. Parmi les agents pathogènes du blé, on trouve *Zymoseptoria tritici* (anamorphe : *Mycosphaerella graminicola*). Il s'agit de l'agent pathogène le plus fréquent de la septoriose du blé, induisant des pertes de rendement allant jusqu'à 50% (Ponomarenko *et al.*, 2011).

Présentation et cycle biologique de *Zymoseptoria tritici*

Z. tritici est un champignon parasite Ascomycète. Il est de type hémibiotrophe impliquant une sénescence des tissus hôtes qui commence avant la phase reproductive de l'agent pathogène.

La reproduction de *Z. tritici* est de nature sexuée ou asexuée selon les conditions environnementales. La reproduction sexuée implique la production d'ascospores qui constituent la source principale d'inoculum primaire pour initier la maladie de la septoriose. Les ascospores sont disséminés par le vent sur de longues distances permettant la survie du champignon en l'absence de plante hôte (Sanderson et Hampton, 1978 ; Shaw et Royle, 1989 ; Suffert *et al.*, 2011).

La reproduction asexuée implique la production de pycnidiospores, qui se déroule majoritairement durant la phase épidémique de la maladie (Fitt *et al.*, 1989 ; Saint-Jean *et al.*, 2004) (figure 7). Au contact de la feuille, une spore va germer dans les conditions environnementales favorables (températures et humidité) (Magboul *et al.*, 1992). Le tube germinatif pénètre dans les tissus hôtes *via* les ostioles des stomates (Duncan et Howard, 2000). Après l'infection initiale, une période de latence apparait, durant laquelle il y a une progression peu destructrice des hyphes mycéliens dans les espaces intercellulaires. Le développement du champignon s'intensifie ensuite lors de la mise en place des appareils reproducteurs (pycnides), et conduit à la destruction des parois cellulaires (phase nécrotrophe) (Lovell *et al.*, 2004). Dans une troisième étape, la sporulation, les spores sont produites dans les pycnides (pycnidiospores). Elles sont couvertes d'une gelée protectrice (le cirrhe) constituée de sucres et de protéines hydrophiles (Fournet, 1969). En conditions de forte humidité, ce mucilage sporifère est exsudé et se dissout dans le film d'eau tapissant la feuille, permettant ainsi la dissémination des spores sur la surface foliaire (Fitt *et al.*, 1989). Au final, les pycnidiospores se dispersent *via* l'éclaboussement de gouttes de pluie.

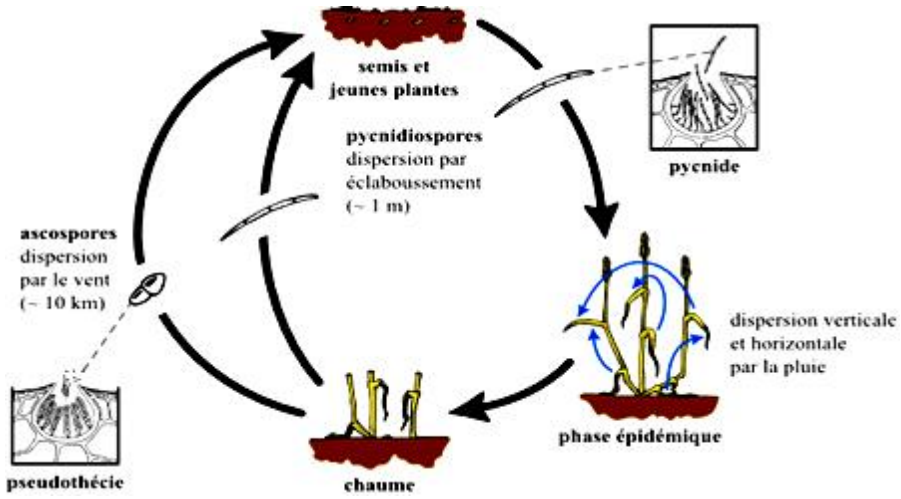


Figure 7. Cycle biologique simplifié de *Mycosphaerella graminicola* (Agrios, 2005)

Effets sur les cultures de blé

Au niveau des symptômes macroscopiques, la septoriose engendrée par *Z. tritici* se manifeste, après la période de latence, par l'apparition de taches (ou lésions) sur les feuilles. Lorsque les lésions sont arrivées à maturité, les fructifications du champignon (pycnides et/ou pseudothécies) deviennent visibles sous la forme de petits points noirs à la surface des feuilles (Gigot, 2014) (figure 8).

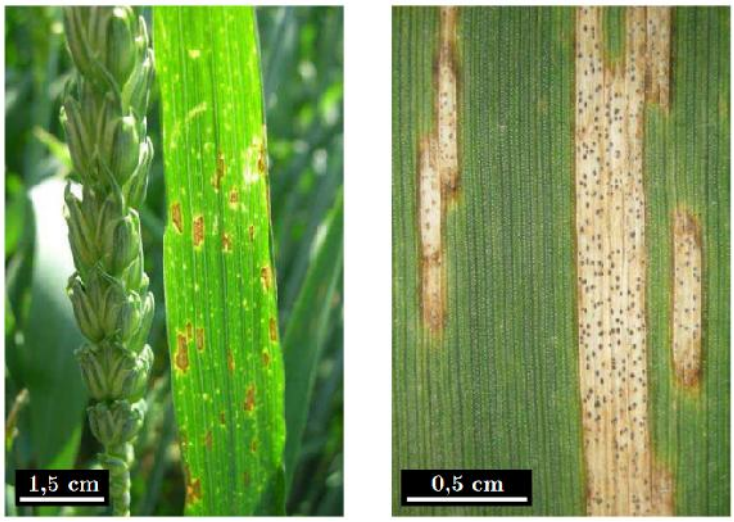


Figure 8. Lésions sporulantes à la surface d'une feuille de blé (Gigot, 2014)

Le développement de la maladie se traduit par la coalescence des lésions et l'accélération de la sénescence des tissus infectés (Robert, 2003). L'affection des dernières feuilles sous l'épi, impliquées dans le remplissage des grains se traduit par une grande baisse de rendement (Thomas *et al.*, 1989). Dans les cas de fortes incidences, les pertes de rendement peuvent aller jusqu'à 50% (Ponomarenko *et al.*, 2011).

Les moyens de contrôle actuels et le problème de résistance de *Z. tritici*

Les moyens de contrôle de *Zymoseptoria tritici* sont essentiellement chimiques. Le traitement repose sur l'emploi de fongicides synthétiques classiques, tels que les inhibiteurs de la 14α-déméthylase (IDM) et les inhibiteurs de la succinate déhydrogénase (SDHI). Les IDM appartiennent à la classe des inhibiteurs des stérols membranaires (IBS). Certaines familles chimiques des IDM ont été retirées du marché. La famille chimique comprenant le plus grand nombre de molécules actives est celle des triazoles ; on ne compte pas moins de 18 substances. Les fongicides triazolés inhibent la biosynthèse des stérols, constituants essentiels des champignons, en bloquant la C_{14} déméthylase (Rocher., 2004). Les inhibiteurs de la succinate déhydrogénase (SDHI) sont des molécules inhibitrices de la respiration

mitochondriale. Ils ont déclenché des phénomènes de résistance chez certains champignons (Rocher., 2004). Pour le traitement de la septoriose, ils sont souvent associés à des triazoles.
L'émergence des formes résistantes de *Z. tritici* est une réponse à une utilisation massive des fongicides. En effet, il y a mobilisation jusqu'à 70% de l'usage annuel des fongicides en Europe. La famille des triazoles se voit aussi touchée par ce phénomène. La sensibilité de la septoriose aux triazoles, bien que plus progressive en comparaison avec l'émergence de la résistance aux SDHI, se trouve en évolution continue (Han., 2014).

Un besoin croissant en la réintroduction des moyens de lutte biologique

Sous la pression conjuguée d'une réglementation plus restreinte et des actions en faveur de l'environnement, une stratégie raisonnée moins dépendante des fongicides synthétiques est en train de se développer. Au cours de la dernière décennie, de nombreux pesticides ont été retirés du marché. Les changements dans les processus de réglementation au sein de l'Union Européenne devraient également réduire la disponibilité de différents fongicides sur le marché (Jess *et al.*, 2014). L'investissement dans des variétés de blé résistantes se présente comme étant l'alternative la plus simple. Cependant, cette résistance n'est que partielle, et des pertes de rendement, bien que moindres, subsistent. La réintroduction des fongicides d'origine naturelle se voit de plus en plus comme étant une alternative prometteuse.
Les agents de contrôle biologique incluent des extraits et des composés provenant de plantes (Ravensberg, 2015). Certains fongicides commercialisés sont formulés avec des huiles essentielles, mais leurs modes d'action restent pour la majorité, inconnus (Dayan *et al.*, 2009). L'extrait de *Reynoutria sachalinensis* constitue l'ingrédient principal d'un fongicide commercialisé (Milsana®) qui est efficace contre un large éventail de maladies végétales. (Dayan *et al.*, 2009). Baysal-Gurel et Miller (2015) ont confirmé l'effet protecteur d'une nouvelle formulation de l'extrait de *R. sachalinensis* commercialisé sous le nom de Regalia® par Marrone Bio Innovations (Davis, CA, USA) sur la tomate produite sous serre contre l'oïdium.

Dans la lutte biologique contre la septoriose, seule la laminarine (Vaccipant®, Goëmar, France), un polysaccharide de faible poids moléculaire dérivé d'une algue *Laminaria digitata*, est enregistré en France comme inducteur de la résistance du blé à *Z. tritici*.

À l'heure actuelle, les biofongicides ne détiennent que 5% du marché mondial de la protection des cultures, mais ce segment de l'industrie devrait augmenter de 8,84% par an, atteignant plus de 7% de la protection totale des cultures d'ici 2025 (Olson, 2015). D'où l'intérêt de

rechercher des sources naturelles d'agents antifongiques efficaces, notamment chez les halophytes et les xérophytes.

III.2. Applications dans la santé humaine

III.2.1. Les halophytes et les xérophytes, des sources prometteuses en polyphénols anti-infectieux

L'organisme humain, constamment exposé à une multitude de microbes (bactéries, virus, ect.), possède un système complexe de défense qui lui permet de s'opposer à leurs invasions, et protéger ainsi l'intégrité des tissus. Lorsque l'infection est grave, le système de défense n'arrive plus à la maîtriser et il y a recours aux thérapies (antibiotiques, vaccin,…). Les microbes exposés aux thérapies sur une longue période ne peuvent que s'adapter et générer des résistants. Dès lors, et sous la pression des effets secondaires de certaines thérapies qui sont devenus non négligeables, des stratégies vers un renouvellement de l'arsenal des molécules anti-infectieux sont désormais envisagées pour faire face à ce problème de santé publique émergent. A l'instar de certains micro-organismes tel que le Penicillium ou Streptomyces qui ont servi de source d'antimicrobiens, les plantes halophytes et xérophytes de part leur richesse en polyphénols, sont à intégrer dans les nouvelles stratégies de recherche d'anti-infectieux.

<u>Le pouvoir antimicrobien des polyphénols couvre une large gamme de pathogènes humains</u>

Les composés phénoliques sont largement réputés pour leur pouvoir antimicrobien qui couvre un large éventail de pathogènes. A titre d'exemple, l'acide gallique et l'épigallocatéchine gallate sont capables d'inhiber plusieurs souches bactériennes et fongiques (*Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Candida albicans, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhi, Vibrio Cholerae Microsporum gypseum,* et *Helicobacter pylori*) (Chanwitheesuk *et al.,* 2007; Hatano et *al.,* 2008). L'acide gallique, possède également des activités contre le virus de l'herpès HSV-1 et le virus de la grippe PI (type3). D'autres polyphénols, notamment la génistéine, ainsi que d'autres flavonoïdes (quercétine, kaempférol, 3-méthylkaempférol et épigallocatechine gallate) sont actifs *in vitro* sur plusieurs souches virales, notamment sur le rétrovirus HIV responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (Andres *et al.,* 2009 ; Christina et *al.,* 2009).

Les mécanismes responsables de la toxicité des polyphénoles envers les microorganismes sont très complexes, probablement dues à la grande diversité structurale existante au sein des polyphénols. A titre d'exemple, les flavane-3-ols, les flavonols et les tannins ont reçu une grande attention pour leur large spectre et forte activité antimicrobienne, mais aussi pour leur capacité à intervenir sur un grand nombre de facteurs de virulence microbienne, y compris l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte et la neutralisation des toxines bactériennes, ainsi qu'à leur capacité d'établir une synergie avec certains antibiotiques (Daglia, 2011). Les flavonoïdes interviennent également à différents niveaux de l'infection virale. L'exemple de la génistéine qui peut intervenir en inhibant la PTK (Protéine kinase de l'entrée du virus), la phosphorylation de la glycoprotéine E et d'autres polypeptides viraux (inhibition de l'assemblage du virus), ou en inhibant l'expression de certains gènes viraux (Andres *et al.*, 2009).

Les potentialités antimicrobiennes des halophytes et des xérophytes au service de la santé humaine

Différentes études, qui ont exploré les potentialités antimicrobiennes des halophytes et des xérophytes sur des pathogènes de l'organisme humain, ont montré qu'elles sont liées à la présence majoritaire de composés phénoliques. Par exemple, différentes espèces d'halophytes (*Eryngium maritimum* (Apiacées), *Crithmum maritimum* (Apiacées) et *Cakile maritima* (Brassicacées)) au potentiel antimicrobien marqué sur différents types de pathogènes, possèdent une richesse en composés phénoliques (Meot-Duros et *al*., 2008).

Activités antibactériennes. L'activité des halophytes et des xérophytes sur des bactéries pathogènes est illustrée par différents exemples. L'extrait de *Tamarix gallica* (Tamaricées) dont les composés majoritaires sont des flavonoïdes (isoquercétine, catéchine, ect.) a montré une activité sur différentes souches bactériennes et fongiques (Ksouri *et al.*, 2009). D'autres flavonoïdes majoritairement présents dans *Cynara cardunculus* (Compositées) (épicatéchine, quercétrine, ect.) se trouvent liés à l'activité antibactérienne des feuilles de la plante contre plusieurs bactéries pathogènes (Falleh *et al.*, 2008). L'ensemble de ces travaux, ainsi que d'autres, ont introduit les halophytes et les xérophytes comme des sources prometteuses face au développement de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

Activités antivirales. Les halophytes et les xérophytes sont dotés d'activités antivirales sur différents types de virus. A titre d'exemple, *Plantago major* (Plantaginacées) riche en

flavonoïdes et en acides phénoliques, s'est montré actif contre une série de virus, à savoir le virus de l'herpès simplex (HSV-1, HSV-2) et les adenovirus (ADV-3, ADV-8, ADV-11). Deux acides phénols (acide ferulique et acide caféique) se trouvent principalement responsables de ces activités (Chiang *et al.*, 2002). Les halophytes ont également montré des effets sur les hépatites. Plusieurs halophytes de la famille des Rhizophoracées ont montré des activités prometteuses contre le virus de l'hépatite B (Premanathan *et al.*, 1999). A notre connaissance, il n'y a pas d'études qui ont exploré le potentiel antiviral de plantes halophytes et xérophytes contre le virus de l'hépatite C. D'une manière générale, certains flavonoïdes peuvent atténuer le pouvoir infectieux et/ou affecter la réplication intracellulaire de différents virus (Ghedira, 2005). Des inhibiteurs du virus de l'hépatite C peuvent donc être recherchés dans les halophytes et les xérophytes.

III.2.2. Le problème de résistance aux antibiotiques

Les antibiotiques

Les antibiotiques sont par définition, des produits microbiens, ou leurs dérivés, capables de neutraliser les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance (Prescott *et al.*, 1995). Leur action étant spécifique et dirigée contre les micro-organismes, ils ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes

Les antibiotiques sont en majorité d'origine naturelle. Le premier antibiotique identifié est la pénicilline (isolée à partir de *Penicillium notatum*), antibiotique à large spectre d'activité, qui appartient à la classe des β-lactames. Sa découverte a ouvert la voie à l'identification de nombreuses autres classes d'antibiotiques d'origine naturelle, incluant les phénylpropanoïdes, les tétracyclines, les aminoglycosides, les macrolides, les glycopeptides, les streptogramines et les β-lactames de deuxième génération. Par la suite, une troisième génération de β-lactames a été commercialisée (les carbapénèmes) (Toure, 2015).

Les antibiotiques peuvent aussi être d'origine synthétique ou semi-synthétique. Il existe seulement trois classes d'antibiotiques synthétiques. Les sulfamides, premiers antibiotiques utilisés cliniquement, les quinolones (ou fluoroquinolones) découverts lors de la synthèse de la chloroquine (Singh et Barett, 2006), et les oxazolidinones (conduit au développement du linézolide) qui constituent, avec les lipopeptides cycliques (daptomycine), l'une des rares classes d'antibiotiques mise sur le marché au cours de ces dix dernières années.

Activité des antibiotiques

L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action. Un antibiotique caractérisé par un spectre d'activité large agit sur des espèces bactériennes différentes. L'action des antibiotiques peut s'exercer sur des structures ou des mécanismes essentiels à la croissance ou à la survie des bactéries. Ainsi, ceux qui inhibent la croissance bactérienne sont qualifiés de « bactériostatiques » alors que ceux qui neutralisent les bactéries sont dits « bactéricides ».

Les principales cibles des antibiotiques sont la paroi cellulaire et les ribosomes bactériens. D'autres cibles sont impliquées dans les fonctions physiologiques ou métabolites, à savoir l'inhibition de la biosynthèse des acides nucléiques (ADN et ARN) et l'interférence avec les voies métaboliques de synthèse de l'ADN (Figure 9). Des interactions spécifiques avec les cibles bactériennes des antibiotiques sont également régies par la complexité des motifs structuraux et la grande variabilité des groupements fonctionnels. Cette spécificité se trouve engagée dans les processus de la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques (Toure, 2015).

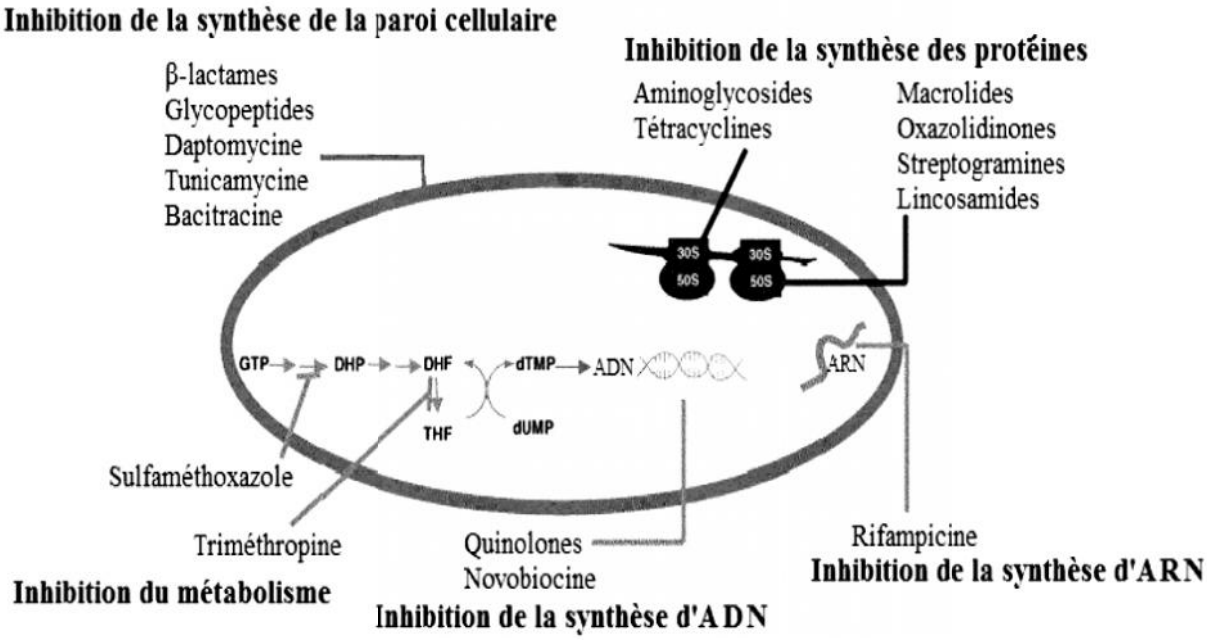


Figure 9 : Mode d'action des antibiotiques (Singh et Barrett, 2006).

La résistance aux antibiotiques

La sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques est due à l'usage généralisé des antibiotiques et à la forte adaptabilité des souches bactériennes. En effet, la confrontation à un antibiotique représente du point de vue des bactéries, un formidable stimulus d'évolution (Hamilton-Miller, 2004).

La résistance aux antibiotiques peut être « naturelle », et dans ce cas l'expression d'un caractère inné (particularités structurales de la paroi cellulaire ou l'absence de cible), partagé par toutes les souches d'une même espèce bactérienne (Toure, 2015), rend inappropriée l'utilisation de certains antibiotiques. A titre d'exemple, les bactéries du genre *Mycoplasma*, dépourvues de peptidoglycane (composant principal de la paroi des bactéries), présentent une résistance intrinsèque aux β-lactames, dont le mode d'action consiste en une inhibition de la synthèse du peptidoglycane (Normak et Normak, 2002).

La résistance à un antibiotique est aussi « acquise », observée lorsque certaines souches d'une même espèce bactérienne, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes. Cette résistance peut être acquise par mutation ou par transfert de gènes (Toure, 2015). Le phénomène de mutation est conditionné par une utilisation répétée des antibiotiques qui contribue, au sein d'une population bactérienne, à l'élimination des bactéries sensibles, induisant à la sélection de mutants résistants. La transmission d'éléments génétiques mobiles, comme les plasmides et les transposons, favorise également l'acquisition des résistances par les bactéries. Elle peut s'effectuer par transduction, conjugaison ou transformation. La dissémination des gènes de résistance peut s'effectuer au sein d'une même espèce mais aussi d'une espèce bactérienne à l'autre. Ainsi, les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la vancomycine (SARV) auraient acquis ce caractère suite au transfert plasmidique de l'opéron vanA, réalisé par conjugaison avec *Enterococcus faecalis* (Noble *et al.*, 1992 ; Alekshun et Levy, 2007).

Mécanismes biochimiques de résistance

Confrontées aux antibiotiques, les bactéries ont élaboré plusieurs stratégies. Les bactéries s'opposent à l'action des antibiotiques par des barrières qui limitent leurs accès. Toutes les bactéries Gram négatif ont une membrane externe qui doit être franchie avant d'atteindre la membrane cytoplasmique. Les barrières d'entrée peuvent aussi exister dans la membrane cytoplasmique. A titre d'exemple, des aminoglycosides (oxygénodépendants) sont inactifs dans l'environnement anaérobie de la membrane cytoplasmique (Rice *et al.*, 2003). Certaines bactéries agissent par la modification de l'antibiotique en synthétisant des enzymes

(pour la plupart des cas acquises) qui confèrent un niveau élevé de résistance aux antibiotiques contre lesquels ils sont actifs. De par la spécificité de certaines interactions entre l'antibiotique et la molécule cible, certaines bactéries résistent en modifiant la cible de l'antibiotique ; de faibles altérations de la cible peuvent avoir des effets importants sur la liaison de l'antibiotique. Le degré de résistance conférée par les modifications de cible est variable et dépend de la capacité de la cible mutée à accomplir ses fonctions. La modification des cibles concernent par exemple, l'altération des précurseurs de la paroi cellulaire conférant la résistance aux glycopeptides, les mécanismes de protection ribosomale conférant la résistance aux tétracyclines ou encore les mutations de l'ARN polymérase conférant la résistance à la rifampicine (Rice *et al*., 2003 ; Murray *et al.*, 2009).

Les systèmes d'efflux bactériens constituent une autre forme de résistance aux antibiotiques, par exportation active des drogues dans le milieu extracellulaire. Chez les bactéries à Gram positif, les systèmes d'efflux sont constitués par des pompes d'efflux (transporteurs membranaires), alors que chez les bactéries à Gram négatif, les systèmes d'efflux sont des complexes protéiques tripartites (pompe d'efflux, protéine périplasmique de jonction et porine). Les pompes d'efflux peuvent concerner une seule classe d'antibiotiques « drogue-spécifiques » (Markham et Neyfakh, 2001). Cependant, la plupart de ces transporteurs peuvent prendre en charge des composés de structures très différentes et contribuer ainsi, de manière significative, à la multi-résistance des bactéries vis-à-vis des antibiotiques (Poole, 2004).

<u>Les polyphénols des halophytes dans les stratégies de lutte contre la résistance bactérienne</u>

L'émergence du phénomène de résistance contre les principales classes d'antibiotiques, a conduit à l'avènement de l'ère post-antibiotique. La mise en place de stratégies de recherche de nouvelles molécules est devenue une nécessité. Etant donné la grande diversité des mécanismes de résistance adoptés par les bactéries, les champs d'investigation sont, sans doute larges. Toutefois, les stratégies peuvent se baser sur l'identification d'agents antibactériens, capables d'agir par de nouveaux mécanismes d'action (Tan et Darren, 2000; Schmidt, 2004; Falconner et Brown, 2009), ou encore sur l'identification de nouvelles cibles bactériennes, notamment en vue de développer des agents susceptibles d'inhiber les mécanismes de résistance, par exemple au niveau des systèmes d'efflux bactériens (Tan et Darren, 2000; Schmidt, 2004; Falconner et Brown, 2009). Les halophytes et xérophytes peuvent êtres introduits à ces programmes grâce à leur richesse en polyphénols. En effet, certains de ces composés peuvent agir suivant plusieurs mécanismes comme antibactériens,

mais aussi comme des inhibiteurs des mécanismes de résistances aux antibiotiques. Les flavonoïdes interviennent aussi comme inhibiteurs des pompes à efflux. La baicaléine, une trihydroxy flavone isolée des feuilles d'une halophyte *Thymus vulgaris* (Lamiacées), présente un intérêt particulier du fait de son aptitude à restaurer l'activité de plusieurs antibiotiques, dont la tétracycline, l'oxacilline, le cefmétazole et l'ampicilline, sur des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (SARMs) (Fujita *et al.*, 2005).

III.2.3. L'hépatite C, une maladie persistante dans le secteur de la santé publique

La maladie

L'hépatite C est une affection hépatique causée par le virus de l'hépatite C (VHC). Elle touche 2 à 3% de la population mondiale, soit 130 à 170 millions de personnes ; la prévalence étant différente selon les continents et les pays (Lavanchy, 2011). L'infection par le VHC va déclencher une maladie inflammatoire du foie, l'hépatite virale. Après infection par le virus, l'incubation dure 4 à 12 semaines. La première phase est dite aiguë, presque asymptomatique, qui évolue dans 80% des cas vers une hépatite C chronique. Dans ce cas, se développe une cirrhose (en 20 à 30 ans), voire, un carcinome hépatocellulaire (incidence de 3 à 5 % par an) (Calland, 2012a).

Le virus de l'Hépatite C

L'agent responsable, le virus de l'hépatite C (VHC) a été identifié en 1989. Les seuls hôtes du VHC sont l'Homme et le chimpanzé. C'est un virus sphérique de 60 nm de diamètre qui possède une nucléocapside et une enveloppe lipidique. Le VHC est un membre de la famille des Flaviviridés qui comprend 3 genres : les Hepacivirus, incluant les différents génotypes du VHC ; les Flavivirus, regroupant plusieurs virus responsables d'arboviroses, virus transmis à l'homme par un arthropode (virus de la fièvre jaune) ; et les Pestivirus, responsables de pathologies animales. Les virus de cette famille ont des caractéristiques communes comme l'organisation génomique et la stratégie de réplication (Payan, 2012).

Structure du génome, expression et fonction des protéines virales

Le génome du virus de l'hépatite C (VHC) est un ARN monocaténaire linéaire de polarité positive d'environ 9600 nucléotides, riche en cytosine et guanine. Il possède un seul cadre ouvert de lecture et code pour dix protéines virales : la protéine Core forme la nucléocapside virale, les glycoprotéines E1 et E2 forment l'enveloppe, la protéine NS1, NS2,

NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B sont des protéines non-structurales nécessaires pour la réplication et l'assemblage (Payan, 2012). Il est schématiquement divisé en trois régions distinctes de 5’ en 3’ (Trépo *et al*, 2006) (figure 10):

- La région 5’ non codante placée en amont du cadre ouvert. Elle porte les séquences les plus conservées qui interviennent dans la réplication du génome viral et la synthèse des protéines virales (Pineiro *et al.*, 2012).
- Le cadre ouvert de lecture est situé en aval de la région 5’ non codante. La traduction de cette partie, dans les cellules infectées, est à l’origine de la synthèse d’une polyprotéine, précurseur unique des protéines virales structurales et non structurales (Pineiro *et al.*, 2012).
- La région 3’ non codante est la dernière région du génome du VHC. Elle intervient dans la réplication virale, en particulier lors de la transcription virale, en fixant le complexe de polymérisation comprenant l’ARN polymérase (Pineiro *et al.*, 2012).

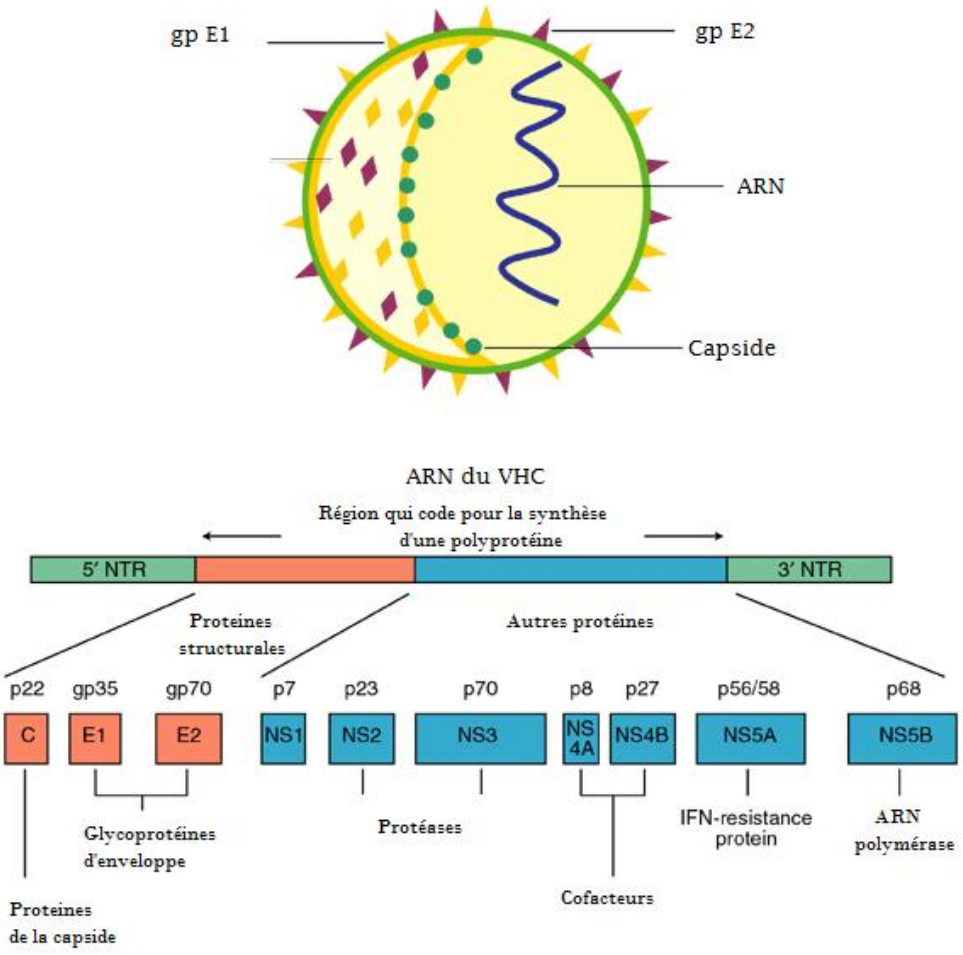


Figure 10. Virus de l’hépatite C : schéma de la structure et organisation du génome (Hui et al., 2003)

La polyprotéine, une fois clivée par des protéases virales (NS2 et NS3) et cellulaires, devient précurseur des protéines virales structurales et non structurales (Pineiro *et al.*, 2012). Les protéines structurales, y compris la protéine de capside et les deux glycoprotéines d'enveloppe gp E1 et gp E2, sont codées par un tiers du génome du VHC. Les autres protéines, dites non structurales sont codées par les deux tiers restants du génome du VHC. La protéine NS2 et la partie correspondante au tiers N-terminal de la protéine NS3 sont des protéases. La protéine NS5A est une phosphoprotéine dont la fonction n'a pas encore été totalement élucidée. Elle jouerait un rôle dans la régulation de la réponse virale aux interférons, substance de l'organisme dotée de propriétés antivirales. La protéine NS5B est une réplicase ARN polymérase dépendante (Pineiro *et al.*, 2012).

Cycle viral

Le cycle viral du VHC peut être divisé en 3 étapes principales : l'entrée du virus dans la cellule hôte, la réplication du génome viral et la dispersion des particules virales.

L'infection par le VHC touche les hépatocytes, les lymphocytes B et les monocytes. Le virus s'attache à la surface de la cellule hôte grâce à la glycoprotéine d'enveloppe E2 qui interagit avec les glycosaminoglycanes situés à la surface des cellules cibles. A ce niveau, les virions se lient au récepteurs cellulaire du VHC (tétraspanine CD81) ; ceux-ci migrent et transfèrent ces virions aux protéines de jonction claudine-1 et occuline permettant ainsi l'entrée du virus par invagination (Huraux *et al.*, 2003). D'autres mécanismes d'entrée existent qui mettent en jeu les récepteurs des lipoprotéines de faible et de très faible densité (LDL et VLDL), ainsi que le récepteur scavenger humain de classe B type I.

Après fusion des membranes, les génomes viraux sont libérés dans les endosomes acides puis largués dans le cytoplasme (Pawlotsky *et al.*, 2004). Au niveau du réticulum endoplasmique, la traduction est initiée permettant la synthèse de la polyprotéine virale qui est ensuite découpée en protéines virales structurales et non structurales. Par la suite, la synthèse de l'ARN négatif à partir de l'extrémité 3' du brin positif permet la formation d'un ARN double brin et la réplication. Enfin, le virus mature est libéré après encapsidation des ARN formés et des protéines (Payan, 2012). La figure 11 illustre les principales étapes du cycle de réplication du VHC (T.HCV).

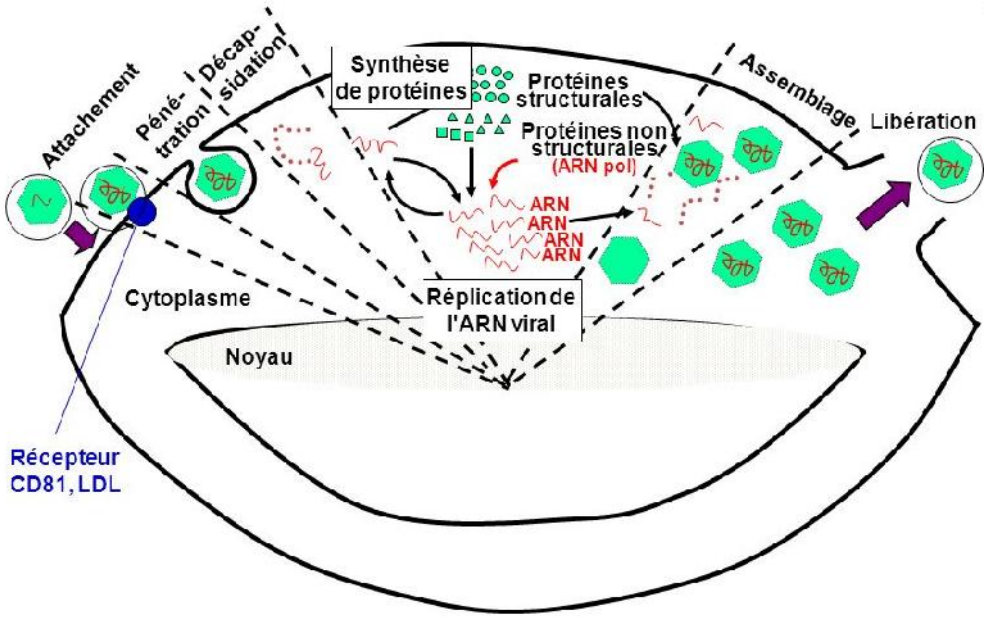


Figure 11. Principales étapes du cycle de réplication du VHC

Stratégie thérapeutique

La prise en charge de l'hépatite C ne bénéficie pas d'un traitement par vaccin car l'ARN du virus mute fréquemment (il existe 7 génotypes différents).

Le traitement antiviral était basé sur l'utilisation de l'interféron (IFN) standard (successivement pendant 6 mois et ensuite 12 mois) ; puis sur la bithérapie (interféron + ribavirine), ensuite sur une combinaison d'interféron pégylé avec la ribavirine (Truchot, 2014). La ribavarine est un analogue nucléosidique de la guanosine, à large spectre antiviral, qui inhiberait la synthèse des acides nucléiques viraux. Ce traitement était à l'origine de nombreux effets secondaires et son efficacité était limitée. Depuis fin 2011, le traitement repose sur la bithérapie précédente associée à des inhibiteurs de protéase (NS3/4A) de première génération appelés les « Direct Acting Antivirals » (DAA). Ces molécules, le télaprévir et le bocéprévir, ont modifié la prise en charge thérapeutique de l'infection par le VHC grâce à leur meilleure efficacité. Cependant, le traitement est limité aux patients atteints par le génotype 1 du VHC. De plus, il y a apparition d'effets secondaires qui leur sont inhérents (l'anémie et les lésions cutanées) (Truchot, 2014). En début 2014, d'autres DAA qui ciblent d'autres protéines virales, notamment NS5B et NS5A, ont été mis sur le marché. Ces molécules sont actives contre plusieurs génotypes viraux. Cependant ces traitements sont extrêmement coûteux, et leurs effets secondaires ne sont pas encore vraiment étudiés à grande échelle. De plus, ce traitement a conduit à l'apparition de substitutions associées à la

résistance (RASs). Certains des RASs sont spécifiques à un DAA, c'est le cas pour les RAS spécifique à NS5B. D'autres apparaissent indépendamment du DAA utilisé, en particulier pour les NS3/4A et NS5A (Sarrazin, 2016). Les patients atteints d'une variante du virus qui est résistante à l'NS5A sont très difficiles à traiter. En outre, ces virus mutés persistent dans le sang pendant des années (Pawlotsky, 2016). D'où l'intérêt de développer de nouveaux traitements, particulièrement efficaces contre les varions résistants du VHC.

Le virus de l'hépatite C et les polyphénols

Différent types de composés phénoliques s'introduisent comme étant des alternatives très prometteuses aux traitements actuels avec divers mécanismes d'action. Les plus connus sont la silymarine et l'épigallocatéchine gallate (EGCG). D'autres flavonoïdes ont été reportés comme actifs ou potentiellement actifs, notamment la lutéoline, l'apigénine, la quercétine, la narangénine et la ladanéine, ainsi que des lignines (honokiol, 3-hydroxy caruilignan C) (Calland, 2012b) (figure 12).

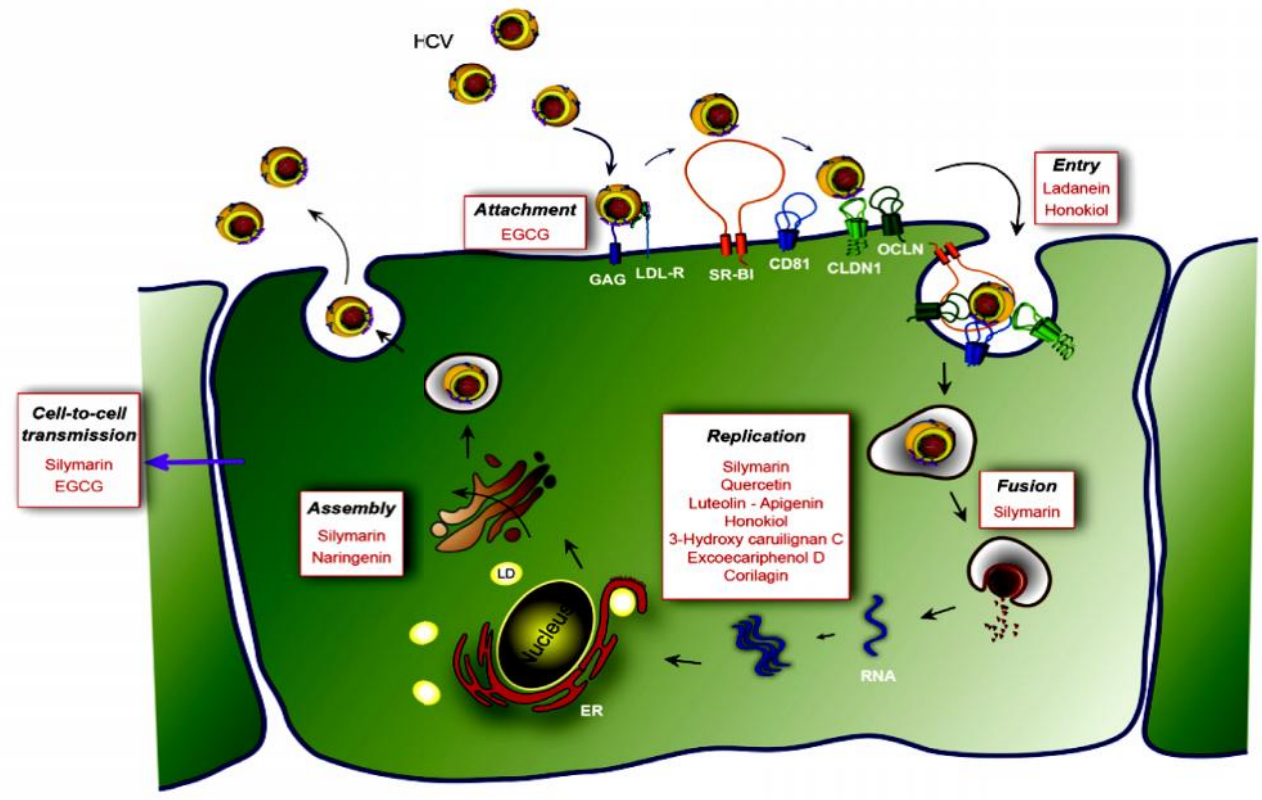


Figure 12. Schéma récapitulatif des modes d'action d'inhibiteurs du VHC d'origine naturelle (Calland, 2012b)

La silymarine est dérivée de l'extrait des graines de *Silybum marianum*. L'extrait contient au moins sept flavonolignanes (silybines A et B, isosilybines A et B, silychristine, isosilychristine, silydianine) et un flavonoïde (taxifoline) (Calland, 2012b). La silymarine a de multiples effets sur le VHC à différents stades du cycle viral, elle inhibe la réplication du VHC dans la culture cellulaire (Polyak *et al.,* 2007) et elle présente également des actions anti-inflammatoires et immunomodulatrices pouvant contribuer à ses effets hépatoprotecteurs (Morishima *et al.,* 2010). Bien que la formulation de la silibinine (mélange à peu près équimoléculaire de silybines A et B ; constituant majoritaire de la silymarine) par voie intraveineuse se voit comme une option thérapeutique potentielle au VHC, l'administration par voie orale n'a pas vu de succès car la silibinine est rapidement métabolisée après administration orale (Hawke *et al.,* 2010 ; Gordon *et al.,* 2012 ; Fried *et al.,* 2012 ; Wen *et al.,* 2008). De plus, les composants de la silymarine présentent une faible biodisponibilité (Hawke *et al.,* 2010).

L'EGCG est la catéchine la plus abondante dans l'extrait de thé vert. Il a été démontré qu'elle possède différents modes d'action anti-VHC. Elle agit comme inhibiteur de l'entrée du virus en inactivant directement les particules virales, n'est pas spécifique au génotype (contrairement aux inhibiteurs de protéases actuellement utilisés) et empêche également la transmission de cellules à cellules (Calland, 2012b). Ces propriétés en font une molécule particulièrement intéressante pour prévenir la récurrence et la propagation du VHC chez des patients transplantés du foie chroniquement infectés.

IV. Cas des plantes étudiées

IV.1. Exploration des plantes halophytes et xérophytes dans leurs biotopes

Le territoire tunisien est constitué en majorité par un climat semi-aride et aride, mais aussi par des surfaces particulièrement salines en vue de l'étendue des bandes littorales dans le pays et la distribution d'écosystèmes particulièrement salins comme les sebkhas. Il existe donc une très grande diversité de plantes halophytes et xérophytes qui sont largement distribuées dans le pays.

Dans une perspective de contribution efficace à la valorisation des ressources de ces biotopes salins et arides, l'étude de plantes qui n'ont pas été explorées sur le plan phytochimique et pharmacologique est à privilégier. Pour ce faire, il est nécessaire de réaliser des recherches directement sur terrain, et pour cela, de sélectionner des zones présentant une grande diversité en ce type de plantes, mais également une grande disponibilité en biomasse.

Différents écosystèmes de plantes halophytes existent dans le nord du pays. Sebkhet Soliman (Z-1) (figure 13) est un écosystème qui est bien caractérisé, aussi bien sur le plan climatique, géomorphologique et hydrologique, qu'au niveau de la faune et la flore. Elle se situe au sud-ouest de la péninsule du Cap Bon (Gouvernorat de Nabeul) à la « frontière » du Gouvernorat de Ben Arous. C'est une zone humide inondée présentant un plan d'eau d'une superficie globale d'environ 225 hectares, caractérisée par des sols en majorité halomorphes. Un inventaire des plantes halophytes qui peuplent cette zone a été le critère principal pour la sélection de celle-ci. Une grande diversité d'espèces halophytes a été signalée, y compris des Chénopodiacées indicatrices d'une salinité élevée (*Arthrocnemum indicum* et *Suaeda fructicosa*) ou encore des Aizoacées (*Mesembryanthemum edule*), des Anacardiacées (*Pistacia lentiscus*) et des Amaranthacées (*Salicornia arabica*) (Annexe 1).

Figure 13 : Localisation des zones investiguées sur la carte de la Tunisie

Sur les limites de Z-1, les plantes halophytes de la sebkha cèdent la place à un couvert représentatif des sols sableux ou limoneux argileux à structure grossière et fine. On retrouve donc un autre écosystème qui s'étend le long de l'extension balnéaire de la ville de Soliman (Soliman Plage). Le long de cette extension balnéaire, la Zone Z-2 (figure 13) se distingue par la présence d'halophytes qui n'ont pas été trouvées dans la Z-1, tels que *Silene succulenta* (Caryophyllacées) et *Atriplex tatarica* (Chénopodiacée) (Annexes 1).

En s'éloignant vers les zones continentales, le paysage est de plus en plus peuplé par des plantes xérophytes. A environ 80 km de Z-1, dans la région de Ghrifette proche de Sbkhet El Kourzia (Z-3) (figure 13), l'environnement est particulièrement sec comparé à Z-1 et présente donc une assez grande diversité en xérophytes, dont *Thymus capitatus* (Lamiacées), *Thapsia garganica*, (Apiacées) et *Verbascum sinuatum* (Scrophulariacées) (Annexe 1). Les peuplements xérophytes s'étendent encore plus loin. A environ une cinquantaine de kilomètres à l'est du gouvernorat de Béja, une zone (Z-4) (figure 13) se distingue par un écosystème un peu différent de (Z-3). Z-4 se situe à la région de Goubellat caractérisée par un climat de steppes avec peu de précipitations. Une autre diversité de xérophytes peuple donc Z-4 ; on y trouve notamment *Cistus monspeliensis* (Cistaceae), *Cirsium scabrum* (Asteracées), *Scabiosa maritima* (Caprifoliacées) (Annexe 1).

Sur l'ensemble des trente plantes halophytes et xérophytes identifiées dans les quatre zones (Z-1, Z-2, Z-3 et Z-4), huit plantes ont été sélectionnées pour cette étude, qui sont peu ou pas étudiées sur le plan phytochimique et pharmacologique. On distingue 5 halophytes (Z-2) : *Silene succulenta* Forssk. (Caryophyllacées) ; *Atriplex tatarica* L. (Amaranthacées) ; *Aeluropus littoralis* (Gouan) Parl. (Poacées) ; *Limonium virgatum* (Willd.) Fourr. (Plumbaginacées) ; *Juncus maritimus* Lam. (Juncacées) ; de 3 xérophytes (Z-3) : *Atractylis serratuloides* (Cass.) DC. (Asteracées), *Scabiosa maritima* L. (Caprifoliacées) et *Cirsium scabrum* (Poir.) Bonnet & Barratte (Asteracées).

IV.2. Présentation des plantes étudiées, utilisations traditionnelles et données phytochimiques et pharmacologiques

IV.2.1. *Silene succulenta* Forssk. HALOPHYTE

(Syn. *Silene corsica* DC) (Caryophyllacées)

Figure 14 : *Silene succulenta* : sur terrain et collectée

Principales caractéristiques botaniques, distribution et écologie

S. succulenta appartient à la famille des Caryophyllaceae. C'est une plante robuste à grosse souche rameuse et à tiges étalées et ascendantes de 15-40 cm (Pottier-Alapetite, 1981). (figure 14). Le genre *Silene* comprend plus de 700 espèces largement distribuées dans l'hémisphère Nord, mais aussi en Afrique, Asie et Amérique du Sud (Mamadalieva *et al.*, 2012).

En Tunisie, *S. succulenta* est distribuée au nord-est, au Cap Bon, au centre et au Sud : Hammamet, Mraissa, Hergla, Sousse, Lac Kelbia, Mehdia, Gabès, Houmt-Souk et Zarzis (Pottier-Alapetite, 1981). C'est une halophyte qui pousse dans les dunes littorales caractérisées par un environnement salin et ensoleillé.

Utilisations traditionnelles

S. succulenta ne présente pas d'utilisations en médecine traditionnelle ni d'activités biologiques. Par contre, le genre *Silene* est bien connu en médecine traditionnelle. On retrouve diverses utilisations en médecine traditionnelle tibétaine, chinoise et zulu,

notamment pour traiter la fièvre, contre les morsures de serpents et comme anti-inflammatoire (Mamadalieva *et al.*, 2012).

En outre, les silènes sont très connues pour leur utilisation comme substituts de savon. Ces plantes sont aussi connues dans certaines gastronomies traditionnelles.

Données bibliographiques pharmacologiques et phytochimiques

Le genre *Silene* présente différentes activités biologiques, notamment antimicrobienne et antitumorale (Mamadalieva *et al.*, 2012).

Des études phytochimiques réalisées sur des espèces de *Silene* ont révélé la présence de nombreux composés bioactifs. Plus de 400 composés ont été isolés, dont les *phytoecdystéroïdes* qui sont majoritaires dans le genre. Par contre, il y a peu de données phytochimiques concernant l'espèce *S. succulenta*. Des études ont montré la présence d'acides gras, de stérols et de saponosides dans la plante (Hanna *et al.*, 1992 ; Karawya *et al.*, 1991), mais ont aussi déterminé la composition chimique de son parfum floral (benzaldéhyde et benzoate de méthyle majoritairement) (Jurgens *et al.*, 2002).

IV.2.2. *Atriplex tatarica* L. HALOPHYTE

(Syn. *Atriplex laciniata* L.) (Amaranthacées)

Figure 15 : *Atriplex tatarica*: sur terrain et collectée

Principales caractéristiques botaniques, distribution et écologie

Atriplex tatarica appartient à la famille des Amaranthacées. C'est une plante annuelle, entièrement argentée, de 30 cm à 1 m de hauteur, dressée ou ascendante, à rameaux étalés (Pottier-Alapetite, 1981) (figure 15).

Le genre *Atriplex* comprend environ 255 espèces (Abd El Raheim *et al.*, 2013). En Tunisie, *A. tatarica* est bien distribuée au Kairouan (Pottier-Alapetite, 1981). Cette halophyte pousse sur les dunes littorales sablées caractérisées par un environnement salin.

Utilisations traditionnelles

A. tatarica n'est pas bien connue en médecine traditionnelle. Par contre, différentes utilisations thérapeutiques ont été mentionnées pour le genre *Atriplex*, notamment le traitement de la bronchite et le contrôle de la glycémie chez les patients diabétiques (Abd El Raheim *et al.*, 2013). Dans la médecine traditionnelle arabe, on trouve différentes utilisations : soins des maux d'estomac et en tant que laxatif. Les tribus bédouines utilisent encore à l'heure actuelle ces plantes pour traiter les douleurs musculaires (Chikhi *et al.*, 2014).

Données bibliographiques pharmacologiques et phytochimiques

Aucune étude concernant les activités biologiques potentielles d'*A. tatarica* n'a été trouvée dans la littérature. Néanmoins, le genre *Atriplex* présente différentes activités biologiques, notamment antifongique, antivirale (contre le virus de l'herpès), anti-oxydante et antidiabétique (Abd El Raheim *et al.*, 2013).

Des études phytochimiques réalisées sur des espèces d'*Atriplex* ont révélé que le genre présente une diversité de composés. Une étude phytochimique réalisée sur l'espèce *A. tatarica* a montré la présence de flavonoïdes (tricine, tricine-7-*O*-β-$_{D}$-glucopyranoside, isorhamnétine et isorhamnétine-3-*O*-rutinoside) et des phytostérols (stigmastérol et β-sitostérol) dans les parties aériennes (Jenis *et al*., 2009). Les composés volatiles de la plante ont aussi été déterminés.

On retrouve majoritairement des dérivés du phénylpropène, des hydrocarbures et des acides gras (Jenis *et al*., 2010).

IV. 2.3. *Aeluropus littoralis* (Gouan) Parl. HALOPHYTE
(Syn. *Dactylis littoralis* Willd. ; *Poa littoralis* Gouan) (Poacées)

Figure 16. *Aeluropus littoralis* : sur terrain et collectée

Principales caractéristiques botaniques, distribution et écologie

Aeluropus littoralis appartient à la famille des Poacées. C'est une plante vivace de 30-50 cm. Les tiges sont couchées et souvent radicantes, émettant des rameaux ascendants et courts (Pottier-Alapetite, 1981) (figure 16).

Cette espèce est bien répandue sur le bassin méditerranéen. En Tunisie, *A. littoralis* est l'unique représentante du genre *Aeluropus* (Pottier-Alapetite, 1981). Cette espèce est, par contre, bien distribuée dans le pays, surtout dans les zones côtières. Il s'agit d'une halophyte par excellence. Elle est très résistante à la salinité et peuple les sables et prés humides.

Utilisations traditionnelles

A. littoralis n'est pas très réputée pour des utilisations thérapeutiques. On trouve seulement quelques utilisations en médecine traditionnelle chinoise, pour faire baisser la fièvre, contre les troubles de la diurèse et dans le traitement de la cirrhose hépatique et de l'ascite du foie (Ma *et al.,* 2011).

Données pharmacologiques et phytochimiques bibliographiques

Aucune étude n'a été trouvée dans la littérature concernant des analyses phytochimiques ou d'activités biologiques pour *A. littoralis*. D'autre part, la majorité des travaux réalisés dans le genre *Aeluropus* se sont intéressés à l'étude de la résistance à la salinité de *A. littoralis* et de *A. lagopoides* (Barhoumi *et al*., 2007 ; Haghighi *et al.*, 2014 ; Jannesar *et al.,* 2014).

IV.2.4. *Limonium virgatum* Willd HALOPHYTE
(Syn. *Statice virgata* Willd.) (Plumbaginacées)

Figure 17 : *Limonium virgatum* : sur terrain et collectée

Présentation

Limonium virgatum appartient au genre *Limonium* de la famille des Plumbaginacées. *Limonium*, connu sous le nom de 'statice', est un grand genre de 180 espèces. Le genre

englobe principalement des plantes herbacées vivaces mais parfois annuelles ou arbustes (Bailey., 1977). Il existe entre 15 à 20 espèces cultivées en horticulture, parmi elles on peut citer *L. sinuatum, L. bonduelli, L. dregeanum, L. latifolium, L. sinense, L. psylliostachys, L. bellidifolium, L. gmelinii* et *L. perezii* (Sato., 1989).

Description botanique

Limonium virgatum est une plante vivace de 10-40 cm, glabre, grêle, très rameuse à la base et dont l'inflorescence est en épi (figure 17). La plante est à souche ligneuse à divisions épigées couvertes de feuilles rapprochées, étroitement spatulées, obtuses ou rétuses, uninervées, non ridées. Les hampes sont flexueuses, non fragiles, très rameuses, à rameaux stériles très nombreux, rigides, à articles longs, grêles, non étranglés aux 2 bouts. Les épillets sont arqués (à 1-4 fleurs), écartés, en longs épis lâches, unilatéraux, peu nombreux. La bractée extérieure est 3 à 4 fois plus courte que l'interne, carénée sur le dos et très appliquée. Le calice est à tube courbé, à limbe 1 fois plus court que le tube, à dents ovales-obtuses. La corolle violacée est assez grande (7-9 mm de large) (Pottier-Alapetite, 1981).

Distribution et écologie

Le genre *Limonium* est largement distribué dans le monde. Il est très présent en Tunisie. Certaines espèces du genre sont considérées comme endémiques du pays. *L. virgatum* est bien distribué au nord et au centre de la Tunisie : Bizerte, La Marsa, Radès, Hammam-lif, Zembra, Bou Ficha et Sousse (Pottier-Alapetite, 1981). C'est une plante très tolérante à la salinité, qui pousse sur les sables maritimes.

Utilisations traditionnelles

Bien que l'espèce *L. virgatum* ne soit pas mentionnée en médecine traditionnelle ni dans la littérature, le genre *Limonium* est bien connu en médecine traditionnelle chinoise. Plusieurs espèces sont utilisées pour traiter la diarrhée, les bronchites et les hépatites. On cite l'exemple de *Limonium wrightii* qui est employée pour le traitement des arthrites et de la fièvre (Aniya *et al*., 2002).

Données bibliographiques pharmacologiques et phytochimiques

A notre connaissance, *Limonium virgatum* n'a pas été étudié auparavant d'un point de vue phytochimique et pharmacologique. En revanche, plusieurs espèces du genre *Limonium* présentent diverses activités biologiques, Des propriétés antioxydantes, antivirales et antiprolifératives, cardioprotectrice, anti-inflammatoire et antibactérienne ont été reportées pour le genre *Limonium* (Aniya *et al.*, 2002 ; Yuh-Chi *et al.*, 2002 ; Kandil et *al.*, 2000 ;

Murray *et al*., 2004). Plusieurs espèces de Limonium sont connues pour leurs activités antimicrobiennes sur différents types de bactéries et de champignon pathogènes. Les extraits des racines de *L. effusum, L. globuliferum, L. lilacinum* ont montré des activités sur 9 bactéries et 12 champignons avec un maximum enregistré pour *L. lilacinum* (*Listeria monocytogenes*) et *L. globuliferum* contre (*Alternaria alternata*) (Avaz *et al.,* 2012). Une autre étude a montré que l'extrait des tiges de *Limonium stocksii* est capable d'inhiber la croissance de souches d'*Aspergillusflavus* et de *Microsporumcanis* **(**Rahat *et al.,* 2013). Sakagami et *al.* (2001) suggèrent que l'administration des extraits de *Limonium caliniforlicum* empêche la production de la vérotoxine par la bactérie *Escherichia coli* entérohémorragique dans les intestins humains.

Par ailleurs, une grande diversité de composés a été décrite dans le genre *Limonium.* Toutes les espèces du genre sont connues par leur grande richesse en naphtoquinones, et surtout en flavonoïdes tels que le kaempferol, la quercétine et des flavonols triglycosylés (Tableau 5). De plus, certains auteurs ont signalé la présence de tanins dans les plantes du genre *Limonium* (Medini *et al*., 2011, Medini *et al*., 2014).

Tableau 5. Molécules purifiées à partir d'espèces du genre *Limonium* (Harborne, 1999)

Molécules	**Plante**
beta-Alanine betaïne	*Limonium vulgare*
N-Carbamoyl putrescine	*Limonium vulgare*
Choline sulfate	*Limonium vulgare*
Laricitrine	*Limonium sinuatum*
Herbacetine 8-glucoside	*Limonium sinuatum*
3-O-Methylquercetine-7-*O*-beta-D-glucopyranoside	*Limonium gmelinii*
Isorhamnetine 7-*O*-beta-D-glucopyranoside	*Limonium sinuatum*
Myricetine 3-*O*-galactoside	*Limonium latifolium*
Myricetine 3-*O*-galactoside	*Limonium serbicum*
Myricitrine	*Limonium spp,*
Myricetine-3-*O*-rutinoside	*Limonium gmelinii*
Laricitrine 7-*O*-glucoside	*Limonium sinuatum*
Myrtilline	*Limonium spp*.
Delphinidine	*Limonium spp*.
Petunidine 3-rhamnoside-5-glucoside	*Limonium spp*.
3,4,2',4',6'-Pentahydroxychalcone	*Limonium spp*.
4,6,4'-Trihydroxyaurone	*Limonium spp*.
Aureusidin	*Limonium spp*.
Cernuoside	*Limonium bonduellili*
Aureusine	*Limonium spp.*
Myricetine 3-(2''-p-hydroxybenzoylrhamnoside)	*Limonium sinense*

IV.2.5. *Juncus maritimus* Lamk HALOPHYTE
(syn. *Juncus maritimus* var. arabicus Asch. & Buchenau) (Juncaceae)

Figure 18 : *Juncus maritimus* : sur terrain et collectée

Présentation

J. maritimus appartient à la famille des Juncaceae. Cette famille se compose de huit genres, dont *Juncus* L. qui est de loin le plus important. Les espèces de *Juncus* les plus connues: *Juncus acutus* L., *Juncus bufonus* L., *Juncus effusus* L., *Juncus inflexus* L., *Juncus fontanessi* Gay in Lah., *Juncus littoralis* C.A.May., *Juncus punctoritus* L.f., *Juncus rigidus* C. A. May., *Juncus subulatus* Forssk, *Juncus roemerianus* L., *Juncus inflexus* L. et *Juncus alpinus* V. (Tackholm, 1974).

Description botanique

J. maritimus une plante herbacée vivace, vigoureuse, glabre, atteignant 1 mètre de hauteur (figure 18). Les rhizomes sont traçants. Les tiges sont raides, nues, pleines, les stériles sont piquantes. Les feuilles sont toutes radicales, peu nombreuses, égalant presque les tiges, dressées, cylindriques, piquantes. Les fleurs sont de couleur vert pâle, en panicules, fournies,

lâche-décomposées, un peu latérales, souvent dépassées par une bractée piquante. Le périanthe est à divisions toutes lancéolées aiguës. Les étamines sont au nombre de 6. Le fruit est une capsule petite, elliptique-oblongue, mucronée, fauve, juste un peu plus longue que les tépales. Les graines sont appendiculées et plus obtuses (Pottier-Alapetite, 1981).

Distribution et écologie

Les espèces du genre *Juncus* sont présentes dans les terres humides du monde entier, mais sont plus rares sous les tropiques que dans les régions tempérées (Brink *et al.*, 2012). *Juncus maritimus* est bien distribué dans le monde. Il se rencontre en zone méditerranéenne et s'étend en Afrique et en Europe. Il se trouve aussi en Asie et en Amérique. En Tunisie, la plante est nommée *Smar*. Elle se trouve en abondance dans les zones côtières et dans les sebkhas (bassin occupant le fond d'une dépression à forte salinité).

Utilisations traditionnelles

Depuis le néolithique, les espèces de *Juncus* sont très connues pour leur utilisation comme matière première pour tresser des articles tels que des nattes et des paniers, ainsi que pour leurs utilisations dans la couverture des toits. Dans l'Egypte ancienne, les plumes de jonc étaient utilisées comme outil d'écriture dès le III^{e} siècle avant J.-C. Dans le delta du Nil en Egypte, on cultivait à petite échelle des espèces de *Juncus* pour la production de nattes au début du XX^{e} siècle. Au Tibesti (Niger), les tiges de *J. rigidus* sont utilisées pour fabriquer des brosses et des tamis (Brink *et al.*, 2012). Les jeunes pousses sont consommées par les Touareg du Niger.

Par ailleurs, les espèces du genre *Juncus* possèdent diverses vertus thérapeutiques. En médecine traditionnelle asiatique, les graines de différentes espèces de *Juncus* sont employées comme diurétique et comme remède contre la diarrhée (Brink *et al.*, 2012). L'infusion des fruits de *J. acutus* mélangée à des grains d'orge est utilisée pour soulager un rhume (Bellakhdar, 1978). Les rhizomes de *J. maritimus* sont recommandés en cas d'insomnies (El-Shamy *et al.*, 2012). La partie médullaire de *J. effusus* L. est utilisée dans la médecine traditionnelle japonaise et chinoise comme antipyrétique et comme agent sédatif (Miles *et al.*, 1977). *Juncus maritimus* est aussi connu en médecine traditionnelle, notamment pour traiter le rhume (Ouarghidi *et al.*, 2013). Les graines, en décoction, sont employées contre les maux l'estomac et du foie (Lahsissene *et al.*, 2009). Au Maroc (utilisation propre au Zaër), les graines, associées aux stigmates de Maïs, aux fleurs de Figuier de Barbarie et aux rhizomes de Chiendent, sont utilisées en décoction contre les calculs rénaux et comme diurétique.

Données bibliographiques pharmacologiques et phytochimiques

Il existe une grande diversité dans le genre *Juncus*, aussi bien en terme de composition chimique que d'activités biologiques. Différentes activités biologiques ont été rapportées pour plusieurs espèces du genre *Juncus* : antioxydante, hépatoprotectrice, antitumorale, antivirale, antimicrobienne, anti-algale et anti-inflammatoire (El-Shamy *et al.,* 2012). De plus, une panoplie de composés ont été caractérisés dans le genre *Juncus,* notamment des flavonoïdes, coumarines, terpènes, stilbènes, acides phénoliques, caroténoïdes et d'une manière plus fréquente, des phénanthrènes (monomériques et dimériques). Ces derniers sont les plus étudiés dans le genre *Juncus*. (El-Shamy *et al.,* 2012). Concernant *J. maritimus*, il n'y a qu'une seule étude phytochimique et biologique à notre connaissance, où il a été démontré qu'elle possède une activité antibactérienne probablement due à des composés phénanthréniques (Tóth *et al.,* 2016).

- Les phénanthrènes

Les phénanthrènes forment une classe de composés aromatiques qui est assez rare dans la nature. Ils sont rencontrés principalement dans environ 49 espèces de la famille des Orchidacées (*Dendrobium*, *Bulbophyllum*, *Maxillaria*...). Ils existent aussi chez les familles des Dioscoreacées, Bétulacées et Combretacées. Une grande majorité des phénanthrènes ont été décrits chez les espèces de *Juncus*. Les phénanthrènes sont le plus souvent dérivés des stilbènes par couplage oxydatif des noyaux aromatiques, mais il existe aussi des phénanthrènes ayant comme précurseurs des diterpènes. Il existe une assez grande diversité structurale au sein des phénanthrènes. Ces composés peuvent être classés en trois groupes principaux : monophénanthrènes, diphénanthrènes et triphénanthrènes.

Phénanthrènes monomériques

C'est la forme naturelle la plus fréquente dans la nature avec plus de 200 composés connus. Une centaine d'entre eux sont des dérivés phénanthréniques (dont les 9,10-dihydrophénanthrènes) qui sont substitués par des groupes hydroxyle et/ou méthoxyle (figure 19). Leur diversité repose essentiellement sur le nombre et la position des fonctions oxygène. Les groupes hydroxyle et méthoxyle sont souvent au nombre de 3 et 6 et leur position en C-2, C-3, C-5, C-6 et C-7. Il existe des substitutions en C-9 et C-10 mais beaucoup moins fréquentes. Les phénanthrènes substitués par un seul substituant sont rares, on en trouve chez les orchidées (Kovacs *et al*., 2008). D'autres types de substitution sont rencontrés chez les phénanthrènes monomériques, notamment par des groupes méthyle, carboxyle, formyle et

vinyle. Des hétérosides existent aussi mais sont relativement rares. Un autre type caractérise les phénanthrènes monomériques, les phénanthraquinones (figure 20) qui regroupe 19 composés, souvent substitués par des groupes hydroxyle, méthoxyle ou méthyle (Kovács *et al*., 2008).

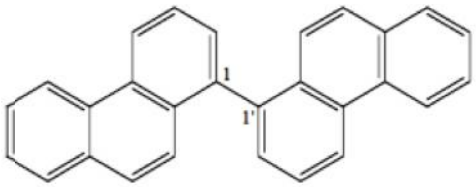


Figure 19. Structure de base des phénanthrènes (gauche) et des dérivés 9,10-dihydrophénanthrènes (droite)

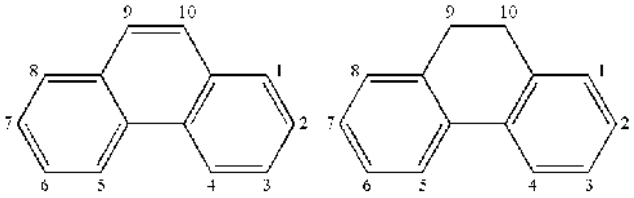


Figure 20. Structure de base des phénanthraquinones

Phénanthrènes dimériques et trimériques

Ils sont nettement moins fréquents, avec une quarantaine de composés identifiés actuellement. Il s'agit d'une association de deux monomères de phénanthrènes et de leurs dérivés 9,10-dihydrophénanthrènes, généralement reliés entre les positions C-1-1′ (figure 21). Des liaisons C1-3′, C1-8′ et C3-3′ existent également dans la nature. Ces composés sont souvent substitués par des groupes hydroxyle et méthoxyle.

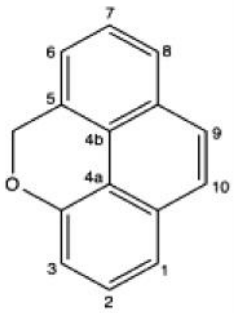
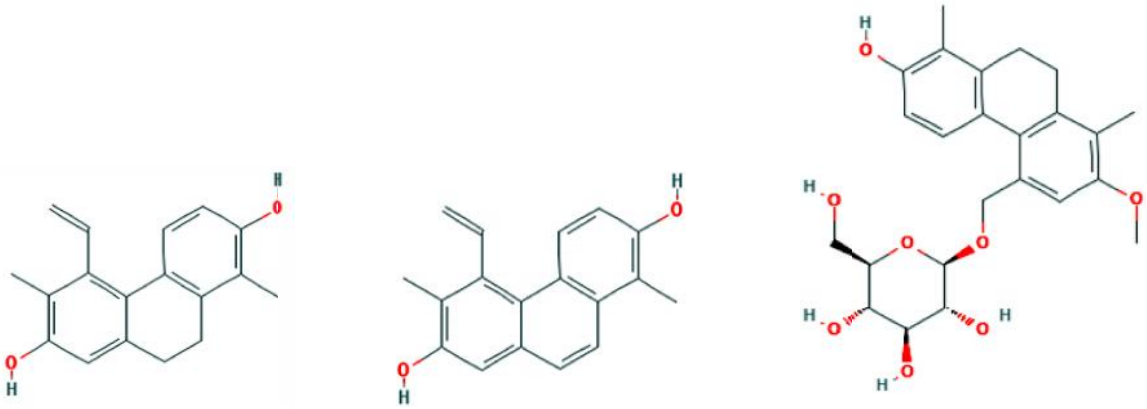


Figure 21. Structure de base des phénanthrènes dimériques (liaison en C-1-1')

Finalement, il existe un seul triphénanthrène qui a été isolé à partir d'une orchidée, *C. appendiculata* (Xue *et al*., 2006).

- Les phénanthrènes dans le genre *Juncus*

Il existe une grande diversité de phénanthrènes monomériques dans le genre *Juncus* dont la plupart comporte un groupe vinyle en C5. Un grand nombre de phénanthrènes ou dihydrophénanthrènes sont substitués par des groupes hydroxyle, alkyle, formyle, carboxyle, mais aussi reliés à un composé hétérocyclique tel que les pyranes et les furanes. Les formes glycosylées sont relativement rares dans le genre *Juncus*. Quelques hétérosides comme les effusides (I-V), ont toutefois eté isolés à partir de *Juncus effesus* (Dellagreca *et al.*, 1995) (figure 22). Les phénanthrènes dimériques sont aussi rares dans le genre *Juncus*. Cinq 9,10-dihydrophénanthrènes dimériques ont été identifiés chez *Juncus acutus* (Dellagreca *et al.*, 2002).



Juncusol **Déhydrojuncusol** **Effuside I**

Figure 22. Exemples de phénanthrènes monomériques dans le genre *Juncus*.
Un phénanthrène (juncusol - gauche) ; un dihydrophénanthrène (dehydrojuncusol - centre) ; un dérivé glycosylé (effuside I - droite)

Ces phénanthrènes sont doués de diverses activités biologiques révélées chez différentes espèces de *Juncus*. Le déhydroeffusol isolé de *Juncus effusus*, possède des propriétés anxiolytiques et sédatives caractéristiques et n'affecte pas la coordination générale du mouvement chez la souris (Liao *et al.*, 2011). Des dihydrophénanthrènes dimériques isolés d'une autre espèce, *Juncus acutus*, sont aussi dotés de propriétés anti-algales (Dellagreca *et al.*, 2002, 2005). Chez la même espèce, d'autres phénanthrènes ont révélé un effet anti-

inflammatoire, notamment le juncutol (Behery *et al.,* 2007). Des activités cytotoxiques ont aussi été rapportés, notamment pour le juncunol qui a montré une cytotoxicité sélective *in vitro* vis-à-vis de divers lignées cancereuses humaines (Rodrigues *et al.*, 2014).

On trouve aussi des phénanthrènes à potentiel antimicrobien. Chez *Juncus* inflexus, quatre phénanthrènes : juncusol, jinflexin B, juncuenine D et ldehydrojuncuenine B ont montré des effets sur la croissance de souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline. Plus loin, il a été suggéré que le juncusol isolé à partir de *J. roemerianus* régulerait les populations de *Bacillus* dans le marais (Chapatwala *et al.*, 1981).

IV.2.6. *Atractylis serratuloides* (Cass.) Sieber ex Cass XEROPHYTE
Syn. *Atractylis microcephala* Coss. & Durieu) (Asteracées)

Figure 23. *Atractylis serratuloides* : sur terrain et collectée

Principales caractéristiques botaniques, distribution et écologie

Atractylis serratuloides appartient à la famille des Asteracées. C'est une plante vivace à tiges épaisses dressées de 20 à 30 cm de haut, très ramifiées et à rameaux très feuillus (Chehma *et al.*, 2006) (figure 23).

Le genre *Atractylis* se compose de 30 espèces bien réparties dans le monde : la méditerranée, la macaronésie et le sud-ouest de l'Asie (Bohm *et al.*, 2001). En Tunisie, la plante est

nommée *Sirr*. Elle est bien distribuée au sud du pays (Chehma *et al.*, 2006). La plante pousse dans un climat semi-aride, dans les Regs (déserts de pierre) et les hamadas (plateaux rocailleux rencontrés dans les régions désertiques).

Utilisations traditionnelles

En médecine traditionnelle, le genre *Atractylis* est bien connu pour traiter les troubles circulatoires, les parasites intestinaux, les ulcères et l'empoisonnement par des morsures de serpent (Chabani *et al.*, 2013). Les racines d'*A. serratuloides* sont utilisées pour traiter l'estomac fragile et le manque d'appétit.

Par ailleurs, les racines de la plante produisent un latex qui est consommé comme gomme à mâcher *Loubene*. La plante est aussi pâturée par les dromadaires (Chehma *et al.*, 2006).

Données bibliographiques pharmacologiques et phytochimiques

Une étude réalisée sur les parties aériennes de la plante a montré qu'elle possède des activités antioxydante et antibactérienne (Bouaziz *et al*., 2009). Aucune étude phytochimique n'a été effectuée sur *A. serratuloides*. De plus, le genre *Atractylis* est chimiquement peu étudié. Seule la présence de flavonoïdes et de triterpènes a été mise en évidence (Chabani *et al.*, 2013). Les études phytochimiques réalisées sur d'autres espèces du genre ont porté principalement sur une espèce toxique, *Atractylis gummifera*. Sa toxicité a été attribuée à l'atractyloside et au carboxyatractyloside, deux diterpènes gycosylés capables d'inhiber la phosphorylation oxydative mitochondriale (Chabani *et al.*, 2013).

IV.2.7. *Scabiosa atropurpurea* L. subsp. *maritima* (L.) Fiori & Paoli XEROPHYTE
(Syn. *Scabiosa maritima* L.) (Dipsacacées)

Figure 24. *Scabiosa maritima* : sur terrain et collectée

Principales caractéristiques botaniques, distribution et écologie

Le genre *Scabiosa*, qui appartient à la famille des Dipsacacées, est représenté par 10 espèces en Tunisie (Pottier-Alapetite, 1981). *Scabiosa atropurpurea*, regroupe deux sous-espèces : *atropurpurea* et *maritima* (Tela botanica). La scabieuse maritime est une plante annuelle ou pérenne de 30 cm à 1 m de hauteur, glabre ou poilue, à rameaux étalés et des fleurs roses ou lilas, rayonnantes, à 5 lobes inégaux (figure 24).

Scabiosa maritima est bien répandue dans le bassin méditerranéen. En Tunisie, elle est localisée à Korbos, Dj. Abder Rahman, le Kef, Zaghouan, Kessera, Sakiet Sidi Youssef, Sousse, Gabès, Moularès (Pottier-Alapetite, 1981). C'est une plante xérophyte qui pousse dans un environnement sec.

Utilisations traditionnelles

Scabiosa atropurpurea, regroupant les deux sous-espèces *atropurpurea* et *maritima*, est connue sous le nom de *Ambarina* au nord du Pérou et de *Escabiosa* au nord-est de la Catalogne. Elle est très utilisée en médecine traditionnelle (comme régulateur de la menstruation et même en médecine vétérinaire comme diurétique), particulièrement pour son activité antibactérienne contre la bronchite (Elhawary *et al.*, 2011).

Données bibliographiques pharmacologiques et phytochimiques

Il a été démontré que *S. atropurpurea* possède plusieurs activités biologiques, notamment, anti-inflammatoire, antibactérienne, anti-oxydante et hépatoprotectrice (Elhawary *et al.*, 2011).

La première étude phytochimique sur *Scabiosa atropurpurea* a été conduite en 1977 révélant la présence d'un hétéroside de flavone : la rhoifoline (Zemtsova, 1977). Un deuxième travail a été réalisé en 2010 sur la sous-espèce *maritima*, permettant l'isolement d'iridoïdes (Polat *et al.*, 2010). L'étude la plus récente a investigué la composition chimique et l'activité biologique de l'extrait éthanolique des parties aériennes de *Scabiosa atropurpurea.* Ce travail a permis d'identifier la lutéoline et ses dérivés glycosylés (lutéoline-7-*O*-glucoside et lutéoline-7-*O*-*β*-D-rutinoside) ainsi qu'un autre composé phénolique (acide 3-*O*-caféoylquinique methylester) (Elhawary *et al.*, 2011).

IV.2.8. *Cirsium scarbrum* (Poir.) Bonnet &Barratte XEROPHYTE
(Syn. *Cirsium giganteum* Spreng.) (Asteracées)

Figure 25 : *Cirsium scabrum Cirsium scabrum*: sur terrain et collectée

Description botanique

Cirsium scarbrum est une plante annuelle de la famille des Asteracées. C'est une plante épineuse, puissante, pouvant dépasser 3 m de hauteur (figure 25). La tige est dressée, raide, striée, laineuse, rameuse-divariquée dans le haut. Les feuilles sont oblongues, pennatilobées, à lobes larges et épineux, les caulinaires amplexicaules mais non décurrentes sur la tige, les inférieures en rosette, pouvant atteindre 40 à 80 cm ; face inférieure tomenteuse, blanchâtre et face supérieure verte et scabre. Les capitules sont globuleux, relativement petits, de 3 cm de diamètre. Les bractées de l'involucre ovo-lancéolées sont petites, aranéeuses, appliquées et terminées en courte épine récurvée. Les pétales sont blancs aux extrémités purpurines (Pottier-Alapetite, 1981).

Distribution et écologie

Les espèces du genre *Cirsium* sont bien distribuées dans le monde. Environ 200 espèces de *Cirsium* sont distribuées en Europe, en Afrique du Nord, en Asie, ainsi qu'en Amérique du Nord et centrale (Mabberley *et al.*, 2008). La présence de *Cirsium scarbrum* a été signalée dans le bassin méditerranéen, mais aussi sur le continent américain. En Tunisie, le genre *Cirsium* n'est représenté que par trois espèces. *C. scabrum* se trouve à Zaghouan, Kessera, Dj. Bargou, Thibar, Korbous, Zembra (Pottier-Alapetite, 1981). C'est une plante xérophyte qui pousse dans un environnement particulièrement sec.

Utilisations

C. scabrum n'est pas bien connue en médicine traditionnelle, ni pour d'autres utilisations. En général, les espèces de *Cirsium* sont considérées comme étant des mauvaises herbes nuisibles aux cultures et sont donc souvent la cible de moyens de contrôle massifs. En revanche, chaque organe de ces plantes peut être consommé. Les racines de toutes les espèces de *Cirsium* peuvent être consommées crues, bouillies ou rôties. Certaines ont des racines qui deviennent douces lorsqu'elles sont cuites. Les boutons floraux immatures peuvent être mangés crus ou cuits. Les jeunes feuilles peuvent être consommées crues une fois débarrassées de leurs épines. De plus, les feuilles, qu'il s'agit de jeunes feuilles ou des feuilles basales, peuvent servir à la préparation de thé. Les jeunes tiges pelées et cuites prennent un goût qui rappelle celui du céleri. Les graines peuvent être bouillies et consommées de la même manière que les graines de tournesol ; elles peuvent aussi être broyées en farine panifiable (Vizgirdas *et al.*, 2009). L'utilisation du *Cirsium* comme source nutritionnelle est connue par plusieurs cultures. Dans les zones rurales en Turquie, les tiges et les racines de

certaines espèces de *Cirsium* ont été utilisées comme source de nourriture et additifs alimentaires depuis des années (Demirtas *et al.*, 2017). Plus loin, certaines espèces de *Cirsium* sont cultivées par les mongols pour subvenir aux besoins manquants en fruits et légumes, qui sont moins faciles à faire pousser dans les steppes à climat sec (Khramova *et al.*, 2011).

Le genre *Cirsium* est aussi connu en thérapeutique. On trouve des utilisations en médecine traditionnelle chinoise, coréenne et japonaise pour traiter l'hépatite, mais aussi les tumeurs, notamment le cancer du foie, cancer de l'utérus et la leucémie (Liu *et al*., 2006). D'autres utilisations ont aussi été rapportées en médecine traditionnelle polonaise, notamment comme anti-inflammatoire et antimicrobien (Tarle *et al.*, 1990 ; Nazaruk *et al.*, 2005) mais aussi en Louisiane pour le traitement du rhume (Hand, 1980). À Mizoram, en Inde, le jus de racine de *Cirsium chinensis* est utilisé comme antiseptique pour traiter les blessures au fil de barbelé, les ulcérations et les abcès. Une décoction de la racine est consommée pour soulager la flatulence. En Italie centrale, les feuilles et le jus de feuilles de *Cirsium arvense* sont utilisés comme hémostatique d'urgence à appliquer directement sur les plaies ; en décoction, les feuilles sont utilisées sur les bléssures (Guarrera *et al.*, 2005).

Les plantes du genre *Cirsium* s'introduisent aussi dans divers types d'utilisations. En effet, les tiges des espèces de *Cirsium* sont connues pour leur texture très fibreuse. Les fibres extraites des tiges peuvent être utilisées pour la fabrication de cordes résistantes. En outre, les tiges bien séchées et débarrassées de leurs épines peuvent servir à faire du feu. La partie duveteuse des graines constitue un bon matériau isolant (Vizgirdas *et al.*, 2009).

Données bibliographiques pharmacologiques et phytochimiques

A notre connaissance, il n'existe pas d'études concernant la composition chimique, ni les potentielles activités biologiques de *C. scabrum*. Par contre, différentes propriétés biologiques d'autres espèces de *Cirsium* ont été démontrées dans la littérature. Plusieurs travaux se sont intéressés aux activités cytotoxiques et antiprolifératives contre différentes lignées cellulaires cancéreuses (Lee *et al.*, 2002 ; Liu *et al.*, 2006 ; Waksmundzka-Hajnos *et al*., 2008), suggérant que le genre *Cirsium* est une source prometteuse en molécules antitumorales actives. On trouve aussi des études qui mettent en évidence les propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, et anti-inflammatoires de différentes espèces de *Cirsium* (Nazaruk, 2008).

D'autre part, le genre *Cirsium* a bien été exploré du point de vue phytochimique. Des données sur la composition chimique d'environ une centaine d'espèces de *Cirsium* sont disponibles dans la littérature, soulignant l'existence d'une grande diversité chimique au sein du genre *Cirsium*. Parmi les composés les plus étudiées chez les *Cirsium*, on trouve les

flavonoïdes. La plus rencontrée est la linarine (Jordon-Thaden *et al.*, 2003), une flavone qui possède des propriétés analgésiques, anti-inflammatoires, antipyrétiques et neuroprotectrices (Feng *et al.*, 2015). L'apigénine et la lutéoline (et leurs dérivées) sont également synthétisées par une grande majorité des espèces de *Cirsium* (Jordon-Thaden *et al.*, 2003). Elles sont connues pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes et chimiopréventives (Jordon-Thaden *et al.*, 2003 ; Shukla et Gupta, 2010 ; López-Lázaro, 2009).

Les triterpènes et stérols représentent la deuxième famille de métabolites secondaires en termes de diversité chez le genre *Cirsium* (López-Lázaro *et al.*, 2003). Les triterpènes sont une classe de métabolites secondaires composés de 30 carbones. Ils sont très répandus, notamment dans les résines, à l'état libre, estérifié, ou sous forme hétérosidique. Ces molécules sont des constituants membranaires de certains organes spécialisés comme les trichomes (Peirs, 2005). Ce sont également des composés sécrétés par les plantes pour se défendre contre les insectes (Jordon-Thaden *et al.*, 2003).

La majorité des triterpènes sont des molécules cycliques et sont, à ce jour, représentés par plus de 4000 structures formées sur plus d'une centaine de squelettes. Au niveau biosynthétique, ils dérivent soit de la cyclisation du squalène, soit de celle de l'époxysqualène. Les formes les plus représentées chez les végétaux sont en général pentacycliques (de type lupane, oléanane, tarastane, ursane…), mais aussi tétracycliques (figure 26).

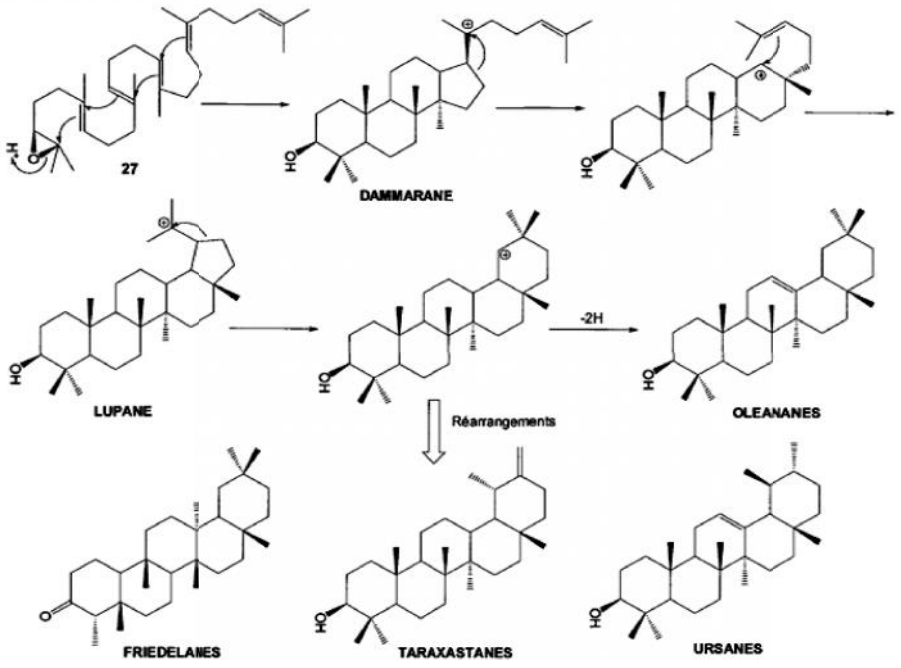


Figure 26. Schéma de biosynthèse de certaines familles de triterpènes

Les phytostérols (molécules tétracycliques) ont un rôle structural important dans les membranes plasmiques où ils interviennent dans la régulation de la fluidité et de la perméabilité de celles-ci. Enfin, les phytostérols ont un rôle à jouer dans la transduction des signaux entre la cellule et son environnement (Luo *et al.*, 2015). Les phytostérols et triterpènes pentacycliques se rencontrent à l'état libre ou sous forme d'hétérosides (on parle alors de saponosides). Selon la nature de la génine, on distinguera les saponosides à génine stéroïdique et les saponosides à génine triterpénique, de loin plus nombreux que les précédents (Peirs, 2005). Par ailleurs, il existe des triterpènes représentées par des squelettes mono-, bi-, tri- et hexacycliques ainsi que par des structures acycliques ; la formation de ces dernières structures étant régie par un mécanisme différent.

Parmi les triterpènes et stérols du genre *Cirsium*, certains sont retrouvés chez plusieurs espèces de *Cirsium*, notamment des triterpènes pentacycliques : lupéol (lupane), taraxastérol (tarastane), β-amyrine (oléanane) et des stérols (β-sitostérol et stigmastérol) (Jordon-Thaden *et al.*, 2003) (figure 27). Ces molécules possèdent un large panel d'activités biologiques.

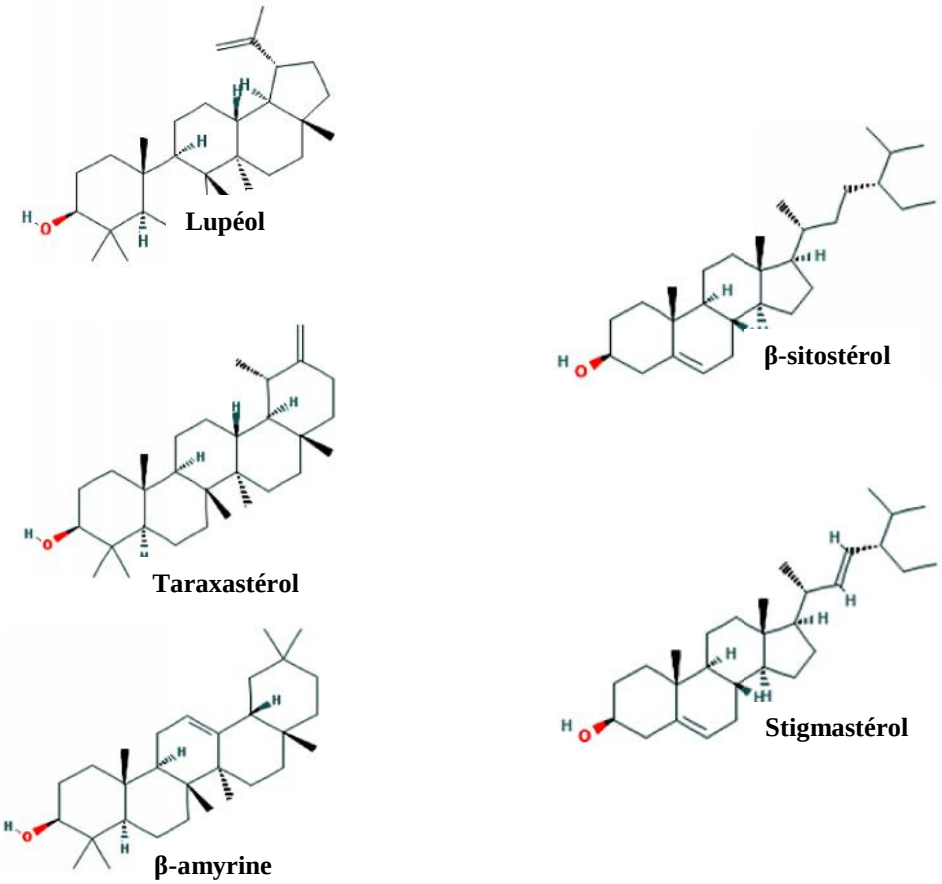


Figure 27. Exemples de triterpènes retrouvés dans plusieurs espèces de *Cirsium*.

Enfin, on trouve aussi dans le genre *Cirsium* des acides phénoliques et des alcaloïdes. Il a été également rapporté la présence de polyacétylènes et d'hydrocarbures dans les racines. En revanche, les lactones sesquiterpéniques qui sont en général bien distribuées chez les *Asteraceae*, ne sont pas très connues dans le genre Cirsium (Jordon-Thaden *et al.*, 2003).

RESULTATS

Délimitation du sujet et démarche générale. La stratégie de recherche de nouvelles substances actives au sein du règne végétal met souvent en jeu des enquêtes ethnobotaniques. Cependant, d'autres modes de sélection des plantes existent : les plantes extrêmophiles, soumises à des contraintes principalement abiotiques, en sont un bon exemple. Les plantes halophytes et xérophytes connues notamment pour leur système antioxydant puissant apparaissent comme des ressources prometteuses en molécules bioactives, notamment en polyphénols. En raison de leurs activités antioxydantes, ces métabolites secondaires peuvent avoir des effets pharmacologiques chez l'Homme, notamment dans la prévention des maladies liées au stress oxydant telles que les cancers. Toutefois, les potentialités thérapeutiques des plantes halophytes et xérophytes ne se limitent pas à leur pouvoir antioxydant ; ce sont également des antimicrobiens prometteurs, capables d'agir sur différents agents pathogènes en santé humaine, animale et végétale.

Nous avons donc exploré les potentialités biologiques de 8 plantes halophytes et xérophytes prélevées en Tunisie, On distingue 5 halophytes : *Silene succulenta* Forssk. (Caryophyllacées) ; *Atriplex tatarica* L. (Amaranthacées) ; *Aeluropus littoralis* (Gouan) Parl. (Poacées) ; *Limonium virgatum* (Willd.) Fourr. (Plumbaginacées) ; *Juncus maritimus* Lam. (Juncacées) ; de 3 xérophytes: *Atractylis serratuloides* (Cass.) DC. (Asteracées), *Scabiosa maritima* L. (Caprifoliacées) et *Cirsium scabrum* (Poir.) Bonnet & Barratte (Asteracées).

Un premier travail de criblage (chapitre **I**) porte sur les effets biologiques de ces plantes en santé humaine, en analysant les activités antiradicalaire, cytotoxique (sur une lignée cancéreuse de macrophages dérivés d'un réticulosarcome de souris, J774, et sur une lignée non-cancéreuse, WI-38), antibactérienne (sur 35 souches Gram + et -, et une levure), antivirale (virus de l'hépatite C), mais aussi en évaluant leurs richesse en polyphénols. Au terme de ce criblage, les plantes les plus actives ont été ciblées ; il s'agit principalement d'une xérophyte, *Cirsium scabrum* (activité cytotoxique), et de deux halophytes *Limonium virgatum* (activité antiradicalaire et antibactérienne) et *Juncus maritimus* (activité antiradicalaire, antibactérienne et antivirale). Pour ces trois plantes, un fractionnement bioguidé a été réalisé. Certains sous-extraits et certains composés responsables des activités biologiques de *Limonium virgatum* ont été caractérisés (chapitre **I**). Un fractionnement bioguidé a aussi été réalisé sur *Cirsium scabrum* au terme duquel, les composés responsables de son activité cytotoxique ont été déterminés (chapitre **II)**.

Par la suite, le fractionnement de *Juncus maritimus* a été bioguidé à la fois par l'activité antiradicalaire et par l'activité antimicrobienne. Le composé responsable de son activité antiradicalaire a été mis en évidence dans le chapitre **I**. L'analyse des activités antivirale et antibactérienne de *J. maritimus* est par contre développée dans le chapitre **III**. Les composés les plus actifs ont été identifiés ; le mécanisme d'action du composé responsable de l'activité antivirale a été caractérisé.

Dans une dernière partie, un criblage de ces 8 plantes halophytes et xérophytes a porté sur leurs effets biologiques en santé végétale. Nous avons notamment évalué leurs effets sur l'agent causal le plus fréquent de la septoriose du blé (*Zymoseptoria tritici*). De plus, une exploration de l'effet des conditions édaphiques et physiologiques sur les propriétés antifongiques de *J. maritimus* a été initiée. Les résultats sont détaillés dans le chapitre **IV**.

I. Criblage biologique des plantes halophytes et xérophytes et initiation du fractionnement bioguidé pour les plantes les plus actives

Résumé détaillé

Cette étude met en avant le caractère antioxydant et antimicrobien des plantes extrêmophiles pour appuyer les approches écologiques dans le domaine de la recherche de substances biologiquement actives qui, généralement favorise les démarches ethnobotaniques.

Pour ce faire, un criblage a été élaboré sur une sélection de 8 plantes extrêmophiles, dont 3 xérophytes (*Atractylis serratuloides*, *Cirsium scabrum* et *Scabiosa maritima*) et 5 halophytes (*Limonium virgatum*, *Juncus maritimus*, *Silene succulenta*, *Atriplex tatarica* et *Aeluropus littoralis*), pour évaluer leur pouvoir antiradicalaire et leur richesse en polyphénols, ainsi que leurs potentielles activités antibactérienne, antivirale et cytotoxique.

Les différents organes de ces plantes (sauf pour *A. serratuloides*, *A. tatarica* et *A. littoralis*) ont été broyés séparément. Les extraits bruts méthanoliques ont ensuite été préparés par macération. La détermination du contenu en polyphénols totaux et l'évaluation de l'activité antioxydante ont été effectués respectivement par des tests colorimétriques employant le réactif de Folin-Ciocalteu et le radical stable DPPH°. L'évaluation des activités antibactériennes de l'ensemble des extraits a été réalisée sur une collection de 36 souches microbiennes (36 bactéries Gram + et - ; et 1 levure) par la méthode de diffusion en milieu solide et en utilisant un inoculateur à tête multiples. Pour l'évaluation de l'activité antivirale, nous nous sommes intéressés au virus de l'hépatite C (VHC), responsable d'une affection hépatique qui touche environ 170 millions de personnes dans le monde. L'effet des extraits sur l'infection virale d'une lignée de cellules de foie humain immortalisées (Huh-7), a été estimé par immunofluorescence. Le test de cytotoxicité porte sur une lignée cellulaire cancéreuse (J774) en comparaison avec une lignée cellulaire saine (WI-38) ; la mesure de la prolifération cellulaire repose sur le test MTT.

Ce criblage a permis de cibler en particulier trois plantes, *Juncus maritimus*, *Limonium virgatum* et *Cirsium scabrum*. L'extrait des feuilles de *C. scabrum* (CSL-CE) a montré l'activité cytotoxique le plus marquée, avec une action antiproliférative sélective contre la lignée cellulaire J774 (CI_{50} = 1,53 µg/mL ; index de sélectivité = 2,6). *Juncus maritimus* et *Limonium virgatum* ont montré d'autres activités intéressantes (antiradicalaire,

antibactérienne et antivirale). Ces espèces ont, par conséquent, été sélectionnées pour initier un fractionnement bioguidé permettant de mieux comprendre leurs potentialités.

Pour *L. virgatum*, les extraits bruts méthanoliques des tiges (LVS-CE) et des feuilles (LVL-CE) ont montré les activités antiradicalaires les plus élevées (CI_{50} = 7,56 pour LVS-CE et CI_{50} = 7,59 µg/mL pour LVL-CE) et se sont montrés comme étant les plus riches en polyphénols totaux (LVS-CE = 37,0 mg eq AG/g extrait et LVL-CE = 31,6 mg eq AG/g extrait). De plus, LVS-CE et LVL-CE ont montré un potentiel antibactérien, bien qu'assez faible (500 µg/mL < CMI < 1000 µg/mL), à spectre d'activité antibactérienne assez large (bactéries Gram- et +). Un fractionnement bioguidé a été réalisé à partir des extraits LVS-CE et LVL-CE par extraction liquide-liquide permettant d'obtenir quatre sous-extraits pour chacun des deux extraits : dichlorométhane (LVS-MC et LVL-MC), acétate d'éthyle (LVS-EA et LVL-EA), butanoliques (LVS-But et LVL-But) et aqueux (LVS-H_2O et LVL-H_2O). Ces sous-extraits ont été testés pour déterminer ceux responsables des activités antiradicalaire et antibactérienne.

L'activité antiradicalaire la plus élevée a été enregistrée pour LVL-EA (CI_{50} = 6,62 µg/mL), sous-extrait le plus riche en polyphénols (32,39 mg eq AG/g d'extrait). Les sous-extraits, LVS-But et LVL-But, ont aussi montré des activités antiradicalaires intéressantes (CI_{50} = 7,01 µg/mL et 9,95 µg/mL respectivement). La teneur en tanins a été aussi analysée pour l'ensemble des sous-extraits montrant que les deux sous-extraits butanoliques (LVS-But et LVL-But) sont riches en tanins. Le genre *Limonium* se caractérise par une grande richesse et diversité en polyphénols, et particulièrement en flavonoïdes ; la présence de tanins a aussi été mis en évidence (Medini et *al*., 2011 ; 2014). Ces composés sont largement connus pour leurs propriétés antioxydantes suggérant que l'activité antiradicalaire des extraits des feuilles et des tiges de *Limonium virgatum* est liée à la présence de ces molécules (LVS-But = 11,37 mg eq GA/g d'extrait sec et LVL-But = 10,8 mg eq GA/g extrait sec).

Dans un second temps, l'activité antibactérienne des sous-extraits obtenus à partir de LVS et LVL a été évaluée. Des activités élevées (CMI < 100 µg/mL) ont été observées pour LVS-MC et LVL-MC, avec une action sélective vis-à-vis des bactéries Gram +. L'activité la plus élevée (CMI = 39 µg/mL) a été enregistrée pour LVL-MC contre des souches de streptocoques et un staphylocoque. L'analyse des chromatogrammes à 320 nm de LVS-MC et LVL-MC a permis de distinguer trois pics majoritaires correspondants à 3 composés (C1, C2 et C3). Ces trois molécules ont été isolées directement par chromatographie liquide haute performance (CLHP)

préparative, puis leur structure a été élucidée par spectroscopie de masse (HR-MS) et par RMN.

Le composé C1 a ainsi été identifié comme étant le N-*trans*-feruloyl tyramine (figure 28). C'est un phénylpropanoïde qui possède différentes activités, notamment antimicrobiennes. Les données spectroscopiques de C2 montrent que sa structure est proche de celle de C1, mais les quantités disponibles n'ont pas permis l'élucidation complète de sa structure. Ces deux phénylpropanoïdes interviendraient dans le potentiel antibactérien de *L. virgatum*. C3 est par contre une contamination par un phtalate.

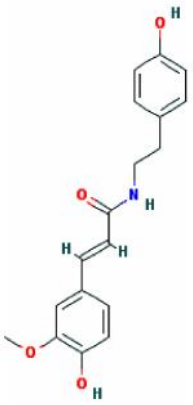


Figure 28. Structure chimique du N-*trans*-feruloyl tyramine

L'extrait brut méthanolique des rhizomes de *J. maritimus* (JMR-CE), a montré une activité anti-radicalaire modérée (CI_{50} = 45,23 µg/mL) et une teneur en polyphénols relativement intéressante (5,63 mg eq AG/g d'extrait sec). Il s'est distingué par son potentiel antimicrobien ciblant un certain groupe de bactéries Gram-positif, et particulièrement *Streptococcus dysgalactiae* T46C14 (CMI = 78 µg/mL), mais surtout par son activité antivirale puissante contre le virus de l'hépatite C (plus de 85% d'inhibition de l'infection). A partir de cet extrait, une extraction liquide-liquide suivie de l'évaluation des activités biologiques des différents sous-extraits obtenus (sous-extrait dichlorométhane JMR-MC ; sous-extrait acétate d'éthyle JMR-EA ; sous-extrait aqueux JMR-H_2O) ont été effectuées. Le sous-extrait JMR-EA a montré le contenu en polyphénols et l'activité antiradicalaire les plus élevés (CPT = 16,53 mg eq GA/g extrait sec; CI_{50} = 5,47 µg/mL), Le composé responsable de l'activité antiradicalaire a été directement isolé à partir de JMR-EA par chromatographie de partage centrifuge (CPC).

L'analyse par RMN et par HR-MS a permis d'identifier ce composé comme étant la lutéoline (figure 29), une flavone largement connue pour son activité antioxydante.

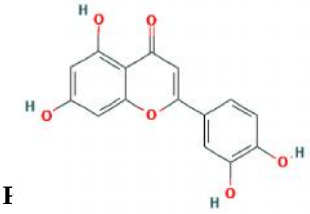


Figure 29. Structure chimique de la lutéoline

Le sous-extrait JMR-MC s'est montré quant à lui, plutôt responsable des activités antibactérienne (particulièrement active contre *Streptococcus dysgalactiae* T46C14 avec une CMI à 39 µg/mL) et antivirale (plus de 98% d'inhibition de l'infection du virus de l'hépatite C). Les activités antivirale et antibactérienne de *J. maritimus*, s'appuyant sur un fractionnement bioguidé, seront développées dans le **chapitre III**.

Contribution personnelle. Cette étude est le fruit d'un long travail de recherche et de sélection des plantes. En effet, j'ai recherché et investigué plusieurs terrains favorables au développement de plantes halophytes et xérophytes. J'ai effectué l'échantillonnage et la mise en herbier. J'ai réalisé le travail de recherche bibliographique qui a abouti à la sélection des 8 plantes étudiées dans ce travail. J'ai aussi collecté les échantillons en quantité et réalisé le travail d'extraction, y compris la mise au point du protocole d'extraction, la préparation des échantillons des plantes (broyage, séchage) et la préparation des extraits. Les autres contributions que j'ai apportées concernent la réalisation des tests d'activités biologiques, précisément les tests d'activité antiradicalaire et antibactérienne, mais aussi le travail complet de fractionnement et de purification des molécules. J'ai notamment effectué les extractions liquide-liquide, la recherche des gradients en CLHP analytique (pour l'analyse qualitative des extraits) et préparative (pour séparer C1, C2 et C3 en une seule étape). J'ai également déterminé le système de solvants adéquat pour la purification de la lutéoline en une seule étape par CPC.

An ecological approach to discover new bioactive extracts and products:

The case of extremophile plants

Ramla Sahli[a,b], Céline Rivière[a*], Christel Neut[c], Joanne Bero[d], Marie-Emmanuelle Sahuc[e], Smaoui Abderrazak[b], Claire Beaufay[d], Vincent Roumy[a], Thierry Hennebelle[a], Yves Rouillé[e], Joelle Quetin-Leclercq[d], Karin Séron[e], Riadh Ksouri[b], Sevser Sahpaz[a]

[a]Univ. Lille, INRA, ISA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, EA 7394 – ICV, Institut Charles Viollette, F-59000 Lille, France, [b]The Laboratory of Aromatic and Medicinal Plants, Biotechnology Centre of Borj-Cédria (CBBC), Hammam-lif, Tunisia, [c]UDSL, INSERM U995, UFR Pharmacie, F-59000 Lille, France, [d]Pharmacognosy Research Group, Louvain Drug Research Institute, Université Catholique de Louvain, Avenue E. Mounier, 72, B-1200 Brussels, Belgium, and [e]Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 8204 – CIIL, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, F-59000 Lille, France

Correspondence: Céline Rivière, EA 7394 - ICV, Institut Charles Viollette, Laboratory of pharmacognosy, Faculty of pharmacy University of Lille 2 – 3 rue du Pr. Laguesse, B.P. 83, 59006 Lille Cedex, France
E-mail: celine.riviere-3@univ-lille2.fr

Abstract

Objectives Eight extremophile plants from Tunisia were screened in order to find natural products with benefits in human health.

Methods These plants were collected in different areas in Tunisia. Their methanolic extracts were evaluated for their total phenolic content, and for their antiradical (DPPH), antimicrobial (on 35 bacteria and 1 yeast), antiviral (hepatitis C virus, HCV), and cytotoxic activities (against WI38 and J774 cell lines). The most active species were subjected to a bioguided fractionation.

Key findings The screening revealed promising activities for four plants, but two species have both antiradical and antimicrobial activities: *Juncus maritimus* and *Limonium virgatum*. The rhizomes extract of *J. maritimus* showed the highest activity against HCV, a selective antibacterial activity against *Streptococcus dysgalactiae*, and a moderate antiradical activity which is due to luteolin isolated in one step by centrifugal partition chromatography. The stems and leaves extracts of *L. virgatum* were rich in polyphenols responsible for the antiradical activity. Also, *Limonium* extracts showed an antibacterial activity with a broad spectrum.

Conclusions Extremophile plants have proven to be a promising source for bioactive metabolites. They have a powerful antioxidant system highly influenced by biotic and abiotic factors and the ability to produce secondary metabolites with antimicrobial activities.

Keywords: extremophile plants; antiradical activity; antibacterial activity; antiviral activity; cytotoxic activity.

Introduction

Natural products from plant species maintain a strong position in the drug discovery. Even if natural products are not always used directly as medicines, they often remain a source of inspiration for medicinal chemistry (natural products with semisynthetic modifications, pharmacophore with natural origin). [1] Plant species are selected by random screening programs or by more focused selection programs, such as chemotaxonomy or ethnopharmacology. According to an ethnopharmacology approach, medicinal plants constitute a source of bioactive products because their use is validated by therapeutic experiences, passed down from generation to generation, leading to a drug discovery process much easier and safe. [2,3] But, drug discoveries were not systematically based on traditional plant uses. In fact, many plants, not recognized for a medicinal use, may also be a rich source of medicines, referred to as an ecological approach in this case, because they produce many bioactive molecules implicated in chemical defences of the plant against biotic and abiotic constraints. Extremophile plants are a good example of this kind of plants. Unlike other vascular plants, they are able to grow under some severe environmental constraints capable of triggering an oxidative stress. Stress conditions increase production and accumulation of reactive oxygen species (ROS) in plants, leading to cellular damage, metabolic disorders, and senescence processes. [4] Extremophile plants are known for their ability to withstand and quench these toxic ROS, since they are equipped with a powerful antioxidant system. [5,6] Interestingly, many of these natural antioxidants have proved to be very useful in human health field. [7] The oxidative damage created by free radical generation is a critical aetiological factor implicated in several chronic human diseases such as cancer and infectious diseases. [8] Several extremophile plants were reported to contain some key-compounds in prevention of these diseases. [7] Furthermore, these plants constitute a well-known source of natural antimicrobial agents. Indeed, their capacities to produce phytoalexins and to resist to

infections are often the consequences of their biosynthetic machinery. [7] Thus, extremophile plants can be a source of new bioactive compounds to fight the resistant pathogenic bacteria to a range of formerly efficient antibiotics and to combat the current emergence of new infectious diseases.

Extremophile plants, especially halophytes and xerophytes, constitute a major part of the country flora in Tunisia. In fact, arid (average annual temperature above 30°C and average annual rainfall under 100 mm) and semi-arid (moderate winters and average annual rainfall rarely above 300 mm) regions cover about two-third of the total area of the country. Also, 1.5 million ha (10% of the whole territory) are affected by salt. [7]

In this context, our study was undertaken to screen Tunisian extremophile plants for their antiradical, antibacterial, antiviral and cytotoxic activities. Eight plants were selected for this work, including 3 xerophytes: *Atractylis serratuloides* (Cass.) DC. (Asteraceae), *Cirsium scabrum* (Poir.) Bonnet & Barratte (Asteraceae), *Scabiosa maritima* L. (Caprifoliaceae); and 5 halophytes: *Limonium virgatum* (Willd.) Fourr. (Plumbaginaceae), *Juncus maritimus* Lam. (Juncaceae), *Silene succulenta* Forssk. (Caryophyllaceae), *Atriplex tatarica* L. (Amaranthaceae), *Aeluropus littoralis* (Gouan) Parl. (Poaceae). To our knowledge, no reports on the chemical composition and on the biological activities of these species have been provided in the literature so far. The few studies available are focused on other aspects. [9-11]

Materials & Methods

Plant materials

All plants were identified by Dr Abderrazak (Biotechnology Centre of Borj-Cédria). Voucher numbers are indicated in brackets: *Atractylis serratuloides* (167), *Cirsium scabrum* (181),

Scabiosa maritima (182), *Silene succulenta* (183), *Juncus maritimus* (184), *Limonium virgatum* (185), *Atriplex tatarica* (186) and *Aeluropus littoralis* (187).

Plant n°1 was collected in February 2013 in the South of Tunisia, whereas plants n°2 and n°3 were collected in August 2013 in the North of Tunisia (Goubella). These plants are xerophytes, while all other plants (4-8) are halophytes and were collected in October 2013 in the North-East of Tunisia (Soliman).

Preparation of the plant extracts

Collected plant materials were dried at 25°C for a week. Different parts of these plants were powderized separately (Table 1) and extracted by maceration at room temperature (methanol; 15 ml/g; 3 x 48 h). Extracts were dried in vacuum at 35 °C, then suspended in water and lyophilized. Percentage yields are listed in Table 1.

Determination of total polyphenol content (TPC)

TPC was measured by the Folin-Ciocalteu method described by Lixiang *et al.* [12] Briefly, an aliquot of 0.25 ml of an appropriate diluted extract (5% acetone in water) was mixed with 1.25 ml of Folin-Ciocalteu reagent ($1/10^{th}$). After 2 min, 1 ml of a Na_2CO_3 solution (145 g/l) was added and the mixture was left at 50°C for 5 min. The absorbance was measured at 760 nm against a blank. A calibration curve of gallic acid (0 to 100 µg/ml) was prepared. Total polyphenol content was expressed as mg gallic acid equivalent per gram of sample on a dry weight basis (mg eq GA/g extract DW). Green tea leaves methanolic extract was employed as positive control.

Determination of tannin content (TC)

TC determination was achieved according to the hide powder method. [13,14] The extracts (10 mg/ml) were mixed with 8 mg of hide powder. The suspensions were stirred for 40 min and were filtered. The remaining phenolic sample (TPwT) solution was analysed by the Folin-Ciocalteau method. TC is calculated as a difference of absorbance at 760 nm between TPC and TPwT.

***Juncus maritimus* and *Limonium virgatum* extracts analysis**

General

NMR spectra were recorded on a Bruker DPX-500 spectrometer (^{1}H and ^{13}C NMR at 500 MHz) in methanol-d4 and chloroform-d6. HRMS analyses were carried out in positive and negative modes with a range of *m/z* 100-1000, using a Thermo Fisher Scientific Exactive Orbitrap mass spectrometer equipped with an electrospray ion source. The vaporizer temperature of the source was set at 100 °C, the nitrogen sheath gas at 10-20, and the auxiliary gas at 2-6 (arbitrary units). Analytical HPLC was carried out using a Shimadzu binary LC-10AS pump, a SCL-10A UV-visible detector and a Vision HT Basic C18 (5 µm, 250 x 4 mm) column (Grace, Epernon, France). Preparative HPLC was performed using Shimadzu HPLC system equipped with a LC-20AP binary high-pressure pump, a SPD-M20A photodiode array detector and a VisionHT Basic C18 (5 µm, 250 × 22 mm) column. For HPLC analyses, the mobile phase was composed of 0.01% formic acid in water (solvent A) and acetonitrile (ACN) (solvent B). Centrifugal partition chromatography (CPC) was performed using a 250 ml rotor (SCPC-250-L) provided by Armen instrument (Saint-Avé, France). The solvents were pumped by a Shimadzu Prominence LC-20AP binary pump.

Liquid-liquid extraction

Rhizomes crude extract of *Juncus maritimus* (100 g) was suspended in water (60 ml) and partitioned with methylene chloride (10 × 60 ml) and then with ethyl acetate (10 × 60 ml). The combined partitions were concentrated at 35°C under reduced pressure to give a methylene chloride partition (JMR-MC = 7%) and an ethyl acetate partition (JMR-EA = 23.3%). The remaining aqueous partition was freeze-dried and lyophilized (JMR-H_2O = 11%).

Stems and leaves crude extracts of *Limonium virgatum* (100 g) were also suspended in water (60 ml) and extracted sequentially ten times with increasing polarity solvents (60 ml) giving methylene chloride (LVS-MC = 6.2%; LVL-MC = 8%), ethyl acetate (LVS-EA = 10.6%; LVL-EA = 12,3%) and n-butanol (LVS-But = 22.1%; LVL-But = 23.8%) partitions after removal solvents. The remaining aqueous partition was lyophilized (LVS-H_2O = 18.8%; LVL-H_2O = 20.8%).

HPLC-UV analysis

20 µl of samples (10 mg/ml, MeOH) were injected through the HPLC system (1 ml/min) using two gradient elution programs: gradient 1 (*L. virgatum*): 10-39.5% B (0-44 min), 39.5-92% B (44-45 min), 92-100% B (45-60 min); gradient 2 (*J. maritimus*): 10-38% B (0-30 min), 38% B (30-40 min), 38-45% B (40-45 min), 45-51% B (45-47 min), 51-95% B (47-48 min), 95-98.8% B (48-62 min), 98.8–100% B (62-63 min).

Preparative HPLC experiment

Preparative HPLC was performed on the methylene chloride partition of *L. virgatum* (LVS-MC) obtained after liquid/liquid extraction (LLE). 200 mg of LVS-MC solubilized in MeOH were injected (14 ml/min) using the following gradient elution program: 16% B (0-26 min), 28% B (26-32 min), 28-97.5% B (32-42 min), 97.5-100% B (42-60 min).

CPC experiment

CPC was performed for the purification of luteolin from the ethyl acetate partition of *J. maritimus* (JMR-EA) obtained after LLE. Ten quaternary biphasic solvent system Arizona were tested in order to choose the optimal system. [15] Arizona K (n-Hept/EtOAc/MeOH/H_2O; 1:2:1:2; v/v/v/v) was used on JMR-EA (180 mg) in ascending mode (50 min). Fractions of 8 ml were collected every min. 12 sub-fractions were then pooled according to TLC.

Evaluation of antiradical activity

The antiradical activity was determined according to Aquino *et al.* [16] using the stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH°, Sigma, France). 50 µl of extract (40 µg/ml) were added to 2.5 ml of freshly prepared DPPH° solution (25 µg/ml). MeOH (50 µl) was added to the same DPPH° solution and was used as control ($DPPH°_0$). After 20 min, absorbances were measured at 515 nm against a blank on a Biowave II WPA spectrophotomer (Serlabo Technologies). A calibration curve was obtained after linear regression of DPPH° (1 to 50 µg/ml). The percentage of remaining DPPH° was calculated as follows:

$$\% DPPH°_{REM} = [DPPH°_{20min}]/[DPPH°_0] \times 100$$

IC_{50} was determined for the most active plants and for rutin (positive control), by testing several concentrations (10 to 100 µg/ml for extracts; 1.25 to 40 µg/ml for partitions and rutin).

Antimicrobial activity

The antimicrobial activity was evaluated against 36 pathogenic microorganisms according to Mahamodo *et al.* [17]. The 36 microorganisms were grown overnight at 37°C on sloping Mueller-Hinton (MH) agar medium. The bacteria were diluted with Ringer's Cysteine (RC) solution to obtain 10^6 bacteria/ml. In Petri dishes, 19 ml MH II agar was supplemented with 1 ml of stock solution of extracts (12.5 mg/ml to 0.39 mg/ml) or antibiotics (gentamicin, vancomycin, amoxicillin) and amphotericin B (28 mg/ml to 6.10^{-3} mg/ml), giving final

concentrations from 625 to 19.5 µg/ml for the extracts and 64 to 0.03 µg/ml for controls. Inocula of 10^4 colony forming units (CFU) were spotted ultimately with a multipoint inoculator (Steers Replicator).

Antimicrobial activity was tested on the following reference strains from the collection of the laboratory of bacteriology (INSERM U995), obtained recently by clinical isolation and that reflect the pathologies encountered today in hospitals:

Gram – bacteria: *Citrobacter freundii* 11041, *C. freundii* 11042, *Escherichia coli* 8138, *E. coli* 8157, *E. coli* ATCC 25922, *Enterobacter aerogenes* 9004, *Enterobacter cloacae* 11050, *E. cloacae* 11051, *E. cloacae* 11053, *Klebsiella pneumoniae* 11016, *K. pneumoniae* 11017, *Serratia marcescens* 11056, *S. marcescens* 11057, *P. mirabilis* 11060, *Providencia stuartii* 11038, *Salmonella sp.* 11033, *Acinetobacter baumanii* 9010, *A. baumanii* 9011, *Pseudomonas aeruginosa* 8131, *P. aeruginosa* ATCC 27583, *Stenotrophomonas maltophilia, Yersinia pseudotuberculosis* 2777; Gram + bacteria: *Enterococcus faecalis* C159-6, *Enterococcus sp* 8153, *Staphylococcus epidermidis* 10282, *Staphylococcus epidermidis* 5001, *Staphylococcus aureus* 8146, *Staphylococcus aureus* 8147, *Staphylococcus lugdunensis* T26A3, *Staphylococcus warneri* T12A12, *Corynebacterium* T25-17, *Mycobacterium smegmatis* 5003, *Streptococcus agalactiae* T 25-7, *Streptococcus dysgalactiae* T46C14, *Streptococcus agalactiae* T 53C2; Yeast: *Candida albicans* 10286.

Antiviral activity against hepatitis C virus (HCV)

Plant extracts were assessed against HCV infection according to Galani *et al*. [18] using a modified JFH1 (Japanese Fulminant Hepatitis-1) virus. [19,20] The viral stock (5.10 focus forming unit/ml) was produced in Huh-7 hepatoma cells. [21] The day before infection, Huh-7 cells were plated in 96-well plates at 6000 cells/well. Plant extracts were added at 25 µg/ml (DMSO) during both the 2 h inoculation step and the 28 h post-inoculation step. DMSO

(0.01%) was employed as control. Infected cells were fixed and submitted to immunofluorescence labeling with an anti-E1 envelope glycoprotein antibody with Cy3-conjugated goat anti-mouse IgG [22]. The total number of cells at the end of the experiment was determined by staining of nuclei with 1 µg/ml DAPI.

Cytotoxicity assays

The cytotoxicity was evaluated on WI38 (normal human fibroblast) and on J774 (macrophage-like cells derived from BALB/c murine reticulum cell sarcoma) cell lines as described by Bero *et al.* [23], using the tetrazolium salt MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5 diphenyltetrazolium bromide (Sigma)) colorimetric method. Briefly, WI-38 or J774 were seeded in 96-well plates (5000 cells/well) containing 100 µl of medium (DMEM containing 4mM L-glutamine and 1mM sodium pyruvate (Gibco) or RPMI 1640 containing 2mM L-glutamine (Sigma)) supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (Gibco) and penicillin-streptomycin (100 UI/ml). After 24 h, the medium was removed and cells were treated with 200 µl of plant extracts solutions at a fixed concentration of 50 µg/ml to calculate cell viability percentage.

Cell viability % = [AT/ANT] x 100, with A: absorbance, NT: control cells, T: treated cells.

When this percentage is inferior to 50%, an IC_{50} is calculated with a concentration range of 0.023-50 µg/ml obtained from a 20 mg/ml DMSO stock solution diluted in fresh medium. The medium was replaced after 72 h of incubation by 100 µl of 10% MTT solution (3 mg/ml in PBS) in medium. After 45 min, the medium was removed again and 100 µl of DMSO were added to solubilize formed formazan crystals. Absorbance was recorded at 570 nm and 620 nm. Camptothecin (Sigma) was used as positive control (concentration range: 0.00032-25 µg/ml). Each sample was tested in eight serials three fold dilutions in 96-well microtiter plates, with three wells per concentration. All experiments were made at least in duplicate.

The highest concentration of solvent to which the cells were exposed was 0.25%, which was shown to be non-toxic.

Statistical analysis

Statistical calculations were carried out with Prism statistical software (Graph Pad Inc.). Results are expressed as the mean ± SEM (Standard Error of the Mean) (antiviral and cytotoxicity assays) or as the mean ± SD (Standard Deviation) (total polyphenol content and antiradical activity) of at least three independent experiments with individual values. Non-parametric Kruskal-Wallis test was used for statistical comparison of groups of data. Then, individual differences between treatments were identified using Dunn's test as a post hoc test.; *P* values < 0.05 were considered as significantly different from the control.

Results

Screening results

Eight extremophile plants were collected in different areas in Tunisia, including 3 xerophytic plants and 5 halophytic plants. 16 crude methanolic extracts were prepared from different parts of these plants. These extracts were evaluated for their antiradical, antimicrobial (on 35 bacteria and 1 yeast), antiviral (hepatitis C virus, HCV), and cytotoxic activities (against WI38 and J774 cell lines).

Total polyphenol content and antiradical activity of plant extracts

16 crude methanolic extracts were evaluated for their total polyphenol content and for their antiradical activity. Results are summarized in Figures 1 and 2. Among the 16 crude methanolic extracts, only *Limonium virgatum* (stems and leaves) and *Juncus maritimus*

(rhizomes) extracts have an antiradical activity. All other samples did not significantly reduce the free radical DPPH°.

Stems and leaves methanolic extracts of *L. virgatum* (LVS-CE and LVL-CE) showed the highest DPPH° free radical scavenging activities with IC_{50} values of 7.56 and 7.59 µg/ml, respectively. The similar antiradical activity of these two extracts is correlated with their similar total polyphenol content (TPC: LVS-CE = 37.0 mg eq GA/g extract DW and LVL-CE = 31.6 mg eq GA/g extract DW).

The methanolic extract of *J. maritimus* rhizomes (JMR-CE) showed a moderate antiradical activity (IC_{50} = 45.23 µg/ml). This extract had also a moderate TPC (5.63 mg EAG/g extract DW).

Antimicrobial activity of plant extracts

The antimicrobial activity of all crude methanolic extracts was evaluated against a panel of 36 pathogenic microorganisms (22 Gram-positive bacteria, 13 Gram-negative bacteria and 1 yeast) by means of a multiple inoculator. The data in Table 2 give Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) values of only active crude extracts (MIC < 1000 µg/ml). *Limonium* and *Juncus* extracts showed the highest activities. LVS-CE and LVL-CE showed a low antimicrobial activity (500 µg/ml < MIC < 1000 µg/ml), but a broad spectrum activity (MIC = 625 µg/ml against several strains of Gram + and Gram - bacteria). The most interesting antibacterial activities of these extracts were against a multi-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa* ATCC 27583: MIC = 625 µg/ml) and against a strain of *Escherichia coli* (*E. coli* 8157: MIC = 312 µg/ml).

JMR-CE showed a selective action against Gram-positive bacteria, in particular against the three multi-resistant strains of *Streptococcus* and one strain of *Staphylococcus*

(*Staphylococcus lugdunensis* T26A3). Most interestingly, this crude extract showed a high activity against *Streptococcus dysgalactiae* T46C14 (MIC = 78 µg/ml).

Antiviral activity of plant extracts

The HCVcc inhibition assay enabled us to analyse the antiviral effect of the extracts during a complete viral life cycle. The results are presented in Figure 3. By comparison with the control, only few plant extracts showed a slight toxicity against Huh-7 hepatoma cells at 25 µg/ml, in particular *Silene succulenta* extracts (SSS-CE and SSL-CE). However, these *Silene* extracts showed a significant decrease in the number of HCVcc infected cells. Most interestingly, JMR-CE showed the highest effect, with more than 85% of inhibition in HCV infection, demonstrating a strong anti-HCV activity without toxicity. All other plant extracts displayed infection rates higher than 50%, indicating an absence of inhibition of HCV infection.

Cytotoxic activity of plant extracts

Plant extracts were analysed for their antiproliferative activity using the MTT assay on a cancerous cell line J774 compared to the one on a non-cancerous cell line WI38. Results were summarized in Figure 4. Three plant extracts showed cytotoxicity on the J774 cancerous cell line at lower concentrations than 50 µg/ml: *Silene* extracts (SSS-CE and SSL-CE) as well as leaves extract of *Cirsium scabrum* (CSL-CE) with respectively IC_{50} values of 47.59, 23.11, and 11.53 µg/ml. The cytotoxic activity of CSL-CE is particularly interesting because this extract showed the highest activity on J774 cell line that is also selective (IC_{50} = 29.89 µg/ml on WI38, selectivity index = 2.6), unlike for *Silene* extracts.

Bioassay-guided fractionation

Four plant species showed the most interesting activities at the end of the screening process. The crude extract of *Cirsium scabrum* leaves (CSL-CE) showed a selective cytotoxic activity on J774 cell line, whereas *Silene succulenta* crude extracts (SSS-CE and SSL-CE) showed a moderate and non-selective cytotoxicity on J774 cell line, as well as a moderate anti-HCV activity. *Juncus maritimus* and *Limonium virgatum* stood out for their high antimicrobial and antiradical activities. The crude extract of *J. maritimus* rhizomes (JMR-CE) had the highest activity against HCV and showed a selective antibacterial activity against *Streptococcus dysgalactiae* T46C14. It also had a moderate antiradical activity. Crude extracts of *L. virgatum* stems and leaves (LVS-CE and LVL-CE) showed the highest antiradical activities and a broad antibacterial spectrum against several strains of Gram + and Gram - bacteria. Bioguided fractionation was then initiated on JMR-CE, LVS-CE and LVL-CE to deepen the understanding of their bioactivities.

Juncus maritimus

JMR-CE showed a moderate antiradical activity, a selective antibacterial activity against *Streptococcus dysgalactiae* T46C14 and the highest activity against HCV. Bioguided fractionation was performed using a liquid-liquid fractionation. Three partitions were obtained: methylene chloride partition (JMR-MC), ethyl acetate partition (JMR-EA) and aqueous partition (JMR-H_2O). These three extracts were evaluated using the same antiradical, antibacterial and anti-HCV assays as for the screening process.

With respect to antiradical assays (Table 3), results showed that the ethyl acetate partition (JMR-EA) exhibited the highest antiradical activity with an IC_{50} value equal to 5.47 µg/ml. The major compound of this partition was isolated in one step by CPC using the Arizona

system K (Figures 6 and 7). HR-MS and NMR data analysis allowed its identification as luteolin. A high antiradical activity was then obtained for this compound (IC_{50} = 4.82 µg/ml).

Regarding antibacterial assays (Table 4), results showed that the activity of the JMR-CE against the Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* 8147, *Streptococcus agalactiae* T 25-7 and T 53C2) was due to the methylene chloride partition (JMR-MC). This partition was also active against other strains (*Staphylococcus aureus* 8146 and *Corynebacterium* T25-17) and is particularly active against *Streptococcus dysgalactiae* T46C14 with a MIC equal to 39 µg/ml. Bioautography performed on JMR-MC against *S. dysgalactiae* showed that the partition contains a large panel of compounds that seems to be active against the bacteria strain (data not shown).

Finally, the same partition (JMR-MC) was most likely responsible for the antiviral activity against hepatitis C virus with more than 98% of inhibition in HCV infection (Figure 8).

Limonium virgatum

Crude extracts of *L. virgatum* stems and leaves (LVS-CE and LVL-CE) showed the highest antiradical activities, correlated with their high total polyphenol content (TPC), exceeding those of the methanolic extract of green tea. They were also active against several Gram-negative and Gram-positive bacteria. Liquid-liquid partitioning yielded four partitions for both LVS-CE and LVL-CE: methylene chloride partitions (LVS-MC and LVL-MC), ethyl acetate partitions (LVS-EA and LVL-EA), butanol partitions (LVS-But and LVL-But), and aqueous partitions (LVS-H_2O and LVL-H_2O).

Results of antiradical assays (Table 5) showed that the butanol and ethyl acetate partitions of stems (LVS-But and LVS-EA) and leaves (LVL-But and LVL-EA) of this species had the highest antiradical activities. The best IC_{50} values were recorded for LVS-But and LVL-EA (7.01 µg/ml and 6.62 µg/ml respectively). These two partitions also showed the highest TPC

(30.87 mg eq GA/g extract DW and 32.39 mg eq GA/g extract DW respectively). By contrast, aqueous and methylene chloride partitions of the two organs had relative lower antiradical activities and lower total polyphenol content (Figures 9 and 10). The quantitative determination of total tannins showed that the butanol partitions of both *L. virgatum* organs were very rich in tannins (LVS-But = 11.37 mg eq GA/g extract DW and LVL-Bt = 10.8 mg eq GA/g extract DW), while the methylene chloride and ethyl acetate partitions had the lowest tannin contents (Figure 10).

Results of the antibacterial assays highlighted that LVS-EA and LVL-EA have a broad spectrum of action similar to those of the crude extract, but a low to moderate antibacterial activity (Table 6). By contrast, the methylene chloride partitions of the stems and of the leaves showed a high antibacterial activity, with a selective action against Gram-positive bacteria. LVS-MC was active against *Staphylococcus epidermidis* 5001 and *Streptococcus agalactiae* T25-7 (MIC = 78 µg/ml), whereas LVL-MC showed an antibacterial activity against a strain of *Corynebacterium* (MIC = 78 µg/ml) and against four other Gram-positive bacteria with a MIC value equal to 39 µg/ml: *Staphylococcus lugdunensis* T26A3, *Streptococcus dysgalactiae* T46C14, *Streptococcus agalactiae* T25-7 and *Streptococcus agalactiae* T53C2.

The comparison of the chromatograms at 320 nm of LVS-EA and LVS-MC allowed the detection of three major compounds: C1, C2 and C3 (Figure 11). These compounds were also detected in LVL-MC, but are identified in traces in LVL-EA. These compounds might be responsible for the antibacterial activity of LVS-MC and of LVL-MC. Thus, they were isolated by preparative HPLC. The compound C2 was isolated in sufficient quantity to determine its structure on the basis of HR-MS and NMR data. The HR-MS spectrum of C2 contained a monocharged ion peak $[M+H]^-$ at *m/z* 312.12402 corresponding to the molecular formula $C_{18}H_{19}O_4N$ (Δ = 3.150 ppm). The comparison of the 1D- and 2D-NMR data of C2 with those reported in literature allowed to identify this compound as N-*trans*-feruloyl

tyramine. [24] This phenolic amide was previously isolated from the roots of another *Limonium* species, *L. sinense*. [25] The ^{1}H spectrum of C1 was close to those of C2. This compound could also be a phenolic amide. The HR-MS spectrum gave a monocharged ion peak $[M+H]^-$ at *m/z* 311.16887, but the low quantity obtained for this product did not allow us to determine totally its structure. The HR-MS spectrum of C3 gave a monocharged ion peak $[M+H]^+$ at *m/z* 447.34694 corresponding to the molecular formula $C_{28}H_{46}O_4$ (Δ = 0.120 ppm). According to the NMR data, the compound C3 is of chemical nature completely different from C1 and C2, but it could be a contamination by the diisodecyl phthalate.

Discussion

Our study showed the great potential of extremophile plants to find bioactive extracts, in particular with antiradical and antimicrobial activities.

It had been reported that extremophile plants are equipped with a powerful antioxidant system, including polyphenols to overcome severe environmental conditions. [5] *Limonium virgatum* is a good example of extremophile plants with a high DPPHº free radical scavenging activity, correlated with a high total polyphenol content. This halophyte plant from the Plumbaginaceae family is not very encountered in Tunisia. To our knowledge, no reports on its chemical composition and on its biological activities have been provided in the literature so far. In our study, we showed that the antiradical activity of the stems and leaves extracts of *L. virgatum* is due to their high phenolic content (ethyl acetate and butanol partitions), but also to the rich content of tannins (mainly butanol partitions). Our findings are in agreement with the literature. In fact, several *Limonium* species are known to be rich in tannins [26-28] Siddhuraju *et al*. [29] reported that a high concentration of tannins increased the free-radical DPPH scavenging capacity. In addition, Plumbaginaceae family is chemically characterized

by the capacity to produce polyphenols, widely known for their antiradical potential. [30-32] Among the other extremophile plants tested, only *Juncus maritimus* showed a moderate antiradical activity. *J. maritimus,* a halophyte from the Juncaceae family, is well distributed in the coastal regions of Tunisia. To our knowledge, the majority of studies relating to *J. maritimus* do not deal with pharmacological and chemical aspects. In our work, we showed that the flowers and stems of this species had no activity while the rhizomes exhibited several antiradical and antimicrobial activities. From the most antiradical partition (ethyl acetate), we isolated luteolin in one step by CPC and we showed that this compound was mostly responsible for the antiradical activity of the rhizomes. Our results are in agreement with the literature. In fact, luteolin is a very common flavone, previously identified in other *Juncus* species, [33] known to have multiple biological effects including antioxidant activity. [34,35] The antiradical activities of the other extremophile plants are not described in the literature, except for *Atractylis serratuloides.* Our results are not in concordance with the literature for this plant. Bouaziz *et al*. [36] reported that a methanolic extract of *A. serratuloides* had a very high antiradical potential (IC_{50} = 4.11 mg/ml), while our sample did not show an antiradical activity (% remaining $DPPH^{o}$ = 86.7% at 40 µg/ml). Both samples were collected in South of Tunisia but at a different vegetative stage. This difference of conditions of collect could explain this difference of activity. In fact, the succession of seasons is coupled to an adjustment of the production of phenolic compounds to cover plant needs to each season. The antiradical activity is by consequence affected. [37] Moreover, the antioxidant system of extremophile plants is highly modulated by biotic and abiotic factors. [5]

J. maritimus and *L. virgatum* also showed an antimicrobial activity. First, *J. maritimus* rhizomes extract was found to have a selective activity against *Streptococcus dysgalactiae*, as well as an antiviral activity against HCV. *Streptococcus dysgalactiae* used in our study is a strain isolated from an osteomyelitis located in a diabetic foot. This Gram-positive bacterium

is a member of group C streptococci (GCS) that causes mastitis and polyarthritis in animals, and in rare cases, meningitis in humans. The clinical spectrum of diseases caused by this species is similar to that caused by *Streptococcus pyogenes*. [38] We also tested our plants against HCV because this virus is a major cause of chronic liver diseases. A new generation of effective anti-HCV drugs (viral protein inhibitors) is currently available, but they are very expensive and not accessible in developing countries. Also, the emergence of resistant HCV variants continues to be a public health issue. [39] In our study, we showed that the antimicrobial activity of *J. maritimus* was related to some compounds present in the methylene chloride partition. To our knowledge, no reports on antimicrobial activities of this species and on its chemical composition have been produced in the literature so far. However, some studies showed that a dihydrophenanthrene isolated from *J. roemerianus* had an antimicrobial activity, but not directed specifically against *S. dysgalactiae*. [40] From a chemotaxonomic point of view, *Juncus* species biosynthesise phenanthrenes and dihydrophenanthrenes. [41] Some studies demonstrated that several phenanthrenes were phytoalexins, accumulated in plants as a response to infection caused by pathogenic fungi [42]. The same studies also showed that these phenanthrenes possess an antimicrobial potential. Another study reported that dihydrophenanthrenes isolated from the ethyl acetate partition of *J. effusus* had an antiviral activity [43]. Taken together, these findings suggest that the methylene chloride partition of *J. maritimus* rhizomes is probably rich in phenanthrene derivatives with an antibacterial and antiviral potential.

The methylene partition of *L. virgatum* stems and leaves also showed a high antibacterial activity, with a selective action against some Gram-positive bacteria, in particular against some *Staphylococcus* and *Streptococcus* strains. This activity could be due to the presence of phenolic amides. These compounds could also explain the moderate antiradical activity of LVS-MC and LVL-MC. [24]

Aside from *J. maritimus* and *L. virgatum*, the screening process revealed a cytotoxic activity against a murine macrophage-like tumor cell line (J774) for two plants. These species were a xerophyte belonging to Asteraceae family, *Cirsium scabrum*, and a halophyte belonging to Caryophyllaceae family, *Silene succulenta*. This latter species also showed a toxicity against a human lung fibroblast cell line (WI38). More than 400 compounds, including phytoecdysteroids, sterols and saponins, have been isolated from *Silene succulenta* and other *Silene* species. [44-46] Biological investigations on phytoecdysteroids indicated their multiple activities, including antitumor potential. [44] Moreover, several saponins are well known for their toxicity, because they are powerful haemolytics *in vitro*. [47] The quantitative analysis of the saponins in our plant sample should deepen the understanding of its toxicity.

Unlike *S. succulenta*, *C. scabrum* showed a selective cytotoxicity against J774 compared to WI38. To our knowledge, no reports on chemical composition and on biological activities of *C. scabrum* have been provided in the literature so far. But, some studies showed that several compounds isolated from other *Cirsium* species, including *C. setidens* (24-hydroperoxycycloart-25-by-313-ol) [48], *C. japonicum* (flavones) [49] and *C. setosum* (α-tocopheroide, α-tocospiro C) [50], had cytotoxic activities against several cancer cell lines. Bioassay-guided fractionation is required to determine the compounds responsible for the cytotoxic activity of the crude methanolic extract of *C. scabrum.*

Conclusion

Eight extremophile plants from Tunisia were screened for their phenolic content and for some biological activities. This is the first report of the antiradical, antimicrobial, antiviral and cytotoxic activities of these eight species. We found that *Cirsium scabrum* and *Silene succulenta* had high cytotoxic activities. Most interestingly, *Juncus maritimus* and *Limonium*

virgatum showed multiple biological activities. *J. maritimus* rhizomes extract showed a moderate antiradical activity, a selective antibacterial activity against *Streptococcus dysgalactiae* and the highest activity against hepatitis C virus. We showed that luteolin was mostly responsible for the antiradical activity, while the presence of phenanthrene derivatives could explain the antimicrobial activities. The extracts of *L. virgatum* stems and leaves showed the highest DPPH radical scavenging activity related to the high content in polyphenols and tannins. Their methylene chloride partitions showed an antibacterial activity probably due to the presence of phenolic amides.

Acknowledgements

The authors are grateful to Jennifer Samaillie (Institut Charles Viollette), Severine Mahieux (INSERM U995), Maude Bourlet (Pharmacognosy Research Group, UCL) and Mike Howsam (CUMA) for their skillfull technical assistance. The authors wish to thank platforms of CUMA (University of Lille 2, Pr. J.F. Goossens) and LARMN (University of Lille 2, Pr. N. Azaroual) for access to equipment.

References

1. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* 2012; 75: 311-335.

2. Heinrich M, Gibbons S. Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential distribution. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53: 425-432.

3. Bero J et al. Antimalarial compounds isolated from plants used in traditional medicine. *J Pharm Pharmacol* 2009; 61: 1401-1433.

4. Menezes-Benavente L et al. Salt stress induces altered expression of genes encoding antioxidant enzymes in seedlings of a Brazilian indica rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci* 2004; 166: 323–331.

5. Ksouri R et al. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C R Biol* 2008; 331: 865–873.

6. Ksouri R et al. Responses of halophytes to environmental stresses with special emphasis to salinity. *Adv Bot Res* 2010; 53: 117–145.

7. Ksouri R et al. Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Crit Rev Biotechnol* 2012; 32(4): 289-326.

8. Inbathamizh L et al. *In vitro* evaluation of antioxidant and anticancer potential of *Morinda pubescens* synthesized silver nanoparticles. *J Pharm Res* 2013; 6: 32–38.

9. Haghighi L et al. Effect of NaCl on antioxidant enzymes and protein profile in halophyte *Aeluropus littoralis* leaves. *Adv Environ Biol* 2013; 7(9): 2229-2234.

10. Ribeiro H et al. Influence of natural rhizosediments characteristics on hydrocarbons degradation potential of microorganisms associated to *Juncus maritimus* roots. *Int Biodeter Biodegr* 2013; 84: 86-96.

11. Mandak B et al. How much genetic variation is stored in the seed bank? A study of *Atriplex tatarica* (Chenopodiaceae). *Mol Ecol* 2006; 15(9): 2653-2663.

12. Lixiang L et al. Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of Kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng. *Food Chem* 2009; 112: 35-41.

13. Official Methods of Analysis SLC-117, Determination of tannin matter absorbable by hide powder. Society of Leather Technologists and Chemists 1996.

14. Onem E et al. Optimization of tannin isolation from acorn and application in leather processing. *Ind Crops Prod* 2014; 53: 16–22.

15. Berthod A et al. Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. *Anal Bioanal Chem* 2005; 383: 327-340.

16. Aquino R et al. Phenolic constituents and antioxidant activity of an extract of *Anthurium versicolor* leaves. *J Nat Prod* 2001; 64: 1019-1023.

17. Mahamodo S et al. Antimicrobial prenylated benzoylphloroglucinol derivatives and xanthones from the leaves of *Garcinia goudotiana*. *Phytochemistry* 2014; 102: 162-168.

18. Galani BR et al. Plant extracts from Cameroonian medicinal plants strongly inhibit hepatitis C virus infection *in vitro*. *Front Microbiol* 2015; 6: 488.

19. Delgrange D et al. Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol* 2007; 88: 2495–2503.

20. Goueslain L et al. Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2010; 84: 773–787.

21. Nakabayashi H et al. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 1982; 42: 3858–3863.

22. Rouillé Y et al. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *J Virol* 2006; 80: 2832–2841.

23. Bero J et al. *In vitro* antiplasmodial activity of plants used in Benin in traditional medicine to treat malaria. *J Ethnopharmacol* 2009; 122, 439-444.

24. Forino M et al. NMR-based identification of the phenolic profile of fruits of *Lycium barbarum* (goji berries). Isolation and structural determination of a novel N-feruloyl tyramine dimer as the most abundant antioxidant polyphenol of goji berries. *Food Chem* 2016; 194: 1254-1259.

25. Lin LC et al. Anti-Herpes Simplex Virus Type-1 Flavonoids and a New Flavanone from the Root of *Limonium sinense*. *Planta Med.* 2000; 66: 333-336.

26. Saidana D et al. The *in vitro* free radical-scavenging and antifungal activities of the medicinal herb *Limonium echioides* L. growing wild in Tunisia. *J Food Process Preserv* 2013; 37: 533–540.

27. Uphof JC et al. Dictionary of Economic Plants 1959.

28. Rizk AM et al. The Phytochemistry of the Flora of Qatar 1986.

29. Siddhuraju P et al. Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): A preliminary assessment of crude extracts from stembark, leaves, flowers and fruit pulp. *Food Chem* 2002; 79: 61–67.

30. Paiva SR. Aspectos da Biologia celular e molecular de espécies de Plumbaginaceae. Dissertação *(Mestrado em Ecologia) – Museum Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro* 1999.

31. Murray AP et al. Antioxidant Metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Z Naturforsch. C* 2004; 59(7-8): 477-480.

32. Aniya Y et al. Free radical scavenging action of the medicinal herb *Limonium wrightii* from the Okinawa Islands. *Phytomedicine* 2002; 9: 239–244.

33. Dellagreca M et al. Antialgal Phenylpropane Glycerides from *Juncus effusus*. Nat Prod Res 1998; 12(4): 263–270.

34. Lin Y et al. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2008; 8: 634-646.

35. Rivière C et al. Polyphenols isolated from antiradical extracts of *Mallotus metcalfianus*. *Phytochemistry* 2009, 70: 86-94.

36. Bouaziz M et al. Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts of some wild plants collected from the south of Tunisia. *Afr J Biotechnol* 2009, 8(24): 7017-7027.

37. Jallali I et al. Changes in phenolic composition and antioxidant activities of the edible halophyte *Crithmum maritimum* L. with physiological stage and extraction method. *Acta Physiol Plant* 2012; 34: 1451-1459.

38. Brandt CM, Spellerberg B. Human Infections Due to *Streptococcus dysgalactiae* Subspecies *equisimilis*. *Clin Infect Dis* 2009, 49(5): 766-772.

39. Pawlotsky JM. Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antiviral Drugs in Interferon-Free Regimens. *Gastroenterology* 2016, 151:70–86.

40. Chapatwala KD et al. Antimicrobial activity of Juncusol, a novel 9,10-dihydrophenanthrene from the marsh plant *Juncus roemerianus*. *Life Sci* 1981; 29(19): 1997-2001.

41. *Kovács A et al. Natural phenanthrenes and their biological activity. Phytochemistry 2008; 69: 1084–1110.*

42. Fisch MH et al. Structure and antifungal activity of hircinol, loroglossol and orchinol. *Phytochemistry* 1973; 12: 437–441.

43. Dellagreca, M et al. Cytotoxic 9,10-dihydrophenanthrenes from *Juncus effusus* L. *Tetrahedron* 1993; 49(16): 3425–3432.

44. Mamadalieva NZ et al. Phytoecdysteroids from *Silene* plants: distribution, diversity and biological (antitumour, antibacterial and antioxidant) activities. *Boletín Latino americano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 2012; 11(6): 474-497.

45. Hanna AG, Soliman HSM. Fatty acids and sterols analysis of *Silene succulenta* Forssk. *Egypt J Food Sci* 1992, 20(3): 417-422.

46. Karawya MS et al. Saponins of *Silene succulenta* Forssk growing locally. *Egypt Pharm Sci* 1991. 32(3-4): 879-887.

47. George AJ. Legal status and toxicity of saponins. *Food Cosmet Toxicol* 1965; 3: 85-91.

48. Lee WB et al. Phytochemical constituents of *Cirsium setidens* Nakai and their cytotoxicity against human cancer cell lines. *Arch Pharm Res* 2002; 25(5): 628-635.

49. Liu S et al. Tumor inhibition and improved immunity in mice treated with flavone from *Cirsium japonicum* DC. *Int Immunopharmacol* 2006; 6(9): 1387-1393.

50. Yuan Z et al. α-Tocospiro C, a novel cytotoxic α-tocopheroid from *Cirsium setosum*. *Phytochemistry Lett* 2014; 8: 116–120.

Tables

Table 1. Percentage yield (PY) on a dry weight basis (% w/w) of each crude methanolic extract

	Plant species	Organs	PY (% w/w)
Xerophytic plants	*Atractylis serratuloides*	whole plant (AS)	7.6%
	Cirsium scabrum	stems (CSS)	9.3%
		flowers (CSF)	6.1%
		leaves (CSL)	12.1%
	Scabiosa maritima	leaves (SML)	7.6%
		flowers (SMF)	3.3%
		stems (SMS)	2.3%
Halophytic plants	*Silene succulenta*	stems (SSS)	10.8%
		leaves (SSL)	23.7%
	Juncus maritimus	flowers (JMF)	7.3%
		rhizomes (JMR)	12.5%
		stems (JMS)	13.1%
	Limonium virgatum	stems (LVS)	17.9%
		leaves (LVL)	19.4%
	Atriplex tatarica	whole plant (AT)	14.2%
	Aeluropus littoralis	whole plant (AL)	9.3%

Table 2. Antimicrobial activities of active crude methanolic extracts (MIC in µg/ml)

	L. virgatum		***J. maritimus***	**Gent**	**Vanc**	**Amox**
	Stems	**Leaves**	**Rhizomes**			
Gram - bacteria						
Escherichia coli 8157	312	312	NA	S	R	R
Klebsiella pneumoniae 11017	625	NA	NA	S	R	R
Providencia stuartii 11038	NA	625	NA	S	R	S
Acinetobacter baumanii 9010	NA	625	NA	S	R	R
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27583	625	625	NA	R	R	R
Stenotrophomonas maltophilia	625	625	NA	S	R	R
Gram + bacteria						
Staphylococcus aureus 8147	625	625	NA	S	S	S
Staphylococcus lugdunensis T26A3	625	625	625	S	S	S
Staphylococcus warneri T12A12	625	625	NA	S	R	S
Mycobacterium smegmatis 5003	625	625	NA	S	S	S
Streptococcus agalactiae T25-7	NA	NA	625	S	S	S
Streptococcus dysgalactiae T46C14	NA	NA	78	S	S	S
Streptococcus agalactiae T53C2	NA	NA	625	S	S	S

MIC (µg/ml) of positive controls: Gent (gentamicin), S: ≤ 4, R: > 8; Vanc (vancomycin), S: ≤ 4, R: > 16; Amox (amoxicillin), S: ≤ 4, R: > 16; S: sensitive, I: intermediate, R: resistant.. MIC (µg/ml) of crude methanolic extracts: MIC < 100 µg/ml: high activity; 100 µg/ml < MIC < 500 µg/ml: moderate activity; 500 µg/ml < MIC < 1000

µg/ml: low activity; MIC > 1000 µg/ml: no activity. NA: inactive (MIC > 1000 µg/ml) on Gram – bacteria: *Citrobacter freundii* 11041, *C. freundii* 11042, *Escherichia coli* 8138, *E. coli* ATCC 25922, *Enterobacter aerogenes* 9004, *Enterobacter cloacae* 11050, *E. cloacae* 11051, *E. cloacae* 11053, *Klebsiella pneumoniae* 11016, *Serratia marcescens* 11056, *S. marcescens* 11057, *P. mirabilis* 11060, *Salmonella sp.* 11033, *Acinetobacter baumanii* 9011, *Pseudomonas aeruginosa* 8131, *Yersinia pseudotuberculosis* 2777; Gram + bacteria: *Enterococcus faecalis* C159-6, *Enterococcus sp*. 8153, *Staphylococcus epidermidis* 10282, *Staphylococcus epidermidis* 5001, *Staphylococcus aureus* 8146, *Corynebacterium* T25-17; Yeast: *Candida albicans* 10286.

Table 3. Antiradical activities (IC_{50} in µg/ml) of *Juncus maritimus* rhizomes partitions

Extract, partitions, compounds	IC_{50} (µg/ml)
JMR-CE	45.23±1.68
JMR-MC	27.32±1.63
JMR-$H_2$0	5.47±0.14
JMR-Luteolin	4.82±0.31

Each value represents the mean ± SD of 3 determinations. JMR, *Juncus maritimus* rhizomes; JMR-Luteolin, luteolin isolated from *J. maritimus* (positive control); JMR-CE, methanolic crude extract; JMR-MC, methylene chloride partition; JMR-EA, ethyl acetate partition; JMR-H2O not represented: IC50 = 263.81 ± 19.45 µg/ml.

Table 4. Antimicrobial activities of rhizomes partitions of *Juncus maritimus* (MIC in µg/ml)

	***J. maritimus* Rhizomes**			**Gent**	**Vanc**	**Amox**
	JMR-MC	**JMR-EA**	**JMR-$H_2$0**			
Gram + bacteria						
Staphylococcus aureus 8146	625	NA	NA	S	S	S
Staphylococcus aureus 8147	312	NA	NA	S	S	S
Corynebacterium T25-17	312	625	NA	S	S	S
Streptococcus agalactiae T25-7	625	625	NA	S	S	S
Streptococcus dysgalactiae T46C14	39	312	NA	S	S	S
Streptococcus agalactiae T53C2	312	625	NA	S	S	S

MIC (µg/ml) of positive controls: Gent (gentamicin), S: ≤ 4, R: > 8; Vanc (vancomycin), S: ≤ 4, R: > 16; Amox (amoxicillin), S: ≤ 4, R: > 16; S: sensitive, I: intermediate, R: resistant.
MIC (µg/ml) of partitions (JMR-MC: methylene chloride partition; JMR-EA: ethyl acetate partition; JMR-H_2O: aqueous partition): MIC < 100 µg/ml: high activity; 100 µg/ml < MIC < 500 µg/ml: moderate activity; 500 µg/ml < MIC < 1000 µg/ml: low activity; MIC > 1000 µg/ml: no activity
NA: inactive (MIC > 1000 µg/ml) on Gram – bacteria: *Citrobacter freundii* 11041, *C. freundii* 11042, *Escherichia coli* 8138, *E. coli* 8157, *E. coli* ATCC 25922, *Enterobacter aerogenes* 9004, *Enterobacter cloacae* 11050, *E. cloacae* 11051, *E. cloacae* 11053, *Klebsiella pneumoniae* 11016, *K. pneumoniae* 11017, *Serratia marcescens* 11056, *S. marcescens* 11057, *P. mirabilis* 11060, *Providencia stuartii* 11038, *Salmonella sp.* 11033, *Acinetobacter baumanii* 9010, *A. baumanii* 9011, *Pseudomonas aeruginosa* 8131, *P. aeruginosa* ATCC 27583, *Stenotrophomonas maltophilia*; *Yersinia pseudotuberculosis* 2777; Gram + bacteria: *Enterococcus faecalis* C159-6, *Enterococcus sp* 8153, *Staphylococcus epidermidis* 10282, *S. epidermidis* 5001, *Staphylococcus lugdunensis* T26A3, *Staphylococcus warner*i T12A12, *Mycobacterium smegmatis* 5003; Yeast: *Candida albicans* 10286.

Table 5. Antiradical activities (IC_{50} in µg/ml) of *Limonium virgatum* stems and leaves partitions.

Extract, partitions, compound	IC_{50} (µg/ml)
LVS-CE	8.19±0.39
LVS-MC	15.33±0.39
LVS-EA	9.25±0.95
LVS-But	7.01±0.62
LVS-H_20	10.60±0.29
LVL-CE	7.94±0.44
LVL-MC	12.15±0.84
LVL-EA	6.62±0.35
LVL-But	8.19±0.86
LVL-H_20	9.95±0.59
Luteolin	4.82±0.31

Each value represents the mean ± SD of 3 determinations. LVS, *Limonium virgatum* stems; LVS-CE, methanolic crude extract; LVS-MC, methylene chloride partition; LVS-EA, ethyl acetate partition; LVS-But, butanol partition; LVS-H2O, aqueous partition; LVL, *Limonium virgatum* leaves; LVL-CE, methanolic crude extract; LVL-MC, methylene chloride partition; LVL-EA, ethyl acetate partition; LVL-But, butanol partition; LVL-H2O, aqueous partition. Positive control: luteolin.

Table 6. Antimicrobial activities of stems and leaves partitions of *Limonium virgatum* (MIC in µg/ml)

	L. virgatum										
	Stems				**Leaves**				**Gent**	**Vanc**	**Amox**
	LVS -MC	**LVS -EA**	**LVS -But**	**LVS -H_2O**	**LVL -MC**	**LVL -EA**	**LVL -But**	**LVL -H_2O**			
Gram – bacteria											
Klebsiella pneumoniae 11017	NA	312	625	625	NA	312	NA	625	S	R	R
Proteus mirabilis 11060	NA	625	NA	NA	NA	625	NA	NA	S	R	R
Providencia stuartii 11038	NA	625	NA	NA	NA	625	NA	625	S	R	S
Acinetobacter baumanii 9010	NA	625	NA	NA	NA	625	NA	NA	S	R	R
Acinetobacter baumanii 9011	NA	625	NA	NA	NA	625	NA	NA	R	R	R
Pseudomonas aeruginosa 8131	NA	625	NA	NA	NA	625	NA	NA	S	R	R
P. aeruginosa ATCC 27583	NA	312	NA	NA	NA	312	NA	NA	R	R	R
Stenotrophomonas maltophilia	NA	625	NA	NA	NA	312	NA	NA	S	R	R
Yersinia pseudotuberculosis 2777	NA	625	NA	NA	NA	625	NA	NA	S	R	R
Gram + bacteria											
*Staphylococcus epidermidis*10282	NA	312	625	625	NA	312	625	312	S	S	S
Staphylococcus epidermidis 5001	78	625	NA	NA	NA	NA	NA	NA	S	S	S
Staphylococcus aureus 8146	NA	625	NA	NA	NA	625	NA	625	S	S	S
Staphylococcus aureus 8147	NA	625	625	625	NA	625	NA	625	S	S	S
Staphylococcus lugdunensis T26A3	NA	312	625	625	39	312	NA	625	S	S	S
Staphylococcus warneri T12A12	NA	312	625	625	NA	312	NA	625	S	R	S
Corynebacterium T25-17	NA	625	NA	NA	78	625	NA	NA	S	S	S
Mycobacterium smegmatis 5003	NA	625	NA	NA	NA	625	NA	625	S	S	S
Streptococcus agalactiae T25-7	78	NA	NA	NA	39	625	NA	NA	S	S	S
Streptococcus dysgalactiae T46C14	NA	NA	NA	NA	39	625	NA	NA	S	S	S
Streptococcus agalactiae T53C2	NA	NA	NA	NA	39	625	NA	NA	S	S	S

MIC (µg/ml) of positive controls: Gent (gentamicin), S: ≤ 4, R: > 8; Vanc (vancomycin), S: ≤ 4, R: > 16; Amox (amoxicillin), S: ≤ 4, R: > 16; S: sensitive, I: intermediate, R: resistant.

MIC (µg/ml) of partitions (LVS: *Limonium virgatum* Stems; LVL: *Limonium virgatum* Leaves; LVS-MC, LVL-MC: methylene chloride partitions; LVS-EA, LVL-EA: ethyl acetate partitions; LVS-But, LVL-But: butanol partitions; LVS-H_2O, LVL-H_2O: aqueous partitions): MIC < 100 µg/ml: high activity; 100 µg/ml < MIC < 500 µg/ml: moderate activity; 500 µg/ml < MIC < 1000 µg/ml: low activity; MIC > 1000 µg/ml: no activity
NA: inactive (MIC > 1000 µg/ml) on Gram – bacteria: *Citrobacter freundii* 11041, *C. freundii* 11042, *Escherichia coli* 8138, *E. coli* 8157, *E. coli* ATCC 25922, *Enterobacter aerogenes* 9004, *Enterobacter cloacae* 11050, *E. cloacae* 11051, *E. cloacae* 11053, *Klebsiella pneumoniae* 11016, *Serratia marcescens* 11056, *S. marcescens* 11057, *Salmonella sp*. 11033; Gram + bacteria: *Enterococcus faecalis* C159-6; *Enterococcus sp* 8153; Yeast: Candida albicans 10286.

Figures

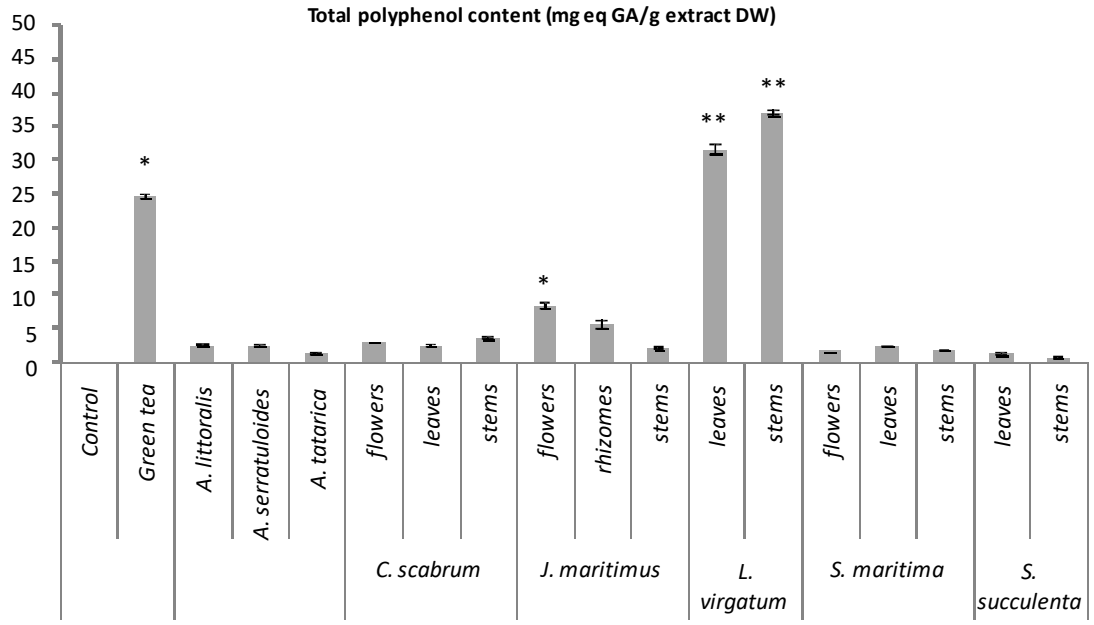


Figure 1. Total polyphenol content of crude methanolic extracts (mg eq GA/g extract DW).
Each value represents the mean ± SD of 3 determinations; Negative control: water (TCP = 0.000189 mg eq GA/g extract DW). Positive control: green tea (leaves extract). Significantly different from the background control (water): *p < 0.05, ** p < 0.01.

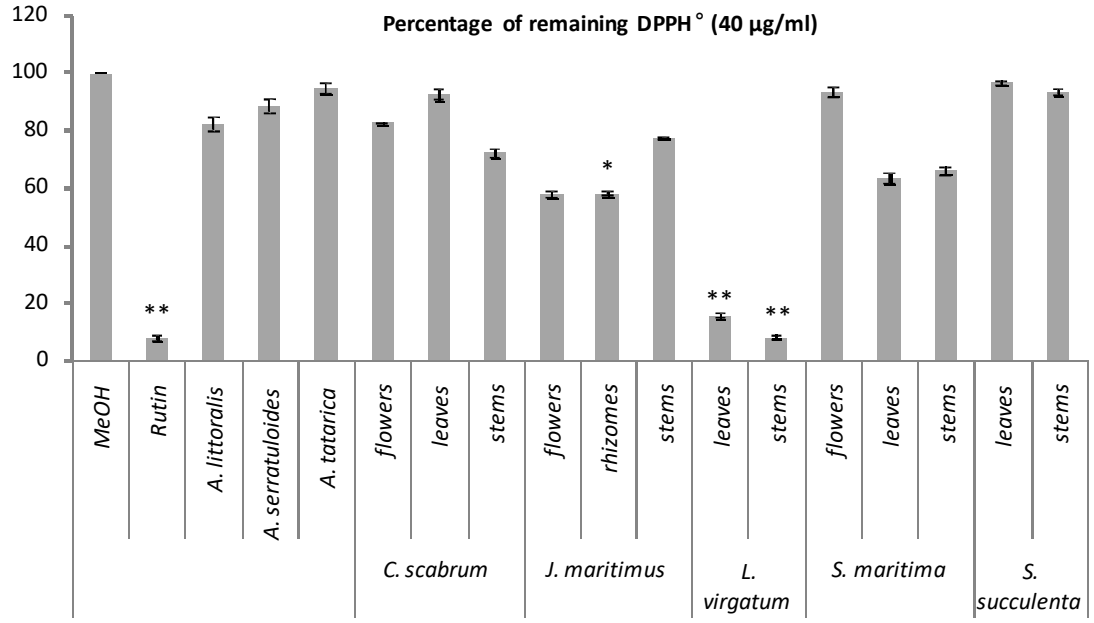


Figure 2 Antiradical activities of crude methanolic extracts (at 40 µg/ml).
Each value represents the mean ± SD of 3 determinations. Negative control: MeOH. Positive control: rutin. Significantly different from the background control (MeOH): *p < 0.05, ** p < 0.01.

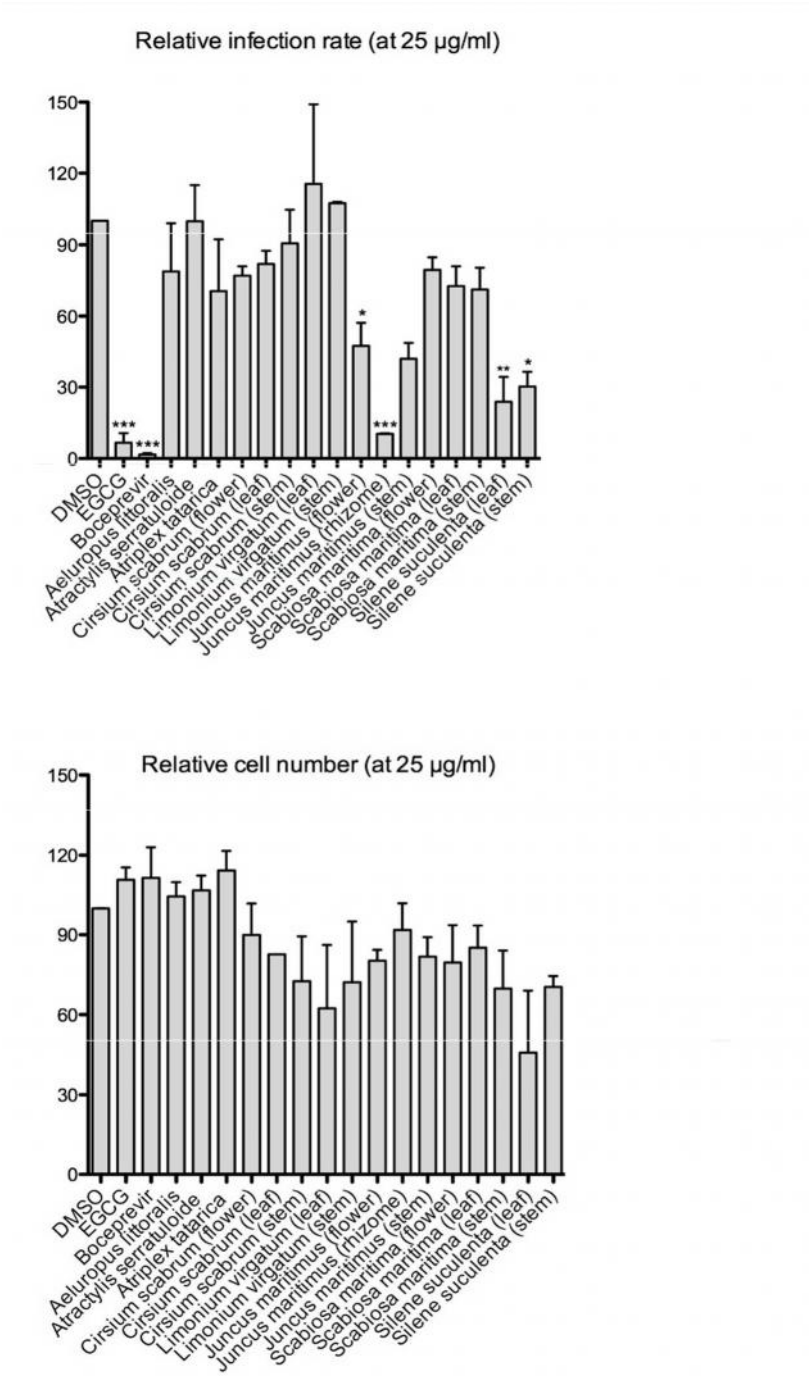


Figure 3 Anti-hepatitis C virus activity of crude methanolic extracts (relative infection rate and relative Huh-7 cell number percentages at 25 µg/ml).
Each value represents the mean ± SEM of 3 independent determinations. Huh-7 cells were inoculated with HCV in cell culture (HCVcc) in the presence of plant extracts at 25 µg/mL or 50 µM dephinidin or 1 µM bœprevir for 2h. Inoculum was removed and cells were further incubated in medium containing plant extracts or molecules for 28 h and cells were fixed. Negative control: DMSO. Positive controls: delphinidin, an inhibitor with natural origin of HCV entry; boceprevir, an inhibitor of HCV replication. Significantly different from the background control (DMSO): *p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005

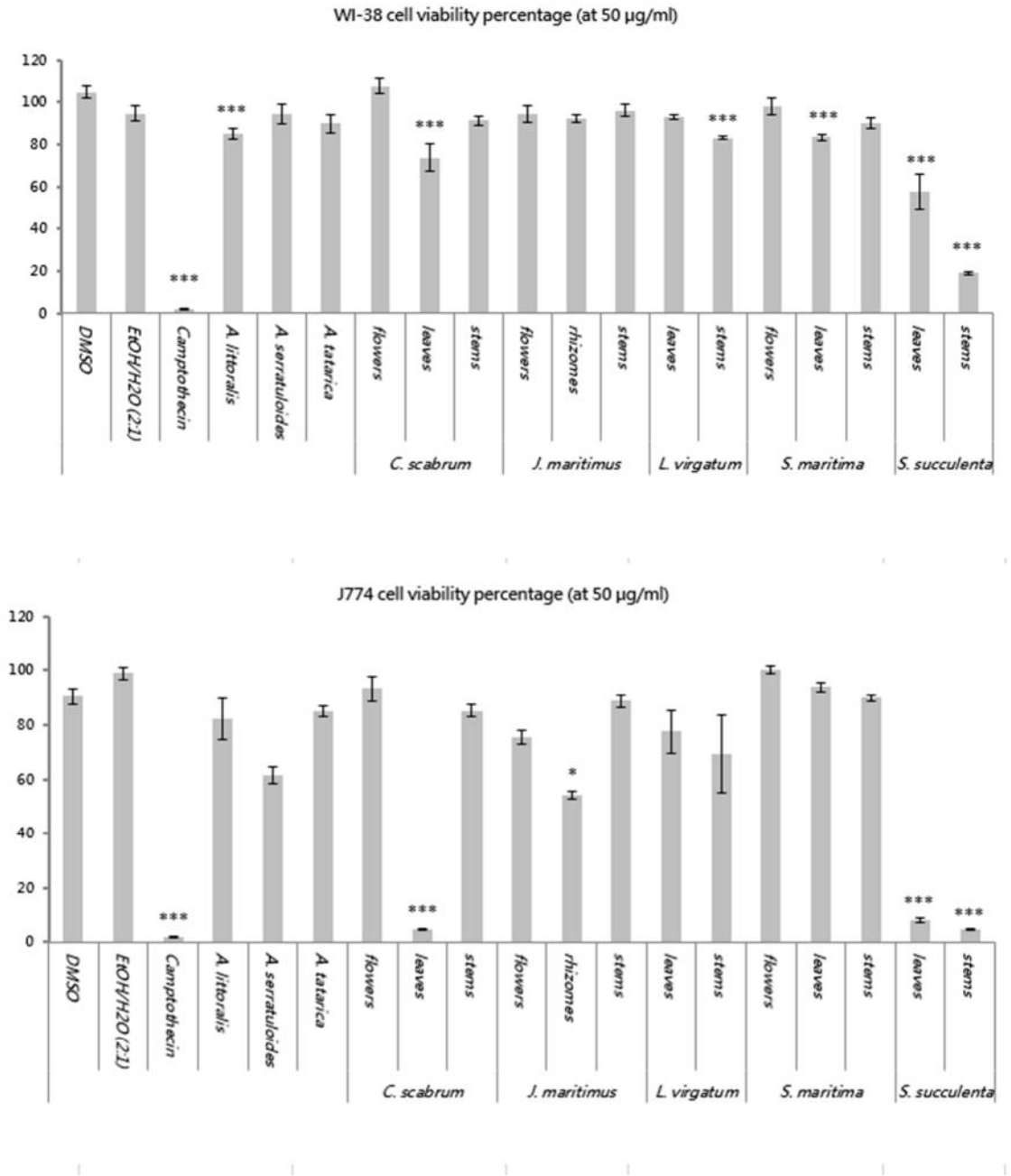


Figure 4 Cytotoxic activities of crude methanolic extracts (cell viability percentage at 50 µg/ml).
Each value represents the mean ± SEM of 12 determinations (6 repetitions in duplicate). WI-38, human normal fibroblast cell line; J774, murine macrophage-like tumor cell line. Negative controls: DMSO and EtOH/H2O (vehicle solvents). Positive control: camptothecin, IC_{50} = 0.17 ± 0.04 µg/ml (WI-38), IC_{50} = 0.011 ± 0.002 µg/ml (J774). Significantly different from the background control (DMSO): *p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005

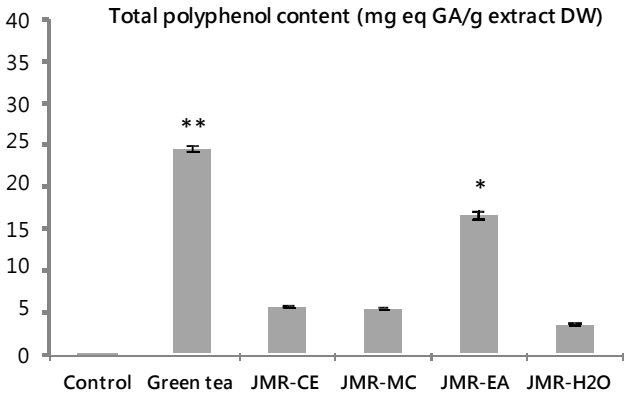


Figure 5 Total polyphenol content TPC (mg eq GA/g extract DW) of *Juncus maritimus* rhizomes partitions.
Each value represents the mean ± SD of 3 determinations. JMR, *Juncus maritimus* rhizomes; JMR-CE, methanolic crude extract; JMR-MC, methylene chloride partition; JMR-EA, ethyl acetate partition; JMR-H2O, aqueous partition. Negative control: water (TCP = 0.000189 mg eq GA/g extract DW). Positive control: green tea (leaves extract). * Significantly different from the positive control (water): *p < 0.05, ** p < 0.01.

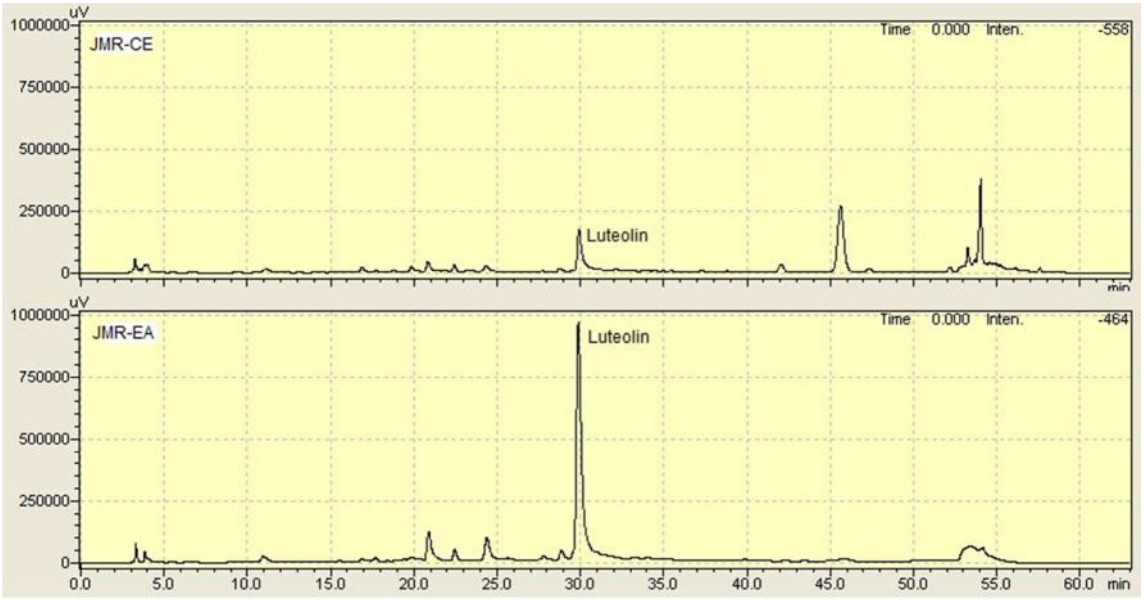


Figure 6 Chromatograms at 254 nm of rhizomes crude extract of *Juncus maritimus* (JMR-CE) and its ethyl acetate partition (JMR-EA).
The retention time of luteolin is indicated on the chromatogram (TR luteolin = 30 min).

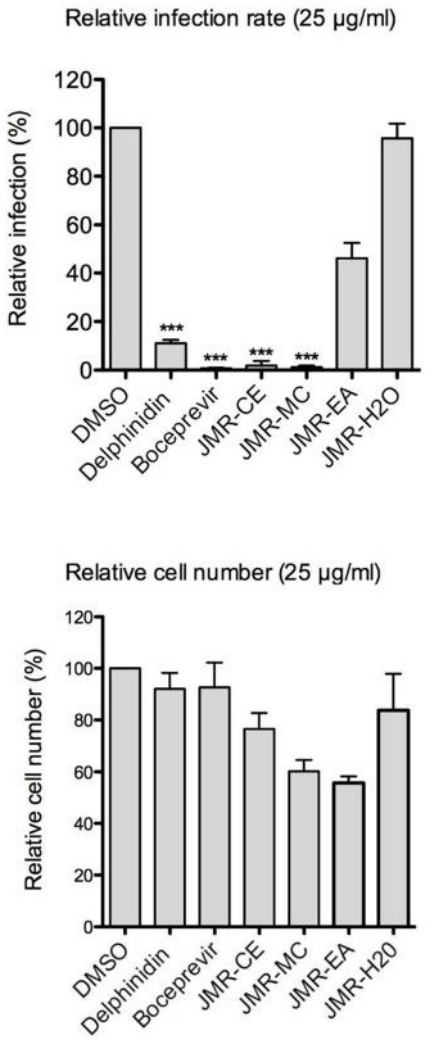


Figure 7 Anti-hepatitis C virus activity of crude methanolic extract and partitions of *Juncus maritimus* rhizomes (relative infection rate and relative Huh-7 cell number percentages at 25 µg/ml)

Each value represents the mean ± SEM of 3 independent determinations. Huh-7 cells were inoculated with HCVcc in the presence of plant extracts at 25 µg/mL or 50 µM delphinidin or 1 µM boceprevir for 2h. Inoculum was removed and cells were further incubated in medium containing plant extracts or molecules for 28 h and cells were fixed. Negative control: DMSO. Positive controls: delphinidin, an inhibitor with natural origin of HCV entry; boceprevir, an inhibitor of HCV replication. *Juncus maritimus* rhizomes; JMR-CE, methanolic crude extract; JMR-MC, methylene chloride partition; JMR-EA, ethyl acetate partition; JMR-H2O, aqueous partition. Significantly different from the background control (DMSO): *** $p<0.005$

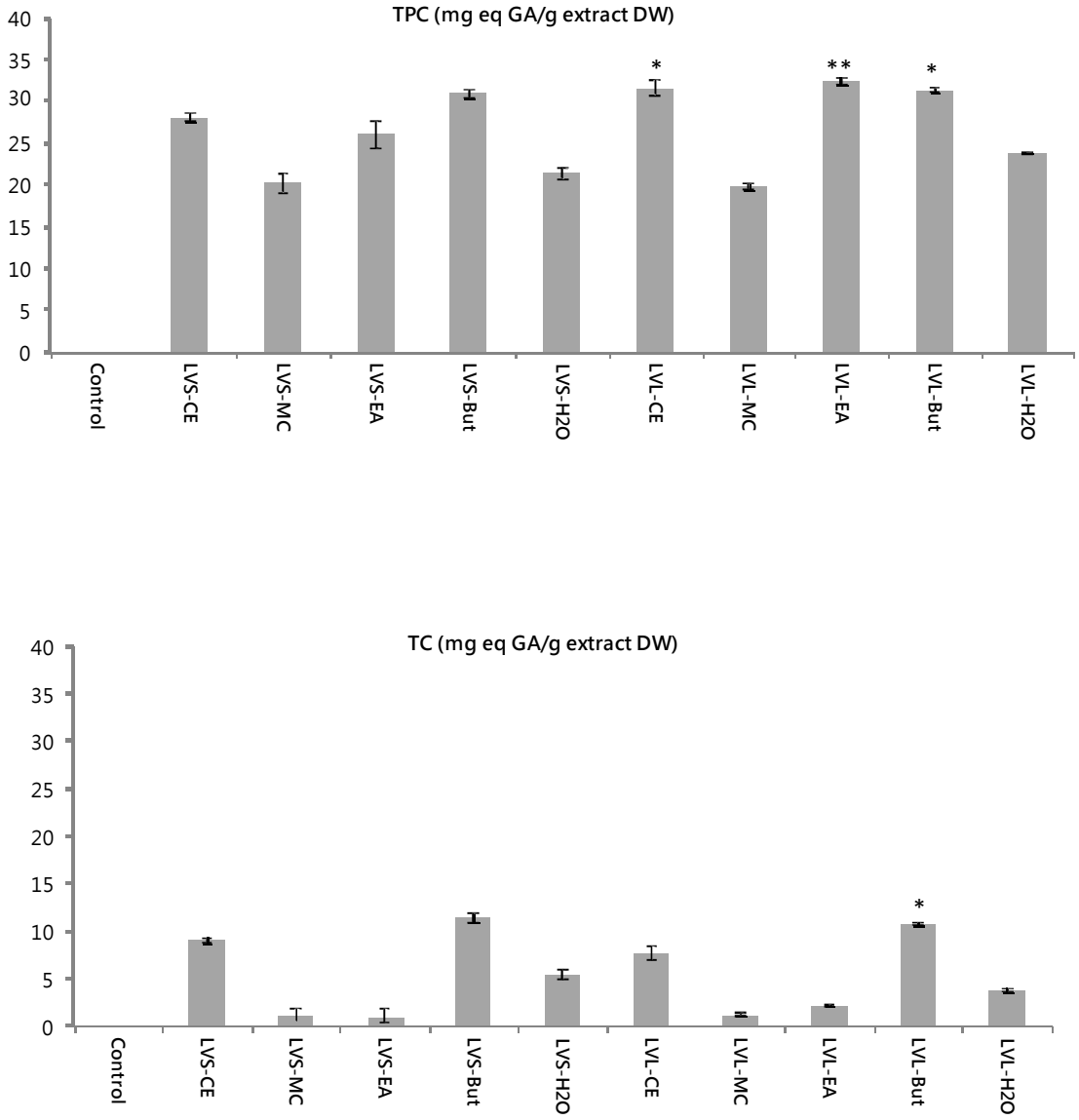


Figure 8 Total polyphenol content (TPC) and total tannins content (TC) (mg eq GA/g extract DW) of *Limonium virgatum* stems and leaves partitions.

Each value represents the mean ± SD of 3 determinations. LVS, *Limonium virgatum* stems; LVS-CE, methanolic crude extract; LVS-MC, methylene chloride partition; LVS-EA, ethyl acetate partition; LVS-But, butanol partition; LVS-H2O, aqueous partition; LVL, *Limonium*

virgatum leaves; LVL-CE, methanolic crude extract; LVL-MC, methylene chloride partition; LVL-EA, ethyl acetate partition; LVL-But, butanol partition; LVL-H2O, aqueous partition. Control (TPC and TC): Water. Positive control (for TPC): green tea. Significantly different from the background control (DMSO): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

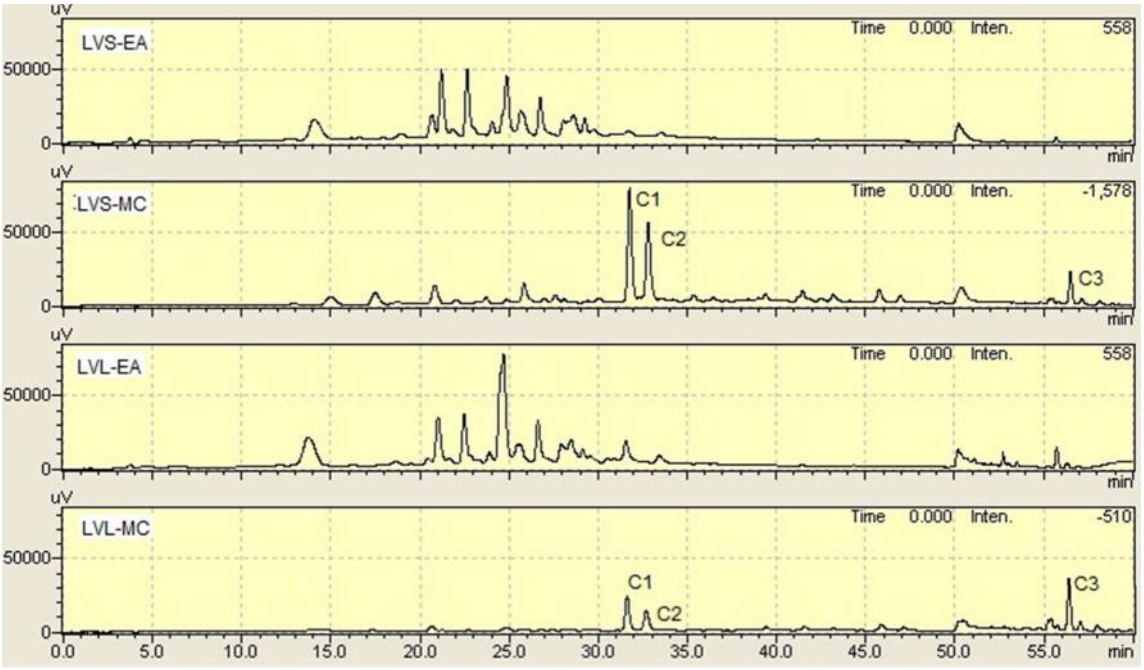


Figure 9 Chromatograms at 320 nm of methylene chloride (LVS-MC and LVL-MC) and ethyl acetate partitions
(LVS-EA and LVL-EA) of *Limonium virgatum* stems and leaves.
The retention times of compounds C1, C2 and C3 mainly identified in methylene chloride partitions are indicated on the chromatogram (TR
C1 = 31.5 min; TR C2 = 32.5 min; TR C3 = 56.5 min).

II. *Cirsium scabrum* : isolement et caractérisation des composés responsables de son activité cytotoxique et révélation de son potentiel antibactérien

La précédente étude a montré que l'extrait brut méthanolique des feuilles de *C. scabrum* (CSRW) possède à la fois une activité cytotoxique élevée contre une lignée de macrophages dérivés d'un réticulosarcome de souris J774 (BALB/cmurine) (CI_{50} = 11,56 µg/mL), et à l'inverse une très faible toxicité vis-à-vis de la lignée de cellules humaines non cancéreuses WI-38 (CI_{50} = 77,80 µg/mL).

Dans ce travail, un fractionnement bioguidé a donc été initié sur CSRW par une extraction liquide-liquide. Les 5 sous-extraits obtenus, éther de pétrole (CSPE), dichlorométhane (CSMC), acétate d'éthyle (CSEA), butanolique (CSBt) et aqueux (CSW) ont été testés contre les lignées cellulaires J774 et WI-38. La mesure de la prolifération cellulaire repose sur le test colorimétrique utilisant le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT). Les cellules cultivées sont ensemencées dans des plaques à 96 puits, puis mélangées aux sous-extraits à différentes concentrations. La mesure des densités optiques permet de déterminer le pourcentage de viabilité cellulaire qui sert à estimer le pouvoir cytotoxique des extraits. Les résultats indiquent que le sous-extrait éther de pétrole (CSPE) présente l'activité cytotoxique la plus élevée parmi l'ensemble des sous-extraits testés (CI_{50} =11,53 µg/mL), et est sélectif de la lignée cellulaire J774 (indice de sélectivité = 2,7). Cette activité est proche de celle de l'extrait brut. Ces tests d'activité antiproliférative ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de pharmacognosie du Prof. Joëlle Quetin-Leclercq (UCL, Belgique) et notamment avec le Dr Joanne Bero et Claire Beaufay, doctorante au sein de leur équipe.

Le sous-extrait éther de pétrole a fait l'objet d'un fractionnement bioguidé. La première étape du fractionnement est effectuée par une chromatographie sur colonne en phase normale (heptane/acétate d'éthyle, 100:0 à 70:30) donnant lieu à 7 fractions (CSPE1-CSPE7). Au cours de ce processus, un composé pur a été isolé (composé 1 = 21,9 mg). Sur la base des profils CCM des fractions obtenues, des tentatives de purification de composés ont été initiées. Un deuxième composé (composé 2 = 1,5 mg) pur a été isolé à partir des deux fractions CSPE1 et CSPE2 par chromatographie sur colonne en phase normale (éther de pétrole/dichlorométhane, 25:5).

L'activité cytotoxique des fractions (CSPE1-CSPE7) a été évaluée contre les lignées cellulaires J774 et WI-38. Les résultats ont montré que les fractions CSPE4 et CSPE5

possèdent les activités les plus élevées contre J774 (CI_{50} = 13,77 et 8,96 $\mu g/mL$ respectivement). De plus, ces deux fractions n'ont pas montré de toxicité significative sur la lignée de cellules saines WI-38. Les fractions CSPE4 et CSPE5 ont donc été fractionnées par chromatographie de partage centrifuge en utilisant le système Arizona X en mode ascendant (25 minutes) puis descendant (27 minutes). Ceci a permis d'isoler un mélange indissociable de deux composés (composé 3 et composé 4 = 9,6 mg). Des tentatives pour séparer les 2 composés n'ont pas abouti car les produits une fois séparés se dégradaient. Le mélange des deux composés 3 et 4 a donc été testé sur J774 et WI-38.

Nous avons aussi évalué l'activité du composé 1 directement purifié depuis le sous-extrait CSPE.

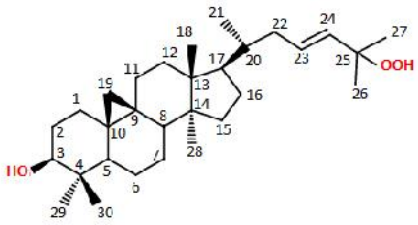
Les résultats obtenus montrent que le composé 1 a une activité similaire à celle du sous extrait éther de pétrole, aussi bien en terme d'action antiproliférative, que de sélectivité à l'égard de la lignée cellulaire J774 (CI_{50} = 12,60 µg/mL et IS =1,5). L'activité la plus élevée a été enregistrée pour le mélange des deux composés 3 et 4 (CI_{50} = 1,79 µg/mL) avec une très haute sélectivité (IS = 9,2). Les composés 1 à 4 ont été identifiés. Un criblage phytochimique a permis de déterminer la nature chimique des composés qui constituent le sous-extrait CSPE ; il s'agit de triterpènes et de phytostérols. Par la suite, l'analyse des données spectroscopiques (RMN et MS) et la comparaison des résultats avec les données de la littérature ont permis d'identifier ces composés : les composés 1 et 2 sont des triterpènes, le lupéol (composé 1) et l'acétate du taraxastérol (composé 2), alors que les composés 3 et 4 sont un mélange de triterpènes de type cycloartane, le 25-hydroperoxycycloart-23-en-3*β*-ol et le 24-hydroperoxycycloart-25-en-3*β*-ol. L'ensemble de ces composés (figure 30) ont déjà été identifiés chez d'autres espèces de *Cirsium.* L'activité cytotoxique décrite dans la littérature pour certaines espèces de *Cirsium* a été attribuée aux deux cycloartanes, montrant qu'ils possèdent une activité cytotoxique significative contre plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines *in-vitro* (Lee *et al*., 2002).

Par ailleurs, nous nous sommes intéressés à l'activité antibactérienne du genre *Cirsium*. En effet, plusieurs espèces de *Cirsium* ont montré un potentiel antimicrobien prometteur, notamment sur des souches de *Staphylococcus aureus*. Même si initialement l'extrait brut méthanolique des feuilles de *C. scabrum* n'a pas montré d'activité sur la collection de 36 souches testées (chapitre **I**), nous avons réalisé une nouvelle analyse, en utilisant une autre collection de bactéries composée majoritairement de souches de *S. aureus*. L'extrait brut (CSRW), ainsi que l'ensemble des sous-extraits CSPE, CSMC, CSEA, CSBt et CSW ont été

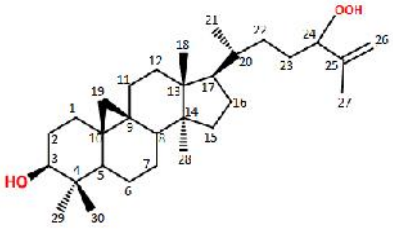
testés par la méthode de diffusion en milieu solide avec un inoculateur à tête multiples. Les résultats ont montré que seuls CSEA et CSBt sont actifs, et notamment sur 6 souches de *S. aureus* et 2 souches d'une autre bactérie, *Dermabacter hominis*. Les CMI les plus élevées ont été enregistrées pour le sous-extrait CSBt (312 µg/mL). Nous avons donc cherché à déterminer les composés responsables des activités de ce sous-extrait. Tout d'abord, un criblage phytochimique a permis de déterminer que CSBt était riche en flavonoïdes et en tanins. Par la suite, l'analyse par CLHP analytique de CSBt a révélé la présence de deux composés majoritaires, qui ont donc été isolé directement par CLHP préparative. La structure de ces composés a été déterminée par l'analyse de leurs données spectroscopiques (RMN et HR-MS) et par comparaison avec les données de la littérature. Il s'agit de deux flavones glycosylées : le composé 5 a été identifié comme un mélange (3:1) de la lutéoline 7-*O*-*β*-D-glucuronide et de la lutéoline 7-*O*-*β*-D-glucoside ; le composé 6 est l'apigenine 7-*O*-*β*-D-glucuronide (figure 30). L'activité biologique des flavonoïdes est en général bien caractérisée, notamment celle des génines (lutéoline et apigénine). Ce n'est pas le cas pour ces hétérosides, car leur mécanisme d'action n'a pas été étudié. D'autre part, on ne trouve pas de données dans la littérature concernant l'activité des flavonoïdes sur *D. hominis*.

Il serait donc intéressant d'analyser davantage les activités antibactériennes de ces 3 composés.

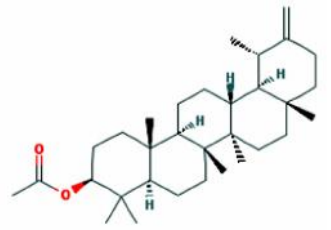
Contribution personnelle. Pour réaliser ce travail, j'ai effectué la collecte des feuilles de *C. scabrum,* le séchage et la préparation des échantillons. J'ai aussi mis au point la première étape du fractionnement bioguidé, soit la préparation des sous-extraits par extraction liquide-liquide à partir de l'extrait brut. Je suis intervenue dans une autre étape du fractionnement bioguidé, en aidant Cédric Dufloer, étudiant en Master 2 Recherche, notamment dans la purification du mélange des 2 composés actifs par chromatographie de partage centrifuge. Finalement, j'ai mené l'ensemble du travail concernant la réalisation des tests d'activité antibactérienne, la détermination du gradient en CLHP analytique (analyse qualitative des sous-extraits) et préparative, ainsi que le travail de purification des composés 5 et 6.



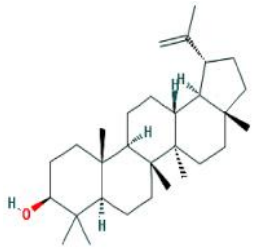
25-hydroperoxycycloart-23-en-3*β*-ol



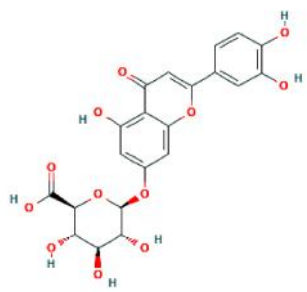
24-hydroperoxycycloart-25-en-3*β*-ol



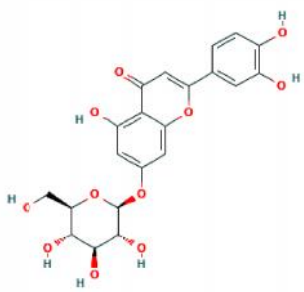
Acétate du taraxastérol



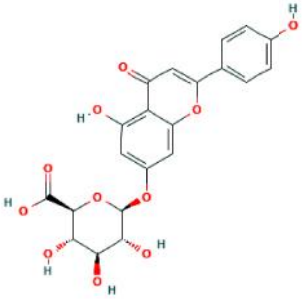
Lupéol



Lutéoline 7-*O*-*β*-D-glucuronide



Lutéoline 7-*O*-*β*-D-glucoside



Apigénine 7-*O*-*β*-D-glucuronide

Figure 30. Molécules identifiées dans le sous-extrait éther de pétrole des feuilles de *Cirsium scabrum*

Antiproliferative and antibacterial activities of *Cirsium scabrum* from Tunisia

Ramla Sahli[a,b], Céline Rivière[a*], Cédric Dufloer[a], Claire Beaufay[c], Christel Neut[d], Joanne Bero[c], Thierry Hennebelle[a], Vincent Roumy[a], Riadh Ksouri[b], Joelle Quetin-Leclercq[c], Sevser Sahpaz[a]

[a] Univ. Lille, INRA, ISA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, EA 7394 – ICV, Institut Charles Viollette, F-59000 Lille, France, [b] The Laboratory of Aromatic and Medicinal Plants, Biotechnology Centre of Borj-Cédria (CBBC), Hammam-lif, Tunisia, [c] Pharmacognosy Research Group, Louvain Drug Research Institute, Université Catholique de Louvain, Avenue E. Mounier, 72, B B01.72.03-1200 Brussels, Belgium and [d] UDSL, INSERM U995, UFR Pharmacie, F-59000 Lille, France

Correspondence: Céline Rivière, EA 7394 - ICV, Institut Charles Viollette, Laboratory of pharmacognosy, Faculty of pharmacy, University of Lille 2 - 3 rue du Pr. Laguesse, B.P. 83, 59006 Lille Cedex, France
E-mail: celine.riviere-3@univ-lille2.fr

Abstract

Several *Cirsium* species are known for their uses in traditional medicine and consequently are studied for their phytochemical content and their biological activities. In the framework of a previous study conducted on eight extremophile plants from Tunisia, we highlighted that the crude methanolic extract of *C. scabrum*, a not investigated thistle, showed a moderate but a quite selective cytotoxic activity against the cancerous cell line J774 compared to the non-cancerous cell line WI38 (IC_{50} = 11.53 µg/ml on J774, IC_{50} = 29.89 µg/ml on WI38, selectivity index = 2.6). In the current study, the partitions of the leaves of *C. scabrum* were analysed for their antiproliferative activity on the same cell lines. From the most active petroleum ether partition, we isolated four triterpenoids including lupeol, taxasterol acetate and a (1:1) mixture of 25-hydroperoxycycloart-23-en-3*β*-ol and 24-hydroperoxycycloart-25-en-3*β*-ol. These two cycloartane-type triterpenoids are mostly responsible for this cytotoxic activity. On the other hand, the antimicrobial potential of this plant was also evaluated against 36 microorganisms. The moderate antibacterial activity against 6 *Staphylococcus aureus* and 2 *Dermabacter hominis* strains is mainly attributed to the butanol partition whose major compounds are glycosides of flavones.

1. Introduction

The genus *Cirsium* (thistle), belonging to the Asteraceae family, is well distributed around the world. About 200 *Cirsium* species are distributed in Europe, North Africa, Asia, as well as North and Central America [1]. In agriculture, *Cirsium* species are often considered as invasive weeds against which massive means of control are deployed. By contrast, some species are easily cultivated by communities in dry steppes of Mongolia where fruits and vegetables are not easily afforded [2]. In some countries, such as in Turkey, some *Cirsium* species are considered as edible plants [3]. Different parts can be consumed, such as stems, roots and dethroned young leaves [4]. Some species of the genus *Cirsium* are also used as medicinal plants in the traditional medicine of several countries. In some European countries, the tea prepared from the leaves of some *Cirsium* species possesses therapeutic virtues. It is the case in Central Italy where the decoction of the leaves of *Cirsium arvense* is used to treat abdominal pains and intestinal disturbances. The species is also frequently used as an emergency haemostatic for wounds [5]. The roots or the entire plants of more than ten species are used in China for the treatment of various ailments including hemorrhaging, jaundice and gastrointestinal disorders [6]. According to literature, these traditional uses led to the consideration of the phytochemistry and the biological activities of some species. *Cirsium* species contain a variety of natural products including flavonoids, phenolic acids, lignans, sesquiterpenoids, triterpenoids, sterols, alkaloids, acetylenes, polyacetylenes, hydrocarbons, and a few other compounds [7]. Flavonoids and their glycosides are the main secondary metabolites of *Cirsium* species [6]. The compounds isolated from *Cirsium* species and extracts show many different biological activities including antimicrobial, antioxidant, antidiabetic, anti-inflammatory, vasorelaxant, astringent, hepatoprotective, and anticancer [8].

Cirsium scabrum (Poir.) Bonnet & Barratte is a tall thistle native of the Mediterranean region [4]. To our knowledge, no reports on the uses of this plant in the traditional medicine, on its chemical composition and on its biological activities have been provided in the literature so far. In a previous study conducted on eight extremophile plants from Tunisia, we highlighted that the crude methanolic extract of *C. scabrum* showed a moderate but a quite selective cytotoxic activity against J774 compared to WI38 (IC_{50} = 11.53 µg/ml on J774, IC_{50} = 29.89 µg/ml on WI38, selectivity index = 2.6) [9]. In addition, the therapeutic uses attributed to several *Cirsium* species prompt us to explore in more depth the cytotoxic effect of the leaves of *C. scabrum* and to identify the compounds responsible of this activity using a bioguided fractionation approach. As several *Cirsium* species demonstrate an antimicrobial potential [7], we used the same approach to evaluate the antimicrobial activity of this species against a panel of 36 microorganisms and to identify the bioactive natural products.

2. Material and Method

2.1 General Experimental Procedures

For the extraction and fractionation, synthesis grade methanol (MeOH), petroleum ether (PE), methylene chloride (CH_2Cl_2) and cyclohexane were furnished by VWR chemicals (Fontenay-sous-Bois, France), whereas ethyl acetate (EtOAc) and n-heptane were obtained from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France). Toluene was purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France). Water (W) was bi-distilled. All organic solvents for Centrifugal Partition Chromatography (CPC) purification were High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) grade except for the n-heptane which was synthesis grade (Carlo Erba, Val-de-Reuil, France). Ethyl acetate (EtOAc) and methanol (MeOH) were purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France).

Water was purified using Millipore Integral 5 (France) water purification system with a resistivity of not less than 18 MΩ.cm^{-1}. The chloroform-d6 and MeOD for Nuclear Magnetic Resonance (NMR) experiments was obtained from Euriso-Top (Gif-sur-Yvette, France).

Analytical Thin Layer Chromatography (TLC) were performed on pre-coated silica gel 60 F (0.25 mm, Merck, Germany) and the spots were visualized under UV (254 and 365 nm) before being sprayed with a solution of sulfuric anisaldehyde and heating at 100°C for 10 min. Silica gel 60 (63-200 µm, Macherey–Nagel, Germany) and silica gel 60H (< 63 µm, Macherey–Nagel, Germany) were used for column chromatography.

Analytical HPLC was carried out using a Shimadzu binary LC-10AS pump, a SCL-10A UV-visible detector and a Vision HT Basic C18 (5 µm, 4 mm i.d. × 250 mm) column (Grace, Epernon, France). Preparative HPLC was performed using a Shimadzu HPLC system equipped with a LC-20AP binary high-pressure pump, a SPD-M20A photodiode array detector and a VisionHT Basic C18 (5 µm, 22 mm i.d. × 250 mm) column. The mobile phase was composed of 0.01% formic acid in water (solvent A) and acetonitrile (ACN) (solvent B). For analytical HPLC analysis, 20 µl of extract (10 mg/ml in MeOH) was injected at 1 ml/ml, whereas for preparative HPLC analysis, 200 mg of extract solubilised in MeOH was injected at 14 ml/min. The wavelength used was 254 nm. For both analysis, the following gradient elution program was used: 10-25% B (0-15 min), 25-26.5% B (15-20 min), 26.5-34.75% B (20-25 min); 34.75% B (25-28 min), 34.75-35.12% B (28-29 min), 35.12% B (29-32 min), 35.12-100% B (32-35 min).

CPC was performed using an Armen instrument 250 mL rotor (SCPC-250-L) provided by Armen instrument (Saint-Avé, France). CPC analyses were monitored using Shimadzu pump and detector.

NMR spectra were recorded on a Bruker DPX-500 spectrometer (^{1}H and ^{13}C NMR at 500 MHz), except for compound **2** identified on a 600 MHz spectrometer. For triterpenoids, MS

analyses were carried out using a Trace DSQ mass spectrometer (Thermo Finnigan) operating in the electron-impact mode. Samples were analyzed in a full-scan mode (100-700 amu) and was injected directly with a DEP probe. The data obtained were compared with those of the database NIST. Data acquisition and processing were performed with Xcalibur software. For flavonoids, HRMS analyses were carried out in negative mode with a range of *m/z* 100-1000, using a Thermo Fisher Scientific Exactive Orbitrap mass spectrometer equipped with an electrospray ion source. The vaporizer temperature of the source was set at 100°C, the nitrogen sheath gas at 10-20, and the auxiliary gas at 2-6 (arbitrary units).

2.2. Plant material

Cirsium scabrum was collected in August 2013 in the North of Tunisia (Goubellat) and was identified at the Biotechnology Centre of Borj-Cédria by Dr Abderrazak Smaoui. A voucher specimen (181) was deposited at the Herbarium of the Laboratory of Extremophile Plants at the Biotechnology Centre of Borj-Cédria.

2.3. Preparation of the methanolic crude extract of C. scabrum *leaves*

260.8 g of *C. scabrum* leaves were dried at 25°C for a week, and then powdered. Extraction was carried out by maceration at room temperature (MeOH, 15 ml per g of powder, 3 x 48 h). After filtration, extract was dried in vacuum at 35°C and lyophilized to afford 22.17 g of crude methanolic extract (yield = 8.5%).

2.4. Fractionation of the methanolic crude extract of C. scabrum *leaves*

The crude methanolic extract of *C. scabrum* leaves (CS = 12 g) was suspended in water (20 ml) and partitioned with PE, CH_2Cl_2, EtOAc and butanol (10 × 60 ml). Partitions were concentrated at 35°C under reduced pressure to give PE partition (CSPE = 0.84 g), CH_2Cl_2

partition (CSMC = 1.46 g), EtOAc partition (CSEA = 1.03 g) and butanol partition (CSBt = 2.72 g). The remaining aqueous partition was freeze-dried and lyophilized (CSW = 5.16 g).

2.5. Isolation of compounds from the CSPE partition

2 g of the CSPE partition (obtained after two successive extractions and fractionations) was subjected to Column Chromatography (CC) on silica gel 60 (63–200 µm) using a gradient of heptane/EtOAc (100:0 to 70:30) to give seven fractions (CSPE1–CSPE7) based on their TLC behaviour (heptane/EtOAc, 7:3). Compound **1** (21.9 mg) was isolated by this process (heptane/EtOAc, 95:5).

Compound **2** (1.5 mg) was isolated from the combined fractions CSPE1 and CSPE2 (346.3 mg) by a silica gel 60H CC, eluted with PE/CH_2Cl_2 (25:5).

Preparative Centrifugal Partition Chromatography (CPC) was carried out to isolate compounds from the most active combined fractions CSPE4 and CSPE5. CPC separation was conducted using a quaternary biphasic solvent system: Arizona X (n-Hept/EtOAc/MeOH/H_2O, 9:1:9:1). Ten quaternary biphasic solvent systems Arizona were tested in order to choose the optimal system [10]. The two phases (aqueous and organic) of Arizona X system were prepared. The rotor was entirely filled at 30 ml/min and 500 rpm with the aqueous stationary phase (400 mL) in the ascending mode. The rotation speed was increased to 1600 rpm and the organic mobile phase was pumped into the column in ascending mode at a flow-rate of 8 ml/min. Separation was performed using 400 mg of combined partitions CSPE4/CSPE5, in ascending mode for 25 min then switched to descendant mode for 27 min. Fractions of 8 ml were collected every min by a Gilson FC 204 fraction collector (52 sub-fractions: X1–X52). Fractions were checked by TLC developed with heptane/EtOAc (7:3). CPC analysis allowed the direct purification of a (1:1) mixture of compounds **3a** and **3b** (X30-X33: 9.6 mg).

2.6. Isolation of compounds from the CSBt partition

Major compounds of the CSBt partition (compounds **4a**/**4b** and **5**) were isolated by preparative HPLC using the following gradient elution program: 10-25% B (0-15 min), 25-26.5% B (15-20 min), 26.5-34.75% B (20-25 min); 34.75% B (25-28 min), 34.75-35.12% B (28-29 min), 35.12% B (29-32 min), 35.12-100% B (32-35 min). From 200 mg of the CSBt partition, 8.04 mg of compound **4a**/**4b** and 5.96 mg of compound **5** were obtained.

2.7. Cytotoxicity assays

Cell culture

The cytotoxicity was evaluated on two cell lines : J774 (macrophage-like cell line, derived from BALB/c murine reticulum cell sarcoma) and on WI38 (human normal fibroblast-like lung cell line), using the tetrazolium salt MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (Sigma)] colorimetric method, as described by Bero et al. [11]. J774 cells were cultivated in a humidified atmosphere with 5% CO_2 at 37°C in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Paisley, UK) containing 2 mM L-glutamine supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Life Technologies) and penicillin–streptomycin (100 UI/ml). WI38 cells were cultivated in a humidified atmosphere with 5% CO_2 at 37°C in DMEM medium (Life Technologies) containing 4 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (Life Technologies) and penicillin–streptomycin (100 UI/ml).

Cytotoxicity assay

Briefly, WI38 or J774 were seeded in 96-well plates (5000 cells/well/180 µl medium or $2.8x10^4$ cells/ml). After 24 h, cells were treated with 20 µl of crude extract and partitions solutions in a fixed concentration of 50 µg/ml to calculate cell viability percentage. When an extract or a partition presents a percentage inferior to 50%, an IC_{50} is calculated with a range of concentration between 0.023-50 µg/ml obtained from a 20 mg/ml DMSO stock solution diluted in fresh medium. In the same way, fractions (CSPE1 to CSPE7) obtained from the most active partition (CSPE) and purified compounds were tested at two fixed concentrations of 5 and 20 µg/ml. This time, an IC_{50} is calculated for cell viability percentages inferior to 50% at 20 µg/ml with a range of concentration between 0.01-20 µg/ml obtained as cited above. After 72 h, the medium was replaced by 100 µl of a 10% MTT solution (3 mg/ml in PBS) in medium. After 45 min, the medium was removed again and 100 µl of DMSO were added to solubilize formed formazan crystals. Absorbance was recorded at 570 nm and 620 nm. Each sample was tested in eight serial three-fold dilutions in 96-well microtiter plates, at least three wells per concentration in duplicate. Camptothecin (Sigma) was used as positive control (concentration range: 25-0.00032 µg/ml). The highest concentration of solvent to which the cells were exposed was 0.25%, which was shown to be non-toxic.

Cell viability % = [AT/ANT] x 100, with A: absorbance, NT: control cells, T: treated cells.

2.8. Antimicrobial assay

The antimicrobial activity of crude extract and partitions was evaluated against 36 pathogenic microorganisms (22 Gram-positive bacteria, 13 Gram-negative bacteria and 1 yeast) according to Mahamodo et al. [12]. The 36 microorganisms were grown overnight at 37°C on sloping Mueller-Hinton (MH) agar medium. Briefly, the bacteria were diluted with Ringer's Cysteine (RC) solution to obtain 10^6 bacteria/ml. In Petri dishes, 19 ml MH 2 agar was

supplemented with 1 ml of stock solution of crude extract or partitions (12.5 mg/ml to 0.39 mg/ml) or antibiotics (gentamicin, vancomycin, amoxicillin) (28 mg/ml to 6.10^{-3} mg/ml); giving final concentrations from 625 to 19.5 µg/ml for the extracts and 64 to 0.03 µg/ml for antibiotics. Inocula of 10^4 colony forming units (CFU) were spotted ultimately with a multipoint inoculator (Steers Replicator).

2.9. Statistical analysis

Data were analyzed by Graphpad Prism 7 statistical software and presented as the mean ± standard error of the mean. Activity differences between both cell lines were analyzed by the non-parametric Mann-Whitney test in two-tailed to highlight significant toxicity. However, the Wilcoxon signed-rank test in two tailed was used to compare activity (for CSMC, CSEA, CSPE 4 and 5) on J774 to the maximum tested value on WI38, 50 or 20 µg/ml respectively. Statistical significance for all statistical tests was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Cytotoxic activity of crude methanolic extract and partitions of Cirsium scabrum *leaves*

In a previous study [9], we showed that the cytotoxicity of the crude methanolic extract of *C. scabrum* leaves (CSRW) was particularly interesting. It showed, among other plant extracts tested, the highest activity on J774 cell line (IC_{50} = 11.53 µg/ml) and was also quite selective (IC_{50} = 29.89 µg/ml on WI38, selectivity index = 2.6). In this study, our objective is to identify the compounds responsible of this activity. For this purpose, the partitions of *C. scabrum* leaves obtained from the crude methanolic extract by liquid-liquid partitioning (CSPE, CSMC, CSEA, CSBt and CSW) were also analysed for their antiproliferative activity on the same cell lines (Table 1). Among all tested partitions, the petroleum ether partition

(CSPE) showed the highest activity on J774 with an IC_{50} value (IC_{50} = 12.12 µg/ml) almost similar to that of the crude methanolic extract (CSRW). As CSRW, CSPE was also interesting because it showed some selectivity (IC_{50} = 33.21 µg/ml on WI38, selectivity index = 2.7). A SI value inferior to 2 may indicate a general toxicity of an extract or a pure compound [13]. In our case, we obtained SI superior to 2 for both the crude extract CRSW and the partition CSPE with significant differences ($p < 0.05$) between both cell lines.

3.2. Cytotoxic activity of CSPE fractions

In view of these results, we followed our bioguided fractionation on the most active partition CSPE. The fractionation of CSPE by silica gel column chromatography produced seven fractions (CSPE1-CSPE7), based on their TLC behaviour, which were analysed for their antiproliferative activity on both cell lines (Table 2). The highest activity was recorded for the fractions CSPE 4 and CSPE 5 with IC_{50} values equal to 13.77 and 8.96 $\mu g/ml$ respectively. Besides, these fractions did not show any toxicity at 20 µg/ml, the maximum concentration tested on the non-cancerous WI38 cell line, and their activity on J774 was significantly different with selectivity indices higher than 1.4 and 2.2 respectively. All other fractions were considered as non-active ($IC_{50} \geq 20$ $\mu g/ml$).

3.3. Purification of compounds from CSPE partition

A rapid phytochemical screening revealed that CSPE partition is rich in terpenoids and phytosterols, while the presence of alkaloids, flavonoids, saponins and tannins was not detected. Four compounds were purified from some CSPE fractions by silica gel column chromatography (CC) or by centrifugal partition chromatography (CPC). All compounds were identified and characterized by their spectroscopic data (^{1}H and ^{13}C NMR, 2D NMR experiments), spectra mass data and by comparisons with the literature. Compounds **1** and **2**

were identified as two common triterpenoids, respectively lupeol and taraxasterol acetate [14-15]. Compounds **3a** and **3b** were identified as an indissociable (1:1) mixture of two hydroperoxide cycloartane-type triterpenoids: 25-hydroperoxycycloart-23-en-3*β*-ol (**3a**) and 24-hydroperoxycycloart-25-en-3*β*-ol (**3b**) [16-17] (Figure 1).

3.4. Cytotoxic activity of purified compounds

The mixture of two cycloartane-type triterpenoids obtained from the most active fractions (combined fractions CSPE4 and CSPE5) were analysed for their antiproliferative activity on J774 and WI38 cell lines (Table 3). Even if lupeol was isolated directly by CC on silica gel 60 from CSPE and not from CSPE4-5, we tested its activity due to data of the literature [18]. Lupeol exhibited a cytotoxic activity against the J774 cell line with an IC_{50} value similar to that of the CSPE partition (IC_{50} = 12.60 µg/ml), but did not show selectivity against the WI38 cell line (selectivity index = 1.5). On the other side, the mixture of 25-hydroperoxycycloart-23-en-3*β*-ol and 24-hydroperoxycycloart-25-en-3*β*-ol showed the highest activity on J774 cell line (IC_{50} = 1.79 µg/ml) and showed a very interesting selectivity index (IC_{50} = 16.50 µg/ml on WI38, selectivity index = 9.2).

3.5. Antimicrobial activity of partitions of Cirsium scabrum *leaves*

In our previous screening conducted on 8 extremophile plants, the crude methanolic extract of *C. scabrum* did not show relevant antimicrobial activity [9]. However, due to the known antimicrobial activity of some *Cirsium* species [7], we decided to analyse again the crude methanolic extract as well as partitions of *C. scabrum* for their antimicrobial activity against a new panel of 36 pathogenic microorganisms including new *Staphylococcus* strains and *Dermabacter hominis* strains. Table 4 give MIC (Minimum Inhibitory Concentration) values of the two active partitions: CSEA and CSBt. CSRW, CSPE, CSMC and CSW were not

considered active because they showed MIC values > 1000 µg/ml. CSEA and CSBt showed a moderate antibacterial activity against 6 *Staphylococcus aureus* and 2 *Dermabacter hominis* strains with higher MIC values for the CSBt partition (312 µg/ml).

3.6. Identification of the major compounds of the CSBt partition.

A rapid phytochemical screening revealed that CSBt partition is rich in flavonoids and tannins. HPLC analysis of CSBt partition revealed the presence of two major compounds isolated by preparative HPLC. Structural elucidation was achieved based on their spectroscopic data (^{1}H and ^{13}C NMR, 2D NMR experiments and HRMS) and by comparison with the literature. Compounds **4a** and **4b** was identified as a (1:1) mixture of luteolin 7-*O*-*β*-D-glucuronide (**4a**) [19] and luteolin 7-*O*-*β*-D-glucoside (**4b**) [20] and compound **5** was identified as apigenin 7-*O*-*β*-D-glucuronide [21] (Figure 1).

4. Discussion

In a previous study conducted on extremophile plants, we analysed the antiproliferative activity of eight species using the MTT assay on J774 cancerous cell line compared to the one on WI38 non-cancerous cell line. We highlighted that the crude methanolic extract of *C. scabrum* leaves (CSRW), a non investigated thistle, showed the highest activity on J774 cell line among other plant extracts tested and a good selectivity index [9]. In this current study, we aimed to investigate the cytotoxic activity of partitions obtained from the extract of *C. scabrum* leaves (CSRW) on the same cell lines. We showed that the petroleum ether partition (CSPE) was the most cytotoxic against the J774 cell line and may contain the compounds mostly responsible for the cytotoxic activity of this species. A bioguided fractionation of

CSPE partition allowed us to identify these compounds, a (1:1) mixture of two hydroperoxide cycloartane-type triterpenoids: 25-hydroperoxycycloart-23-en-3*β*-ol (**3a**) and 24-hydroperoxycycloart-25-en-3*β*-ol (**3b**). Lee *et al.* [16] have previously isolated these compounds from the methylene chloride extract of *Cirsium setidens* aerial parts in three steps by successive column chromatography. They demonstrated that both compounds have significant cytotoxic activity against several cultured human cancer cell lines, in particular the 24-hydroperoxycycloart-25-en-3*β*-ol. In our study, both compounds were isolated as a (1:1) mixture in one step from the most active combined fractions (CSPE4 and CSPE5) using CPC. The attempts to separate these compounds from each other by column chromatography were not fruitful because they rapidly degrade. Consequently, we tested the antiproliferative activity of the mixture. The cytotoxic activity described in the literature for some *Cirsium* species is not only attributed to cycloartane-type triterpenoids. Other studies highlighted the cytotoxic potential of other types of compounds, for example caryolane-type sesquiterpenes from *Cirsium souliei* [6] or a nor-α-tocopheroid (α-tocospiro C) from *Cirsium setosum* [22]. We also isolated from the CSPE partition of *Cirsium scabrum* leaves two common triterpenoids lupeol and taraxasterol acetate. Lupeol and taraxasterol acetate were identified in other *Cirsium* species (*C. canum, C. hypoleucum* and *C. oleraceum*) [7]. Lupeol is a triterpenoid widely distributed in various botanical families. Several *in vitro* and preclinical animal studies suggest that lupeol has a wide range of biological activities, including anti-inflammatory, antimicrobial, antiprotozoal, cholesterol lowering, antiproliferative, anti-invasive and antiangiogenic ones [18]. This natural product is able to modulate different molecular mechanisms contributing to the melanoma development [23-24]. Taraxasterol acetate is occurring in various *Cirsium* species [7]. For instance, this triterpenoid was isolated from a cytotoxic petroleum ether fraction of *Cirsium setosum* [25] or from *Cirsium* species growing in Turkey [26]. In general, it is quite common in the Asteraceae family [27-28].

On the other hand, we evaluated the antibacterial activity of the crude methanolic extract and partitions of *Cirsium scabrum* against a panel of 36 gram positive and negative bacteria. The crude extract showed no activity, while the butanol partition CSBt had a moderate action against 6 *Staphylococcus aureus* strains and 2 *Dermabacter hominis* strains. We isolated the major compounds of the CSBt partition, a (1:1) mixture of luteolin 7-*O*-*β*-D-glucuronide and luteolin 7-*O*-*β*-D-glucoside (compounds **4a** and **4b**) and apigenin 7-*O*-*β*-D-glucuronide (compound **5**), as a primary approach to understand the antibacterial potential of *C. scabrum*. To our knowledge, literature does not describe or little the antibacterial activity of luteolin 7-*O*-*β*-D-glucuronide and apigenin 7-*O*-*β*-D-glucuronide. However, it is worthy to mention that some plant species containing these two flavones showed antibacterial activity against some Gram-positive and Gram-negative bacteria, including *Staphylococcus aureus* strains [29, 30]. On the other hand, luteolin 7-*O*-*β*-D-glucoside (cynaroside) demonstrated antibacterial activity especially against Gram-negative bacteria [31]. This flavone was already identified in *Cirsium japonicum* [32]. In general, flavonoids are well known to be effective antibacterial substances against a wide array of bacteria, with MIC in the range of 0.06 to 31.3 µg/ml against some gram-positive bacteria and 0.3 to 39.1 µg/ml against some gram-negative bacteria, for the ten most potently antibacterial natural flavonoids tested in recent years [33]. As a matter of fact, they are synthesized by plants in response to microbial infection [34]. The mechanism of antimicrobial action of flavonoids seems to be complex as it does not target one specific site of action. In addition to direct and synergistic antibacterial effects, flavonoids interfere with bacterial virulence factors, including quorum-sensing signal receptors, some enzymes and toxins [33]. The antibacterial activity of apigenin and luteolin against *Staphylococcus aureus* was thoroughly investigated. Apigenin can remarkably decrease at low concentrations the production of α-hemolysin, a toxin released by *S. aureus*. Also, apigenin has a therapeutic effect on *S. aureus*-related pneumonia by alleviating injury of the lung tissue

and decreasing cytokine levels [35]. Concerning luteolin, Wang *et al.* [36] suggested that this flavone could inhibit the activity of DNA topoisomerase I and II, which results in some decrease in the nucleic acid and protein synthesis. A recent study has investigated the mechanism of action of luteolin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [37]. The authors showed that luteolin acts in synergy by increasing cytoplasmic membrane permeability and inhibiting ATPase. The study also suggests a direct binding of luteolin with the major constituent of the *S. aureus* cell wall. The antibacterial activity of flavonoids against *D. hominis* was not reported in the literature so far. Besides, few or no information exists on the activity of natural products from plants against this bacteria strain. *D. hominis* is a common colonizer from human skin. It is usually susceptible to vancomycin, teicoplanin and linezolid [38]. Further phytochemical investigation of the butanol partition of *C. scabrum* would deepen the understanding of its activity against *D. hominis* strains. On the other hand, the antibacterial activity of CSBt partition could be also attributed to the presence of tannins. The antimicrobial activity of tannins is widely investigated. The different mechanisms proposed to explain their mechanism of action include direct action on microbial metabolism, but also inhibition of extracellular microbial enzymes or deprivation of the substrates required for microbial growth [39]. Nazaruk *et al.* [40] reported the presence of tannins in aqueous extracts from leaves of several *Cirsium* species. They showed that most of these extracts had antibacterial potential. Although they suggested that the content of small-molecular phenolic compounds had greater influence on the activity of extracts than tannins, consideration will be given to investigate more the antibacterial effect of the CSBt partition from *C. scabrum*.

5. Conclusion

A phytochemical and biological study was carried out for the first time on *Cirsium scabrum*. The study revealed that the crude methanolic extract of the leaves, and more precisely the petroleum ether partition (CSPE) showed an interesting and quite selective cytotoxic potential

against the J774 cell line. A mixture of two hydroperoxide cycloartane-type triterpenoids were isolated and identified as the secondary metabolites responsible for this activity. Two other triterpenoids, lupeol and taraxasterol acetate were also isolated from the CSPE partition, strengthening our knowledge about the chemical composition of *Cirsium scabrum*. We also focused our study on the antibacterial potential of this species. The butanol partition of *C. scabrum* leaves (CSBt) showed a moderate activity against 6 *Staphylococcus aureus* strains and 2 *Dermabacter hominis* strains. The two major compounds of CSBt partition were identified as glycosides of flavones, suggesting that they might be responsible for this activity, as well as the presence of tannins.

Acknowledgments

This study was supported by an internal financial support from the Charles Viollette Institute. The authors wish to thank platforms of CUMA (University of Lille 2, Pr. J.F. Goossens) and LARMN (University of Lille 2, Pr. N. Azaroual) for access to equipment. The authors are also grateful to Laurence Marcourt for her technical assistance concerning the identification of compound **2**. The School of Pharmaceutical Sciences of the University of Geneva (Prof. J-L. Wolfender) is thankful in this context to the Swiss National Science Foundation for the support in the acquisition of the NMR 600 MHz (SNF R'Equip grant 316030_164095). The authors also wish to thank Dr. Abderrazak Smaoui (Biotechnology Centre of Borj-Cédria), Maude Bourlet (UCL), Laetitia Bocquet, Moussa Diop, Jennifer Samaillie, Séverine Mahieux and Dr Mostafa Kouach (University of Lille 2) for their skillful technical assistance.

References

[1] D. J. Mabberley. “Mabberley’s Plant book. A Portable Dictionary of Plants, their Classification and Uses. Third edition,” 1040 p., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2008.

[2] D. S. Khramova, V. V. Golovchenko, A. S. Shashkov et al., “Chemical composition and immunomodulatory activity of a pectic polysaccharide from the ground thistle *Cirsium esculentum* Siev,“ *Food Chemistry*, vol. 126, pp. 870–877, 2011.

[3] I. Demirtas, A. R. Tufekci, A. S. Yaglioglu et al., “Studies on the antioxidant and antiproliferative potentials of *Cirsium arvense* subsp. *vestitum*,“ *Journal of Food Biochemistry*, vol. 41, e12299, 2017.

[4] R. S. Vizgirdas and E. M. Rey-Vizgirdas, “Wild Plants of the Sierra Nevada,“ 384 p., University of Nevada Press, 2009.

[5] P. M. Guarrera, “Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium),“ *Fitoterapia*, vol. 76, pp. 1–25, 2005.

[6] X. F. He, Z. W. He, X .J. Jin et al., “Caryolane-type sesquiterpenes from *Cirsium souliei,”Phytochemistry Letters*, vol. 10, pp. 80–85, 2014.

[7] I. E. Jordon-Thaden, S. M. Louda, “Chemistry of *Cirsium* and *Carduus*: A role in ecological risk assessment for biological control of weeds?,” *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 31, no. 12, pp. 1353–1396, 2003.

[8] I. Demirtas, A. R. Tufekci, A. S. Yaglioglu and M. Elmastas, “Studies on the antioxidant and antiproliferative potentials of *Cirsium arvense* subsp. *vestitum*,” *Journal of Food Biochemistry*, vol. 41, no. 1, 2016.

[9] R. Sahli, C. Rivière, C. Neut et al., “An ecological approach to discover new bioactive extracts and products: The case of extremophile plants,” *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, doi: 10.1111/jphp.12728

[10] A. Berthod, M. Hassoun, M. J. Ruiz-Angel, “Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography,” *Analytical Bioanalytical Chemistry*, vol. 383, pp. 327-340, 2005.

[11] J. Bero, H. Ganfon, M. C. Jonville et al., *“ In vitro* antiplasmodial activity of plants used in Benin in traditional medicine to treat malaria,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 122, pp. 439-444, 2009.

[12] S. Mahamodo, C. Rivière, C. Neut et al., “Antimicrobial prenylated benzoylphloroglucinol derivatives and xanthones from the leaves of *Garcinia goudotiana*,“ *Phytochemistry*, vol. 102, pp. 162–168, 2014.

[13] R. B. Badisa, S. F. Darling-Reed, P. Joseph et al.,“ Selective Cytotoxic Activities of Two Novel Synthetic Drugs on Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells,” *Anticancer Research*, vol. 29, no. 8, pp. 2993–2996, 2008.

[14] S. B. Mahato, A. P. Kundu, "^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoid – A compilation of some salient features," *Phytochemistry*, vol. 37, no. 6, pp. 1517-1575, 1994.

[15] L. M. Khalilov, A. Z. Khalilova, E. R. Shakurova et al., "PMR and ^{13}C NMR spectra of biologically active compounds. XII.* Taraxasterol and its acetate from the aerial part of *Onopordum acanthium*," *Chemistry of Natural Compounds* vol. 39, no. 3, pp. 285-288, 2003.

[16] W. B. Lee, H. C. Kwon, O. R. Cho et al., "Phytochemical constituens of *Cirsium setidens* and their cytotoxicity againt human cancer cell lines," *Archives of Pharmacal Research*, vol. 25, no. 5, pp. 628-635, 2002.

[17] T. Kato, B. Frei, M. Heinrich, O. Sticher, "Antibacterial hydroperoxysterols from *Xanthosoma robustum*," *Phytochemistry*, vol.41, pp.1191-1195, 1996.

[18] A. Wal, R. S. Srivastava, P. Wal et al., "Lupeol as a magical drug," *Pharmaceutical and Biological Evaluations*, vol. 2, no. 5, pp. 142-151, 2015.

[19] A. Dapkevicius, T. A. van Beek, G. P. Lelyveld et al., "Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* leaves," *Journal of Natural Products*, vol. 65, pp. 892-896, 2002.

[20] A. Mulkens, I. Kapetanidis, "Flavonoids of the leaves of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae)," *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, vol. 62, pp. 19-22, 1987.

[21] G. Flamini, E. Antognoli, I. Morelli, "Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy," *Phytochemistry*, vol. 57, pp. 559-564, 2001.

[22] Z. Yuan, H. Duan, Y. Xu et al., "α-tocospiro C, a novel cytotoxic α-tocopheroid from *Cirsium setosum*," *Phytochemistry Letters*, vol. 8, pp. 116–120, 2014.

[23] A. Gajos-Michniewicz and M. Czyz, "Modulation of WNT/β-catenin pathway in melanoma by biologically active components derived from plants," *Fitoterapia*, vol. 109, pp. 283-292, 2016.

[24] L. R. Strickland, H. C. Pal, C. A. Elmets and F. Afaq, "Targeting drivers of melanoma with synthetic small molecules and phytochemicals," *Cancer Letters*, vol. 359, pp. 20-35, 2015.

[25] L. Li, Z. Sun, X. Shang et al., "Triterpene Compounds From *Cirsium setosum*," *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, vol. 37, no. 7, pp. 951-955, 2012.

[26] M. Boğa M, P. K. Yilmaz, D. B. Cebe et al., "Chemical constituents and biological activities of *Cirsium leucopsis*, *C. sipyleum*, and *C. eriophorum*," *Zeitschrift für Naturforschung C*, vol. 69, pp. 381-390, 2014.

[27] J. Zhao, D. Evangelopoulos, S. Bhakta et al., "Antitubercular activity of *Arctium lappa* and *Tussilago farfara* extracts and constituents," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 155, pp. 796-800, 2014.

[28] P. A. Ramos, A. R. Guerra, O. Guerreiro et al., “Antiproliferative Effects of *Cynara cardunculus* L. var. *altilis* (DC) Lipophilic Extracts,” *International Journal of Molecular* Sciences, vol. 18, pp. 1-15, 2017.

[29] S. O. Salawu, A .O. Ogundare, B. B. Ola-Salawu and A. A. Akindahunsi,“Antimicrobial activities of phenolic containing extracts of some tropical vegetables,” *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 5, no. 4, pp. 486-492, 2011.

[30] F. Moussaoui, A. Zellagui, N. Segueni et al., “Flavonoid constituents from Algerian *Launaea resedifolia* (O.K.) and their antimicrobial activity,” *Records of Natural Products*, vol. 4, no. 1, pp. 91-95, 2010.

[31] L. Žemlička, P. Fodran, V. Lukeš et al., “Physicochemical and biological properties of luteolin-7-*O*-*β*-D-glucoside (cynaroside) isolated from *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm.,“ *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, vol. 145, no. 8, pp. 1307-1318, 2014.

[32] W. C. Lee, H. A. Jung, J. S. Choi et al., “Protective Effects of Luteolin against Apoptotic Liver Damage Induced by D-Galactosamine/Lipopolysaccharide in Mice,” *Journal of Natural Products*, vol. 74, pp. 1916–1921, 2011.

[33] T. P. T. Cushnie, A. J. Lamb, “Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoid,” *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 38, pp. 99-107, 2011.

[34] R. A. Dixon, P. M. Dey, and C. J. Lamb, “Phytoalexins: enzymology and molecular biology,” *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, vol. 55, pp.1–136, 1983.

[35] J. Dong, J. Qiu, J. Wang et al., “Apigenin alleviates the symptoms of *Staphylococcus aureus* pneumonia by inhibiting the production of alpha-hemolysin,“ *FEMS Microbiology Letters*, vol. 338, pp. 124–131, 2013.

[36] Q. Wang and M. Xie, “Antibacterial activity and mechanism of luteolin on *Staphylococcus aureus*,“ *Wei Sheng Wu Xue Bao*, vol. 50, no. 9, pp. 1180-1184, 2010.

[37] D.-K. Joung, Y.-S. Lee, S.-H. Han et al., “Potentiating activity of luteolin on membrane permeabilizing agent and ATPase inhibitor against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,“ *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, vol. 9, no. 1, pp. 19–22, 2016.

[38] I. Fernández-Natal, J. A. Sáez-Nieto, M. J. Medina-Pascual et al., “*Dermabacter hominis*: a usually daptomycin-resistant gram-positive organism infrequently isolated from human clinical samples,“ *New Microbes and New Infections*, vol. 1, no. 3, pp. 35–40, 2013.

[39] A. Scalbert, “Antimicrobial properties of tannins,“ *Phytochemistry*, vol. 30, no. 12, pp. 3875-3883, 1991.

[40] J. Nazaruk, S. K. Czechowska, R. Markiewicz and M. H. Borawska, “Polyphenolic compounds and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activity of aqueous extracts from leaves of some *Cirsium* species,“ *Natural Product Research*, vol. 22, no. 18, pp. 1583-1588, 2008.

Tables

Table 1: *In vitro* cytotoxicity of the crude extract and partitions of *C. scabrum* leaves

Crude extract and partitions	WI38 IC_{50} (µg/ml)	J774 IC_{50} (µg/ml)	SI ($IC_{50\ WI38}/IC_{50\ J774}$)
CSRW	29.89 ± 2.38	11.53 ± 1.07	2.6 ***
CSPE	33.21 ± 2.22	12.12 ± 0.34	2.7 ***
CSMC	>50	48.13 ± 1.87	>1
CSEA	>50	40.97 ± 2.91	>1.2 *
CSBt	>50	>50	>1
CSW	>50	>50	>1
Camptothecin	0.175 ± 0.029	0.011 ± 0.002	15 ***

CSRW: *C. scabrum* leaves crude extract; CSPE: *C. scabrum* leaves petroleum ether partition; CSMC: *C. scabrum* leaves methylene chloride partition; CSEA: *C. scabrum* leaves ethyl acetate partition; CSBt: *C. scabrum* leaves butanol partition; CSW: *C. scabrum* leaves water partition; Camptothecin: positive control.
Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) from six determinations and activity differences between cell lines are statistically defined for each partition with the Mann-Whitney or Wilcoxon signed rank tests for comparison to the highest tested concentration ($p< 0.05$ *, $p< 0.005$ ***).

Table 2: *In vitro* cytotoxicity of CSPE fractions

CSPE fractions	WI38 IC_{50} (µg/ml)	J774 IC_{50} (µg/ml)	SI ($IC_{50\ WI38}/IC_{50\ J774}$)
CSPE1	>20	>20	>1
CSPE2	>20	>20	>1
CSPE3	>20	>20	>1
CSPE4	>20	13.77 ± 1.26	>1.4 *
CSPE5	>20	8.96 ± 1.09	>2.2 *
CSPE6	>20	>20	>1
CSPE7	>20	>20	>1
Camptothecin	0.175 ± 0.029	0.011 ± 0.002	15 ***

CSPE1-CSPE7: fractions of CSPE; Camptothecin: positive control.
Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) from six determinations and activity differences between cell lines are statistically defined for each fraction with the Mann-Whitney or Wilcoxon signed rank tests for comparison to the highest tested concentration ($p< 0.05$ *, $p< 0.005$ ***)

Table 3: *In vitro* cytotoxicity of isolated compounds from the combined fractions CSPE4/CSPE5

	WI38 IC_{50} (µg/ml)	J774 IC_{50} (µg/ml)	IS ($IC_{50\ WI38}/IC_{50\ J774}$)
Compound 1	19.24 ± 0.55 (4.51 µM)	12.60 ± 0.23 (2.96 µM)	1.5 ***
Mixture of compounds 3a/3b	16.50 ± 0.24 (3.6 µM)	1.79 ± 0.03 (0.39 µM)	9.2 ***
Camptothecin	0.175 ± 0.08 (0.05 µM)	0.011 ± 0.004 (0.0031 µM)	15 ***

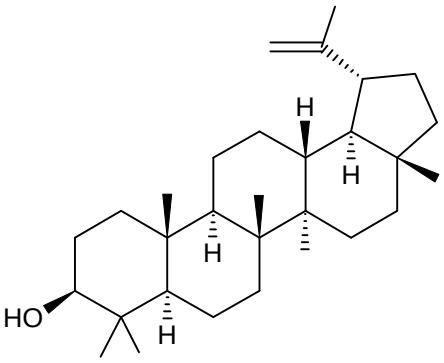
Compound 1: lupeol; Mixture of compounds 3a/3b: 25-hydroperoxycycloart-23-en-3*β*-ol and 24-hydroperoxycycloart-25-en-3*β*-ol; Camptothecin: positive control.
Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) of six determinations and activity differences between cell lines are statistically defined for each compound with the Mann-Whitney or Wilcoxon signed rank tests for comparison to the highest tested concentration ($p< 0.05$ *, $p< 0.005$ ***).

Table 4: Antimicrobial activity of active partitions of *C. scabrum* leaves

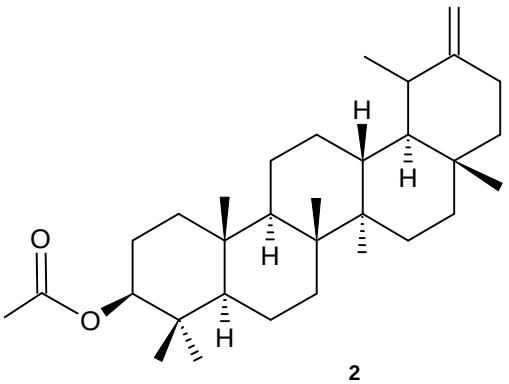
	Active partitions MIC values (µg/ml)		Reference antibiotics MIC values (µg/ml)		
	CSBt	**CSEA**	**Amox**	**Gent**	**Vanc**
Gram – bacteria					
Escherichia coli T20A2	NA	NA	S	R	**R**
Pseudomonas aeruginosa T41	NA	NA	R	S	R
Pseudomonas aeruginosa ATCC9027	NA	NA	R	S	R
Gram + bacteria					
Dermabacter hominis T47A7	**312**	**625**	R	S	S
Dermabacter hominis T49B5	**312**	**625**	S	S	S
Corynebacterium striatum T40A3	NA	NA	R	R	S
Corynebacterium striatum T46C1	NA	NA	S	S	S
Enterococcus faecalis T37B1	NA	NA	S	S	S
Enterococcus faecalis T47A16	NA	NA	R	S	S
Streptococcus agalactiae T53A4	NA	NA	R	R	R
Staphylococcus aureus T2510	**312**	**625**	R	S	S
Staphylococcus aureus T281	NA	NA	R	S	S
Staphylococcus aureus 8143	**312**	**625**	S	S	S
Staphylococcus aureus 8148	**312**	**625**	R	S	S
Staphylococcus aureus 8142	NA	NA	R	S	S
Staphylococcus aureus T61	NA	NA	R	S	S
Staphylococcus aureus T21	**312**	**625**	R	S	S
Staphylococcus aureus T11	NA	NA	R	S	S
Staphylococcus aureus T306	**312**	**625**	S	S	S
Staphylococcus aureus T26A4	**625**	**625**	R	S	S
Staphylococcus epidermidis T151	NA	NA	R	R	S
Staphylococcus epidermidis T19A1	NA	NA	S	S	R
Staphylococcus capitis T21A3	NA	NA	S	S	S
Staphylococcus capitis T29A2	NA	NA	S	S	S
Staphylococcus pottenkoferi T282	NA	NA	S	S	S
Staphylococcus pottenkoferi T33	NA	NA	R	S	S
Staphylococcus saprophyticus 8237	NA	NA	S	S	S
Staphylococcus lugdunensis T36A1	NA	NA	S	S	S
Staphylococcus lugdunensis T47B2	NA	NA	S	S	S

MIC (µg/ml) of positive controls: Amox (amoxicillin), S: ≤ 4, R: > 16, Gent (gentamicin), S: ≤ 4, R: > 8; Vanc (vancomycin), S: ≤ 4, R: >16; MIC (µg/ml) of partitions (CSBt: *C. scabrum* leaves butanol partition; CSEA: *C. scabrum* leaves ethyl acetate partition): MIC < 100 µg/ml: high activity; 100 µg/ml < MIC < 500 µg/ml: moderate activity; 500 µg/ml < MIC < 1000 µg/ml: low activity; MIC > 1000 µg/ml: NA = inactive.

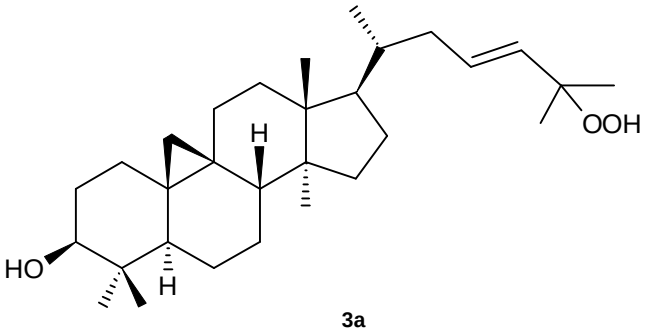
Figure 1: Compounds isolated from *Cirsium scabrum*



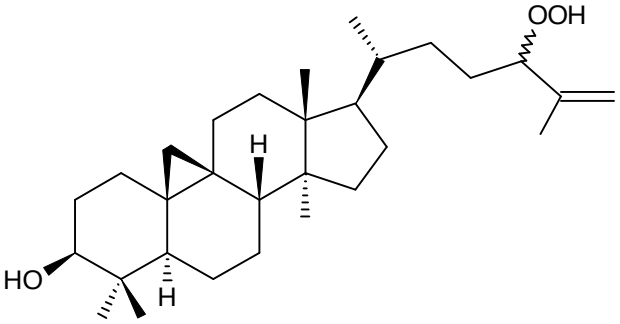
1



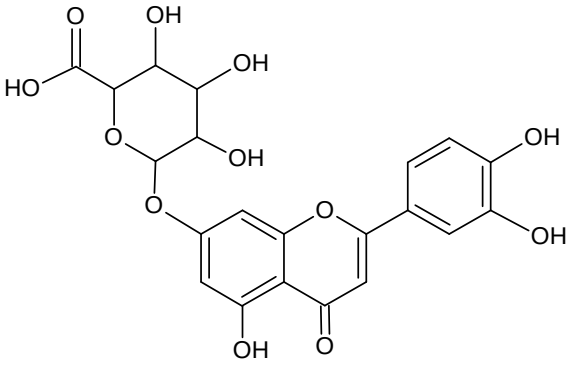
2



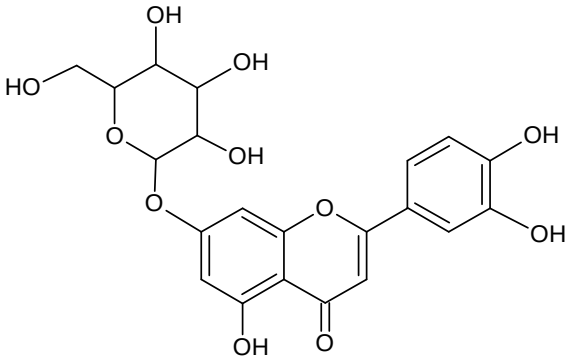
3a



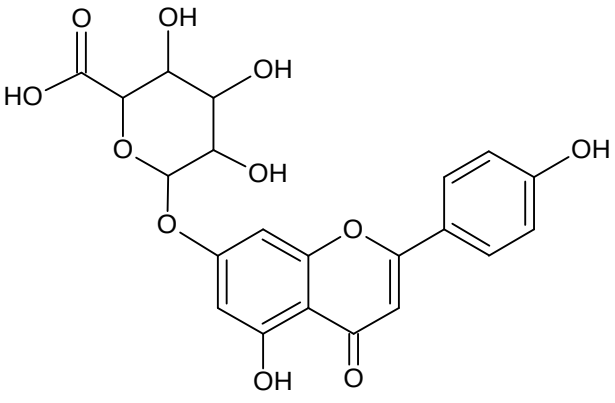
3b



4a



4b



5

III. *Juncus maritimus* : activités antivirale (virus de l'hépatite C) et antibactérienne

III.1. Identification du composé responsable de l'activité de *J. maritimus* sur le virus de l'hépatite C et caractérisation de son activité

Résumé détaillé

Suite au screening initial mené sur les 8 plantes extrêmophiles (chapitre **I**), nous avons sélectionné l'extrait des rhizomes de *J. maritimus* (JMR-CE) en raison de son activité antivirale marquée contre le virus de l'hépatite C (plus de 85% d'inhibition de l'infection virale). Un fractionnement bioguidé a été réalisé. Trois sous-extraits ont été obtenus par extraction liquide-liquide : dichlorométhane (JMR-MC), acétate d'éthyle (JMR-EA) et aqueux (JMR-H_2O). Les résultats ont montré que JMR-MC est principalement responsable de cette activité, avec plus de 98% d'inhibition de l'infection.

Dans cette présente étude, nous avons poursuivi le fractionnement bioguidé du sous-extrait dichlorométhane pour rechercher le ou les composés responsables de l'activité. Nous avons également cherché à comprendre son mode d'action contre le VHC grâce à une collaboration avec les Drs Karin Seron et Yves Rouillé (CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, Institut Pasteur de Lille), et de Marie-Emmanuelle Sahuc, doctorante au sein de leur équipe. Nous avons purifié les deux composés majoritaires de JMR-MC. Pour cela, un fractionnement a été réalisé par chromatographie de partage centrifuge (CPC) en utilisant un système de solvants approprié, Arizona X. L'analyse par CPC a donné 15 fractions (MCX1 – MCX15). A partir de la fraction MCX15, les deux composés majoritaires 1 (22,2 mg) et 2 (25,9 mg) ont été isolés par CLHP préparative. Ensuite, l'effet des deux composés isolés sur l'infection virale a été analysé de manière à déterminer l'étape du cycle viral du VHC sur laquelle les composés agissaient. Les produits sont alors ajoutés aux cellules Huh-7 infectées, à différents temps correspondants aux principales étapes du cycle viral du VHC : pendant l'entrée du virus (uniquement lors de l'inoculation : co-addition), après inoculation (post-inoculation), ou encore de façon continue (co-addition et post-inoculation).

Les deux composés (1) et (2) se sont montrés actifs sur le VHC, avec une activité élevée pour le composé (2). Ce dernier présente une activité sur l'ensemble des étapes testées du cycle viral, et particulièrement pendant l'étape post-inoculation avec plus de 95% d'inhibition de l'infection. De plus, il n'a pas montré de cytotoxicité sur les cellules Huh-7, contrairement au

composé (1). Nous avons donc cherché à élucider la structure des composés (1) et (2). Ils ont été identifiés sur la base de leurs données spectroscopiques (RMN et HR-MS). La structure de ces composés déjà connus a été confirmée par comparaison avec les données de la littérature. Le composé (1) est le juncusol (Della Greca *et al.*, 1992), et le composé (2) est son dérivé, le dehydrojuncusol (Sarkar *et al.*, 1988). Il s'agit de deux dérivés phénanthrèniques déjà identifiés chez d'autres espèces de *Juncus* (El-Shamy *et al.*, 2015).

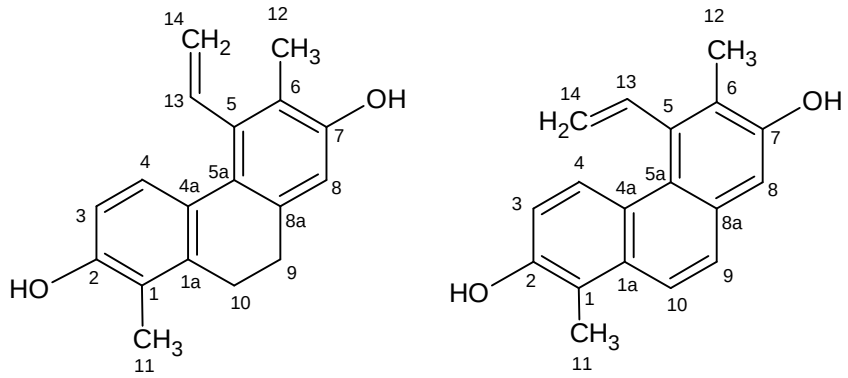


Figure 31. Structures chimiques du juncusol et du dehydrojuncusol

En raison de l'effet remarquable du dehydrojuncusol sur le VHC, nous avons cherché à analyser davantage son activité. Une première analyse confirme son efficacité en montrant qu'il est capable de diminuer les titres infectieux du VHC à partir de doses relativement faibles (2,2 µM). D'autres expériences ont montré que ce composé est particulièrement actif au cours de l'étape de post-inoculation, avec une CE_{50} de 1,53 µM, tout en étant sélectif sur les cellules Huh-7 (indice de sélectivité = 56). Pour confirmer ces résultats, nous avons vérifié que le dehydrojuncusol n'intervient pas au niveau de l'entrée du VHC dans la cellule hôte, en utilisant les particules rétrovirales pseudotypées avec les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC (VHCpp). L'analyse a montré que le dehydrojuncusol n'était pas un inhibiteur de l'entrée du VHC ; aucun effet sur l'entrée de VHCpp n'a été observé même à des concentrations élevées. Nous avons donc évalué l'activité de ce composé sur la réplication du VHC indépendamment de l'entrée. En raison de quantités limitées en dehydrojuncusol (temps de purification en quantités importantes assez long à partir de la plante), les essais ont été poursuivis en utilisant le sous-extrait dichlorométhane des rhizomes de *J. maritimus* à partir duquel le dehydrojuncusol a été purifié. Pour cela, des cellules Huh-7 exprimant de manière stable un réplicon de HCV qui exprime la NS5A (protéine non structurale impliquée dans la

réplication du VHC) marquée par la GFP, ont été utilisées. En présence du sous-extrait dichlorométhane, l'expression de la NS5A-GFP est significativement diminuée, et ceci pendant les différentes périodes de traitement, montrant que le sous-extrait dichlorométhane, et fort probablement le déhydrojuncusol, sont des inhibiteurs de la réplication du VHC. L'effet sur la réplication a donc été analysé de manière encore plus approfondie. Dans une première analyse, nous avons trouvé que le sous-extrait dichlorométhane (et potentiellement le dehydrojuncusol), agirait spécifiquement sur des protéines du VHC. Ceci a été vérifié en testant le sous-extrait dichlorométhane sur deux autres virus de la même famille du VHC (YFV et BVDV), où aucune diminution significative de l'infection par ces deux virus n'a été observée même à des concentrations qui inhibaient l'infection par le VHC.

Face aux potentialités thérapeutiques que montre le dehydrojuncusol, des essais pré-cliniques ont été effectués en utilisant l'unique modèle pré-clinique humain disponible, les hépatocytes humains primaires (PHH). En présence du dehydrojuncusol, une diminution du titre du VHC a été observée, avec une CE_{50} similaire à celle calculée dans les cellules Huh-7 (1,14 µM et 1,35 µM, respectivement). De plus, le dehydrojuncusol n'a pas montré de toxicité sur les PHH à des concentrations actives. L'ensemble des résultats obtenus jusqu'à présent plaident en faveur de l'efficacité du dehydrojuncusol comme inhibiteur de la réplication, aussi bien *in vitro*, qu'en pré-clinique.

Dans le but d'introduire le dehydrojuncusol comme une alternative prometteuse aux traitements actuels, il est important d'évaluer son activité sur les mutants résistants aux DAA « Direct Acting Antivirals » actuellement utilisés. En effet, certains patients traités par des DAA nouvellement approuvés ciblant NS5A ou NS5B deviennent résistants à la thérapie, en raison de l'apparition de mutants résistants après le traitement par des DAA anti-NS5A (daclatasvir, ledipasvir, ombitasvir). Un réplicon a donc été généré portant les mutations L31M ou Y93H qui confèrent une résistance à NS5A, notamment au daclatasvir. Les résultats ont montré que le mutant résistant L31M est très sensible au dehydrojuncusol, avec une EC_{50} de 0,22 µM. Par contre, l'inhibition du mutant résistant Y93H est partielle, avec une EC_{50} de 3,62 µM. Dans une dernière étape, nous avons cherché à mieux comprendre le mécanisme d'action du dehydrojuncusol. Pour cela, des mutants partiellement résistants au sous-extrait dichlorométhane des rhizomes de *J. maritimus* ont été sélectionnés. Il s'agit d'un double mutant dans NS5A, T24S-L31M. Les trois mutants obtenus (T24S, L31M et T24S-L31M) après insertion de ces mutations dans JFH1 ont été testés avec le sous-extrait dichlorométhane, montant que les mutations doubles T24S-L31M semblent conférer une

résistance modérée au dehydrojuncusol, semblable à celle observée avec la mutation Y93H. Les mutants L31M sont toujours aussi sensibles, de même que les mutants T24S.

Pour conclure, NS5A semble bien être la cible du dehydrojuncusol, avec trois mutations qui confèrent une résistance partielle à cette molécule (T24S-L31M et Y93H). D'autre part, l'ensemble des mutations étudiées sont résistantes au daclatasvir, suggérant que le déhydrojuncusol peut s'introduire comme une potentielle alternative au daclatasvir.

Contribution personnelle. Pour réaliser cette étude, j'ai dû purifier le composé responsable de l'activité antivirale du sous-extrait dichlorométhane des rhizomes de *J. maritimus*. Le sous-extrait étant très riche en composés ayant des polarités très proches, la mise en place d'une stratégie rapide pour purifier les produits a nécessité différents essais, notamment pour déterminer le système de solvants adéquat en CPC (Arizona Z), ainsi que les gradients de solvants à utiliser en CLHP préparative. De plus, ce travail a nécessité des quantités élevées en dehydrojuncusol et en sous-extrait dichlorométhane, nécessitant donc de renouveler les opérations de collecte, de préparation des échantillons, d'extraction, de purification, et finalement de vérification de la pureté des composés par CLHP-UV et RMN.

Dehydrojuncusol, a natural phenanthrene compound extracted from *Juncus maritimus* is a new inhibitor of hepatitis C virus replication

Marie-Emmanuelle Sahuc[1]*, Ramla Sahli[2,3]*, Céline Rivière[2], Véronique Pène[4], Muriel Lavie[1], Abderrazak Smaoui[3], Arielle Rosenberg[4], Jean Dubuisson[1], Riadh Ksouri[3], Yves Rouillé[1], Sevser Sahpaz[2], Karin Séron[1]

[1]CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, Univ. Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR 8204 –F-59000 Lille, France, [2] ICV - Institut Charles Viollette, Univ. Lille, INRA, ISA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, EA 7394, F-59000 Lille, France, [3]Laboratory of Aromatic and Medicinal Plants, Biotechnology Centre of Borj-Cédria (CBBC), Hammam-lif, Tunisia, [4]Univ. Paris Descartes, EA4474 "Hepatitis C Virology", F-75014 Paris, France.

* Equal contribution

Corresponding author: Karin Séron, Molecular & Cellular Virology, CIIL, INSERM (U1019) & CNRS (UMR8204), Institut Pasteur de Lille, Bâtiment IBL, 1 rue Calmette, CS50447, 59021 Lille cedex, France. Tel: (+33) 3 20 87 11 99; Fax: (+33) 3 20 87 12 01; E-mail: karin.seron@ibl.cnrs.fr

Keywords Hepatitis C, antiviral agent, natural compound, phenanthrene, dehydrojuncusol

Abstract

Hepatitis C virus (HCV), causing hepatitis C, is present in approximately 170 million people worldwide. Recent emergence of direct acting antivirals (DAAs) targeting HCV proteins, has considerably enhanced the success of antiviral therapy. However, the apparition of DAA resistant-associated variants is a cause of treatment failure. The cost of the therapy is extremely high and not accessible in countries with inadequate medical infrastructures. Therefore, search for new inhibitors and with lower cost of production, like natural compounds, should be pursued. In this context, sixteen crude methanolic extracts of extremophile plants from Tunisia were screened against HCV in cell culture. Infection rates in Huh-7 hepatoma cells were investigated by indirect immunofluorescence assay. The rhizome crude extract of *Juncus maritimus* Lam., exhibited the highest antiviral activity. Bio-guided fractionation showed that the methylene chloride partition was most likely responsible for this activity. Among the compounds isolated and identified from this partition, dehydrojuncusol, was the most active. A time-addition assay showed that dehydrojuncusol significantly inhibited HCV infection when added during the post-inoculation step (EC_{50} = 1.31 µM). Inhibition of HCV replication was confirmed using a cell line stably expressing a HCV subgenomic replicon. No *in vitro* toxicity on Huh-7 cells at active concentrations was observed and no effect on HCV pseudoparticule entry. Antiviral activity of dehydrojuncusol was also demonstrated in primary human hepatocytes, the most relevant human pre-clinical model for HCV infection. Interestingly, dehydrojuncusol was able to inhibit replication of two frequent daclatasvir resistant mutants (carrying the mutations L31M or Y93H in NS5A). Finally, two linked mutations in NS5A (T24S-L31M) were identified in dehydrojuncusol resistant mutants and were shown to confer partial resistance to the drug. In conclusion, dehydrojuncusol, a natural compound, extracted from *J. maritimus*, inhibits HCV replication and is active against HCV resistant variants frequently found in patients with treatment failure, and may target the viral protein NS5.

Introduction

Hepatitis C is a major cause of chronic hepatitis often associated with complications, such as liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Levrero, 2006; Messina et al., 2015). Approximately 170 million people are infected with hepatitis C virus (HCV) worldwide (Lavanchy, 2011). To date no vaccine is available against HCV, mainly due to the diversity of viral isolates (Tarr et al., 2015). In recent decades, various treatments have been established. Before 2011, a standard therapy combining pegylated interferon alpha and ribavirin (a guanosine analogue) was administered to patients (Liang and Ghany, 2013). The first direct-acting antiviral agents (DAA), targeting the NS3/4A protease activity, effective only against genotype 1 HCV-infected patients and inducing side effects, were released in 2011. Since then, other viral proteins have been targeted like RdRp NS5B and NS5A, a protein involved in replication and assembly of the virus but with no enzymatic activity. New inhibitors have been marketed with high rates of sustained virologic response against all genotypes and very few side effects (Pawlotsky, 2014). However, these treatments are very expensive and not accessible to all people infected (Graham and Swan, 2015). Moreover, there is a risk of selecting viral variants resistant to DAA leading to failure of the therapy, which will require new treatments (Pawlotsky, 2016).

HCV, a member of the *Flaviviridae* family, is an enveloped, single stranded RNA virus (Lindenbach et al., 2007) encoding for a single polyprotein which is cleaved co- and post-translationally in ten proteins. Structural proteins are components of infectious viral particles, whereas non-structural proteins are involved in the replication of the viral genome and the production of new infectious particles in infected cells. The HCV life cycle can be divided into three major steps: entry, replication, and assembly/release. At each step, different sets of viral proteins and host factors are involved. HCV entry (Bartosch and Dubuisson, 2010) is a complex mechanism initiated first by the binding of particles to non-specific and specific entry factors, then endocytosis and fusion of viral envelope and the endosomal membrane leading to release of viral RNA genome into the cytoplasm. Viral envelope proteins E1 and E2 are involved in the entry process. The replication of the RNA genome takes place in the ‘membranous web’ which are endoplasmic reticulum rearranged membranes (Egger et al., 2002). The replication complex is composed of viral proteins NS3/4A, NS4B, NS5A and NS5B. Finally, new virions assemble in association with lipid droplets (Miyanari et al., 2007), bud into the endoplasmic reticulum and infectious viral particles are secreted out of the cells via the secretory pathway.

The present hepatitis C therapy is very efficient but lead to the apparition of resistant associated substitutions (RASs). Some of the RASs are specific to a DAA, this is the case for NS5B RASs but

some of them appear independently of the DAA used, especially for NS3/4A and NS5A RASs (Sarrazin, 2016). Patients with NS5A resistant variant are very difficult to treat and re-treatment with a combination of anti-NS5B and anti-NS5A antiviral does not always lead to a high sustained antiviral response. Moreover, these mutated viruses are persistent for years in blood serum (Pawlotsky, 2016). Lack of alternative therapy might be a problem for these patients in the future.

Natural products from plant species maintain a strong position in the drug discovery (Newman and Cragg, 2012). Between 1981 and 2010 marketed molecules with plant origin had antimicrobial activities. A number of metabolites found in plants, among which are the phenolic compounds, are being cited as antimicrobials and resistance-modifying agents (Abreu et al., 2012; Gibbons, 2004). If the artemisinin derivatives are well known for their antimalarial activity, researchers continue to study plant-derived natural products as source of new antimalarial drugs to fight emerging multidrug resistant strains of malaria parasites, including synthetic analogues of natural compounds (Wright, 2010). In fact, even if natural products are not always used directly as medicines, they often remain a source of inspiration for medicinal chemistry, with semisynthetic modifications, or pharmacophore with natural origin (Newman and Cragg, 2012). Extremophile plants either xerophytes (growing in arid climate), or halophytes (growing in saline soils) are natural reservoirs of rare bioactive compounds. To live in this environment, the plants should be able to develop several physiological, biochemical and molecular mechanisms, including biosynthesis of osmolytes and bioactive molecules enzymatic or not enzymatic. By these molecular mechanisms, extremophile plants can resist to abiotic stresses and to infections by producing phytoalexins (Ksouri, 2012). Rare compounds with unique or common chemical structure present in extremophile plants might help to identify new DAA against HCV with unexpected mechanism of action.

Numerous DAA from natural origin are now described and are able to target different steps of HCV infectious cycle (Calland et al., 2012). Crude extracts from plants used in traditional medicine are also promising source of antiviral molecules. However, only silymarin, a standardized extract of Milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn., Asteraceae) and some of its metabolites, silibinin A and B, a mixture of two diastereoisomers of flavonolignans, are developed in clinical trials to be used in hepatitis C infected patients (Polyak et al., 2013). It is estimated that the new DAA therapy against hepatitis C will benefit to a very small part of the patients (Hajarizadeh et al., 2013). The use of plant extracts or compounds isolated from these extracts should render the therapy more accessible to many patients in developing countries. Therefore search for such compounds and extracts is still needed to treat the vast majority of the patients in the coming decades. In this context, we have screened halophyte and xerophyte plant extracts from Tunisia for their anti-HCV activity. This led us to identify *Juncus maritimus* rhizome extract for its capacity to inhibit HCV infection (Sahli et al., in press). Thanks to a bio-guided fractionation approach, dehydrojuncusol, the active compound inhibiting HCV infection was identified and its mechanism of action against HCV replication characterized.

Materials and methods

Chemicals

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Opti-MEM, phosphate buffered saline (PBS), glutamax-I, fetal bovine serum were purchased from Eurobio. 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) was from Molecular Probes (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA). EGCG was from Calbiochem (MerckChemicals, Darmstadt, Germany) and was >95% pure. Delphinidin chloride was from Extrasynthèse (Lyon, France) and was >96% pure. Daclatasvir (BMS-790052) was from Selleckchem (France). Stocks of EGCG and delphinidin were resuspended in dimethylsulfoxide (DMSO) at 0.5 M. Plant extracts were resuspended in DMSO at 25 mg/mL. Boceprevir was kindly provided by Philippe Halfon (Hôpital Européen, Laboratoire Alphabio, Marseille, France). Other chemicals were from Sigma (St. Louis, MO).

Antibodies

The anti-E1 monoclonal antibody (A4) (Dubuisson et al., 1994), anti-yellow fever virus (YFV) envelope protein 2D12 antibody and anti-bovine viral diarrhea virus (BVDV) NS3 protein OSC-23 antibody were produced *in vitro* by using MiniPerm apparatus (Heraeus, Hanau, Germany). The anti-NS5A (2F6/G11) was from Austral Biologicals (San Ramon, USA). Mouse anti-β tubulin Mab (TUB 2.1) was from Sigma. Cy3-conjugated goat anti-mouse IgG and peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG antibodies were from Jackson Immunoresearch (West Grove, PA, USA).

Cells and culture conditions

Huh-7 (Nakabayashi et al., 1982) and HEK 293T (ATCC number CRL-11268) were grown in DMEM supplemented with glutaMAX-I and 10% fetal bovine serum (complete culture medium), and Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK; ATCC number CCL-22) in DMEM supplemented with glutaMAX-I and 10% horse serum in an incubator at 37°C with 5% CO_2. The primary human hepatocytes were from (Biopredic International, Saint-Grégoire, France) and maintained in primary culture as described previously (Calland et al., 2015) (Podevin et al., 2010).

Collection of plant, extraction and purification of natural products

Juncus maritimus rhizomes were collected in October 2013 from a coastal region in the North-East of Tunisia (Soliman) and a voucher specimen (184) was deposited at the Herbarium of the Laboratory of Extremophile Plants at the Biotechnology Centre (Technopark of Borj-Cédria). Dried and powdered rhizomes were soaked in methanol (15 mL/g; 1 x 24 h; 2 x 48 h) to afford 300.0 g of a crude methanolic extract. A part of the extract (215.0 g) was dissolved in water and then partitioned with methylene chloride (CH_2Cl_2) to afford a CH_2Cl_2 partition (15.0 g). Preparative Centrifugal Partition Chromatography (CPC) (Armen Instrument) was carried out on CH_2Cl_2 partition (1.45 g) using a quaternary biphasic solvent system Arizona X (n-Hept/EtOAc/MeOH/H_2O; 9:1:9:1; v/v/v/v) in ascending mode for 30 min. Fifteen fractions (MCX1 to MCX15) were pooled according to TLC and UV analysis. Compounds 1 (22.2 mg) and 2 (25.9 mg) were isolated from MCX15 (200 mg) by preparative High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Shimadzu instrument) using the following elution program (EP1): 10-38% B (0-2 min), 38-45% B (2-8 min), 45-51% B (8-25 min), 51-96% B (25-26 min), 96%-96.1% B (26-29 min), 100% B (29-35 min).

HCVcc

We used a modified JFH1 strain (Japanese Fulminant Hepatitis-1, genotype 2a) containing cell culture adaptive mutations (Delgrange et al., 2007; Goueslain et al., 2010). The viral stock was produced in Huh-7 cells. Huh-7 cells were infected with a pre-stock of HCVcc in flasks. After 24h, 48h and 72h the supernatants of flasks were collected. The titer of the stock was 5.10^6 focus forming unit (ffu)/mL. For infection assay, Huh-7 cells, 6000/well, seeded in 96-well plate were inoculated with HCVcc at a multiplicity of infection (MOI) of 0.8 during 2h at 37°C then the inoculum was removed and cells were incubated in complete culture medium for 28h at 37°C. Compounds were added to cells at 25 µg/mL either for 2h at 37°C before infection (preincubation condition), for 2h at 37°C in the presence of the virus (inoculation condition), for 28h at 37°C after virus removal (post-inoculation condition) or both during the 2h infection and 28h post-infection periods (inoculation and post-inoculation condition). Cells were fixed with ice-cold methanol and subjected to immunofluorescent detection of viral E1 envelope protein.

HCV grown in primary culture (HCVpc)

For HCV infection, PHH were inoculated 3 days post-seeding at a MOI of 5 with a non-modified JFH1 virus (HCVcc), as previously described (Podevin et al., 2010). After 6h incubation at 37°C, the inoculum was removed, and monolayers were washed 3 times with PBS. Supernatants containing

infectious HCVpc were harvested 2 days later, and infectious titers were evaluated by a focus-forming assay on Huh-7 cells as previously described (Pène et al., 2009).

BVDV and YFV

Bovine viral diarrhea virus (BVDV, strain NADL) was produced in MDCK cells as previously described (Lecot et al., 2005). Yellow fever virus (YFV, strain 17D) was produced in SW13 cells. Infection assays were performed with MDBK cells (BVDV) or Huh-7 cells (YFV) seeded 96-well plates, at a multiplicity of infection (MOI) of 1.5 or 1, respectively. Cells were infected for 1 hour at 37°C. The viral inoculum was removed and the cells were further cultured for either 15 hours (BVDV) or 23 hours (YFV). Cells were fixed with paraformaldehyde 3% in PBS and subjected to immunofluorescent detection of NS3 (BVDV) or E (YFV).

HCV particle pseudotyped (HCVpp)

Retroviral pseudoparticles expressing HCV envelope glycoproteins E1E2 of genotype 2a (HCVpp) were produced in HEK-293T cells as described (Bartosch et al., 2003). Huh-7 cells were seeded in 48-well plates and inoculated with HCVpp in the presence of compounds for 2h. Inoculum was removed and replaced with fresh medium without compound. Cells were lysed 48 hpi in 50 µl of 1x Luciferase Lysis Buffer (Promega, Madison, USA) and luciferase activity was quantified in a Tristar LB 941 luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) using luciferase Assay System (Promega) as recommended by the manufacturer.

Immunofluorescent detection assay

HCVcc, YFV and BVDV infected cells grown in 96-well plates were processed for immunofluorescence detection of viral proteins, as previously described (Rouillé et al., 2006). Nuclei were stained with 1 µg/mL of DAPI, and infected cells were detected by immunofluorescent labeling of E1 envelope glycoprotein (HCV), E envelope protein (YFV) and NS3 protein (BVDV) followed by Cy3-conjugated anti-mouse secondary antibody. For BVDV and YFV infection assays, the plates were observed with an Axiophot microscope equipped with a 10X-magnification objective (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). Fluorescent signals were collected with a Coolsnap ES camera (Photometrix, Kew, Australia). Images of infected cells (Cy3 channel) and of nuclei (DAPI channel) present in 20 randomly picked areas from each well were recorded. The number of total cells and of infected cells were quantified using ImageJ software. For quantification of HCVcc infection, confocal images were

recorded with an automated confocal microscope IN Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare Life Sciences) using a 20x objective with exposure parameters 405/450 nm and 561/610 nm. Six fields per well were recorded. Each image was then processed using the Colombus image analysis software (Perkin Elmer). Nuclei were first segmented and the cytoplasm region was extrapolated based on the DAPI staining. Objects with a specific and predefined size were defined as cells. The ratio of infected cells over total cells represents the infection rate. For each virus, the number of cells per well and MOI were determined in order to have 30 to 40% of infected cells in control experiments with no inhibitor. Infection rates in DMSO controls were expressed as 100%.

Determination of the half maximal effective concentration (EC_{50}) of dehydrojuncusol

Huh-7 cells were inoculated for 2h at 37°C with HCVcc and the inoculum was removed and replaced with culture medium for 28h at 37°C in the presence of increasing concentrations of dehydrojuncusol. Cells were fixed in iced-cold methanol and processed for immunofluorescent detection assay. EC_{50} values were calculated with Graph Pad Prism software (Version 5.0b).

Viability Assay

Huh-7 cells were plated in 96-well plates at a density of 6.000 cells/well and then were incubated the next day in 100 µL of culture medium containing increasing concentrations of dehydrojuncusol for either 24, 48, or 72h. An MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]-based viability assay (Cell Titer 96 Aqueous non-radioactive cell proliferation assay, Promega) was realized as recommended by the manufacturer. The absorbance of formazan at 490 nm is detected using an ELISA plate reader (ELX 808 Bio-Tek Instruments Inc). Each measure was performed in triplicate.

HCV replicons

The plasmid pSGR-JFH1 encoding a sub-genomic replicon of JFH-1 strain was obtained from Dr T Wakita (Kato et al., 2003). A *Bgl*II and an *Nsi*I restriction sites were inserted between codons Pro419 and Leu420 of NS5A, and the coding sequence of EGFP was then inserted between these two sites. This position was previously shown to accept a GFP insertion in a sub-genomic replicon of the CON-1 strain (Moradpour et al., 2004). To insert mutations in the replicon, the NS5A coding sequence was amplified from pSGR-JFH1-NS5AGFP plasmid by PCR with two primers: (1) 5'-GCCACATGCATGCAAGCTGA-3' and (2) 5'-TCGCCCCTTGCTCACAGATCT-3' and the

amplified DNA was purified. Then mutations Met31Leu (M31L) and Tyr93His (Y93H) were inserted independently by PCR using two primers, 5'-GCCCGGGCATCTTGGGGAAC-3' and 5'-TTCCCCAAGATGCCCGGGCTCCCCTT-CATC-3' for M31L, and 5'-CCCTCCGTGTGGCAATTAATAGGAAAGGT-3' and 5'-TATTAATTGCCACACGGAGGG-3' for Y93H. Plasmid pSGR-JFH1-NS5AGFP and PCR amplified DNA containing mutated sequences were digested with *Nsi*I and *Bgl*II restriction enzymes, and PCR fragment inserted by ligation into the plasmid. All constructs were verified by sequencing. These plasmids were *in vitro* transcribed before electroporation into Huh-7 cells. Cells that express wild type and mutated replicons were selected for using 500 µg/mL of geneticin during 15 days and cultured in a medium containing 250 µg/mL of geneticin.

Replication assay

Huh-7 cells stably expressing wild type or mutated replicons were seeded in 24-well plates and incubated with the different compounds for 24h, 48h and 72h. They were lysed in ice cold lysis buffer (Tris HCl 50mM, NaCl 100 mM EDTA 2 mM Triton-100 1% SDS 0.1%) on ice for 20 min. Lysates were collected and 20 µg of proteins were analyzed by Western blotting using anti-NS5A and anti-β tubulin antibodies. Peroxidase-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (Jackson Immunoresearch) was used for the revelation using ECL western blotting substrate (Thermo Fischer Scientific).

Wild-type, L31M and Y93H replicon cell lines were seeded in 96-well plates and incubated with boceprevir, daclatasvir or methylene chloride partition at given concentration for 72h. Cells were fixed with PFA 3% for 30 min. The cells were counted by labeling of nuclei with DAPI (0.5 µg/mL). Number of GFP-positive cells was quantified with a Zeiss Axiophot 2 microscope equipped with a 40×/1.3 numerical aperture lens. Fluorescence signals were analyzed as described previously.

Selection of dehydrojuncusol-resistant replicon and virus, and identification of resistance mutation

To obtain JFH1 dehydrojuncusol-resistant mutants, supernatants of HCV-infected cells were serially passaged with increasing concentrations (10-50 µg/mL) of methylene chloride partition of *J. maritimus* rhizome extract. Total RNA was extracted, non-structural protein coding region (NS2-NS5B) was amplified by reverse transcription-PCR and sequenced with specific primers. Mutations were identified by analysis of the DNA sequence compared to the initial and control passages in the

absence of compound. The identified mutations were reintroduced into replicon or JFH1 plasmids by PCR mutagenesis, and the plasmids were sequenced.

Statistical Analysis

The results were presented as means ± SEM of three independent experiments performed in triplicate. The statistical test used is a Mann-Whitney non-parametric test (Test t) with a confidence interval of 95%. The data were analyzed using Graph Pad Prism (Version 5.0b) by comparisons between each treated group and untreated group (DMSO control).

Results

Dehydrojuncusol present in the methylene chloride partition of *J. maritimus* rhizome extract is an inhibitor of a late step of HCV infection

We have previously screened sixteen plant extracts from eight different Tunisian extremophile plants for the presence of antiviral compounds (Sahli et al., in press). Our results demonstrated that stem, rhizome and flower extracts from *Juncus maritimus*, and stem and leaf extracts from *Silene succulenta* significantly decrease HCV infection. The strongest antiviral activity was observed for *J. maritimus* rhizome extract, a halophyte plant belonging to Juncaceae family. The methylene chloride partition of *J. maritimus* rhizome extract was the most active against HCV (Sahli et al., in press). To go further in the characterization of antiviral activity and identify active compound(s) a bio-guided fractionation was performed. This partition was further fractionated in order to isolate two major phenanthrene derivatives (1 and 2). Their antiviral activity was determined. A time-addition assay was performed with the purified compounds added either only during virus inoculation or only post-inoculation or continuously during both steps. As shown in **Figure 1A**, compounds (1) and (2) were both active against HCV, compound (2) being the most active in the different conditions tested, co-addition, post-inoculation and continuously during infection. Only compound (1) significantly decreased the number of cells (**Figure 1B**) showing limited cytotoxicity. Compounds (1) significantly inhibited HCV infection at the post-inoculation step, whereas compounds (2), was active both at inoculation and post-inoculation steps. The compound (2) was the most active at the post-inoculation step with more than 95% inhibition of HCV infection. The chemical structures of the two major compounds were determined by comparison of their spectroscopic data (NMR and MS) with literature values. Compounds 1 and 2 were identified as two known phenanthrene derivatives, respectively juncusol

(Della Greca et al., 1992) and dehydrojuncusol (Sarkar et al., 1988). (**Figure 2A**). The purity of these compounds was checked by UV-DAD (juncusol: 99.5%; dehydrojuncusol: 98.8%). As compound (2), dehydrojuncusol, was the most active, we decided to further analyze its antiviral activity.

The antiviral effect of dehydrojuncusol was further examined by measuring HCV infectious titers. A dose-dependent decrease of the infectious titer was observed, with a 1-$\log_{10}$ decrease at 2.2 µM confirming its high anti-HCV capacity (**Figure 2B**). Time-addition assay of dehydrojuncusol was performed and confirmed that this compound was significantly more active during a post-inoculation step **(Figure 2C)**. No effect of dehydrojuncusol was observed when cells were preincubated with the compound 2h before inoculation and when it was co-added with the virus. To measure the EC_{50}, a dose-response inhibition experiment was then performed with Huh-7 cells incubated with increasing concentrations of dehydrojuncusol at different steps of the infection, either during inoculation, or post-inoculation or continuously (**Figure 2D**). The results show that the EC_{50} of dehydrojuncusol was 1.35 µM when added continuously, 8.21 µM when added during inoculation, and 1.53 µM when added post-inoculation, confirming the major effect of the molecule at the post-inoculation step. The toxicity of the compound on Huh-7 cells was also tested in parallel at different time points, 24h, 48h, and 72h. The results showed that the cytotoxic concentration (CC_{50}) of dehydrojuncusol was approximately 75.6 µM (**Figure 2E**), much higher than the active dose, yielding a selective index of 56.

Taken together, these results showed that dehydrojuncusol inhibited predominantly a late step of HCV infectious cycle, most likely the replication, and, to a lesser extent, an early step of infection, potentially the entry step.

Dehydrojuncusol inhibits replication of HCV and not entry

As shown above, dehydrojuncusol seems to inhibit both early and late steps of HCV infection. To determine if the molecule is able to inhibit HCV entry, HCVpp expressing E1E2 envelope glycoprotein at their surface were produced and used to infect Huh-7 cells in the presence of dehydrojuncusol at different concentrations. Delphinidin at 50 µM, an inhibitor of HCV entry, was added as a control. A strong inhibition of HCVpp infection was observed with delphinidin. In contrast no effect of dehydrojuncusol on HCVpp entry was observed even at concentration up to 94.7 µM (**Figure 3A)**. This result showed that dehydrojuncusol was not an inhibitor of HCV entry.

To test the activity of dehydrojuncusol on replication independently of entry, Huh-7 cells stably expressing a HCV-replicon were used. This replicon, SGR-JFH1-NS5AGFP, expresses a GFP-tagged NS5A. Due to some difficulties to purify enough dehydrojuncusol in sufficient quantity from *J. maritimus* extract to perform all the tests, the methylene chloride partition was used. The replicon cells were incubated with methylene chloride partition and lysed at different time points. Boceprevir, an

inhibitor of NS3/4A protease and daclatasvir, an inhibitor of NS5A protein, were used as controls. The activity of the molecules against HCV replication was determined by quantifying the expression of NS5A-GFP protein by Western blots. As shown in **Figure 3B**, the expression of NS5A-GFP was decreased in replicon cells incubated with boceprevir, daclatasvir and methylene chloride partition of *J. maritimus*, showing an inhibitory effect of dehydrojuncusol on HCV replication. Inhibition was observed at all time points, 24h, 48h and 72h of treatment, showing a rapid antiviral activity of methylene chloride partition. Taken together, these results showed that methylene chloride partition of *J. maritimus* and most likely dehydrojuncusol were inhibitors of HCV replication.

Dehydrojuncusol has no effect on BVDV and YFV

We tested the antiviral effect of the methylene chloride partition of *J. maritimus*, containing dehydrojuncusol, against two other members of the *Flaviviridae* family, YFV and BVDV, and, as shown in **Figure 3C**, after treatment with 10 µg/mL of *J. maritimus* methylene chloride partition, a concentration that significantly inhibit HCV infection, no significant decrease in infectivity was observed neither for YFV nor for BVDV. This result shows that dehydrojuncusol is not active against all the members of the *Flaviviridae* family. This suggested that it could target HCV protein(s) directly or a cellular factor specifically involved in HCV replication.

Dehydrojuncusol inhibits HCV infection in PHH

Primary human hepatocytes (PHH) are the unique human pre-clinical model available to test the activity of an inhibitor on HCV infection. A dose-response experiment was performed in PHH inoculated with JFH-1. PHH were infected during 72h and supernatants containing HCVpc were used to infect Huh-7 cells to measure infectious titers. As shown in **Figure 4A**, a dose-dependent decrease of HCV titer was observed with dehydrojuncusol showing that the molecule is able to inhibit HCV infection in PHH. Very interestingly, the EC_{50} of dehydrojuncusol in PHH is 1.14 µM, similar to the EC_{50} calculated in Huh-7 cells, 1.35 µM. The toxicity of the molecule in PHH was measured and the results presented in **Figure 4B** showed that dehydrojuncusol was not toxic in PHH at active concentrations.

Dehydrojuncusol inhibits replication of HCV mutants resistant to NS5A inhibitors

Some patients treated with the newly approved DAA molecules targeting NS5A or NS5B become resistant to the therapy due to the apparition of HCV resistant mutants. Once present in patients, these

resistant mutants are very difficult to eliminate, particularly for the resistant mutants appearing after treatment with anti-NS5A molecules, like daclatasvir, ledipasvir or ombitasvir. To determine if dehydrojuncusol could be active against HCV resistant mutants, we generated mutated replicon harboring point mutation L31M or Y93H. These two mutations conferred resistance to NS5A targeting drugs, including daclatasvir, ledipasvir and ombitasvir, in patients infected with HCV of different genotypes, and are often associated with treatment failure (Pawlotsky, 2016; Sarrazin, 2016). Huh-7 cells harboring mutant replicons were incubated with methylene chloride partition of *J. maritimus*, containing dehydrojuncusol, and lysed after 72h of treatment. Daclatasvir and boceprevir, were used as controls. As shown in **Figure 5A**, in the L31M and Y93H replicon cell lysates, the NS5A-GFP protein is detected after 72h of treatment with daclatasvir showing that the replicon are resistant to daclatasvir at 0.5 nM. When treated with boceprevir, NS5A-GFP is not detected showing that the mutants are still sensitive to boceprevir, as expected. In cells expressing mutated replicon treated with methylene chloride partition at 10 µg/ml, NS5A-GFP was not detected in the L31M mutant showing that dehydrojuncusol is able to inhibit resistant mutant replication. However, it was still detectable at lower level in the Y93H daclatasvir resistant mutant, showing that this mutant is partially resistant to dehydrojuncusol. To quantify this activity, a dose-response experiment was performed on replicon cells treated with either daclatasvir or dehydrojuncusol and the number of cells expressing NS5A-GFP after 72h of treatment was quantified. As shown in **Figure 5C**, the L31M mutant was very sensitive to the dehydrojuncusol with an EC_{50} of 0.22 µM similar to wild-type 0.40 µM. As expected, the Y93H daclatasvir-resistant was less sensitive to dehydrojuncusol than the wild-type replicon, with an EC_{50} of 3.62 µM. However, the EC_{50} fold change was only of 9, much lower than the one observed with daclastasvir as observed in **Figure 5B** and which was calculated to be over 100 (Fridell et al., 2011).

Mutants resistant to dehydrojuncusol

In order to further investigate the mechanism of action of dehydrojuncusol, we selected partially resistant mutants to the methylene chloride partition of *J. maritimus* rhizome extract after 8 passages of JFH1 virus in Huh-7 cells in increasing concentration of compounds. We searched for mutations in HCV non-structural genes (NS2 to NS5B) and identified a double mutant in NS5A, T24S-L31M. These mutations were inserted in JFH1 by reverse genetic and the resistance of the viruses to dehydrojuncusol investigated in a dose-response study. Interestingly, this double mutation was already identified in ombistasvir resistant replicon of genotype 2a T24A(L31), as well as the single mutation T24A (Krishnan et al., 2015). Three mutants were obtained, JFH1 T24S, L31M and T24S-L31M. We also tested the daclatasvir resistant mutant Y93H as a control. As shown in **Figure 6A**, as expected, all the mutants were resistant to daclatasvir. However, double mutations T24S-L31M seemed to confer a moderate resistance to dehydrojuncusol, similar to the one observed with JFH1 Y93H. The mutants

L31M is as sensitive as WT JFH1 to dehydrojuncusol, confirming the results obtained with the replicon (**Figure 5C**), as well as the T24S single mutant (data not shown). Taken together, these results seemed to demonstrate that (i) NS5A is the target of dehydrojuncusol with three mutations in NS5A that conferred partial resistance to this molecule (T24S-L31M and Y93H), and (ii) all the HCV mutants resistant to daclatasvir could be inhibited by dehydrojuncusol.

Discussion

Plants are known to be an important source of numerous bioactive compounds (Newman and Cragg, 2012). Here, we highlighted the strong inhibition HCV replication in HCVcc system of a bioactive molecule, dehydrojuncusol, isolated from a *J. maritimus* rhizomes extract. More interestingly, we also showed that this natural product strongly inhibited the virus in PHH, which are the only human preclinical model for hepatitis C. Many different drugs are now available to cure hepatitis C, but in some patients, apparition of viral variants resistant to the treatment makes them difficult to cure, especially for NS5A resistant mutants. Unfortunately, the sets of marketed molecules available are not efficient to cure such resistant viruses (Pawlotsky, 2016). In this work, we demonstrate that dehydrojuncusol has the capacity to inhibit NS5A resistant mutants appearing in patients treated with anti-NS5A inhibitors, L31M and Y93H, which are two major resistant variants appearing after treatment with NS5A inhibitors daclatasvir, ledipasvir and ombitasvir (Pawlotsky, 2016; Sarrazin, 2016). These mutants are often associated with treatment failure.

We tried to identified the viral target of dehydrojuncusol, and, quite surprisingly, it seemed to be NS5A as 3 mutations (T24S-L31M, Y93H) that conferred partial resistance to this compound were identified in this protein. The mutations T24S-L31M should be linked because they did not confer resistance to dehydrojuncusol when present individually in JFH1. Unfortunately, in a mechanistic point of view, the resistance was partial and the target of dehydrojuncusol was not clearly identify even if all the mutations were located in the domain I of NS5A. It could have been not easy to obtain mutants with high resistance to dehydrojuncusol because we used the methylene chloride partition of *J. maritimus* rhizome extracts to obtain the mutants, due to the difficulties to purify high amount of dehydrojuncusol needed for this experiment. This partition contained different compounds that may also have been active against HCV. As shown in **Figure 1A**, juncusol (compound 1) was also active but with an uncharacterized mechanism of action, and other minor compounds may also possessed an anti-HCV activity (data not shown). The complexity of the composition of the partition may have rendered the identification of dehydrojuncusol resistant mutants more difficult. However, the lack of complete resistance of the different mutants was also encouraging in a therapeutic point of view,

because it meant that dehydrojuncusol could be a molecule used for patients with treatment failure. Therefore, dehydrojuncusol or molecules derived from dehydrojuncusol might be of great interest in the future to cure patients with resistant variants and treatment failure. Furthermore, the present therapy is suboptimal for patients infected with HCV genotype 3a. It will be interesting to test the efficacy of dehydrojuncusol against HCVcc of genotype 3a.

Unexpectedly for a replication inhibitor, dehydrojuncusol also inhibits HCV infection when it is added to the cells during virus contact and removed later on (**Figure 2C** and **2D**). This ability to inhibit an early step of HCVcc infection is probably not due an inhibition of HCV entry as this molecule is not active on HCVpp (**Figure 3A**). It is likely that this effect results from dehydrojuncusol molecules that enter cells during viral inoculation, remain trapped inside the cells and are able to inhibit HCV replication afterwards.

The EC_{50} of dehydrojuncusol is near 1 µM, both in HCVcc system and in PHH, a concentration relatively low for a natural product. This molecule might serve of a starting point for a study of structure activity relationships and drug design to increase its antiviral capacity and reduce its EC_{50}. It is rare that a compound is as active in Huh-7 as in PHH. Its toxicity in Huh-7 cells is relatively low with a CC_{50} of approximately 75 µM, leading to a selective index of 56. Similarly, no toxicity was observed in PHH even at high concentration.

Unfortunately, little is known about the bioavailability of this compound in animal models or in humans. More generally, few/no pharmacokinetics studies *in-vivo* or in humans of phenanthrene derivatives were reported. Natural phenanthrenes are an uncommon class of aromatic metabolites which in a biosynthetic point of view can originate from stilbene precursors and more rarely from diterpenoid precursors. These compounds are biosynthesized by a limited number of botanical families. Orchidaceae and Juncaceae are the main botanical families known to produce this kind of natural products (El-Shamy et al., 2015; Kovács et al., 2008). 9,10-dihydrophenanthrenes and phenanthrenes showed a large panel of biological activities, including among others cytotoxicity, antimicrobial, spasmolytic and anti-inflammatory activities. However, this potential is not investigated sufficiently and not really exploited (Kovács et al., 2008). Concerning the antiviral activities of phenanthrene derivatives, a limited number of studies exist in the literature. Some phenanthrene derivatives isolated from *Tamus communis* (Dioscoreaceae) showed antiviral activity against two RNA enveloped virus: vesicular stomatitis virus (VSV) and human rhinovirus serotype 1B (HRV 1B) (Aquino et al., 1991). So far, no antiviral activity was highlighted for dehydrojuncusol. Only a moderate anti-inflammatory activity has been shown for this natural product (Behery et al., 2007).

J. maritimus is a perennial plant which thrives in particular on saline soils. In the framework of our study, this halophyte plant was collected in Tunisia, but *J. maritimus* is present worldwide in the coast line of many different areas, including several European countries such as France. Few traditional uses

are mentioned for this plant in Tunisia, with the exception of its use in making baskets and curtains. Its usage as an antiviral agent is a newopportunity for economic valorization of this plant. One of the disadvantages of our study is that the part of plant used is not renewable (rhizomes), so the chemical synthesis of dehydrojuncusol or a more active derivative could be an issue. It would be also interesting to search for dehydrojuncusol in other *Juncus* species and especially in parts of plant renewable, such as aerial parts. Interestingly, this phenanthrene derivative has been previously isolated from the aerial parts of *Juncus* species, such as *J. acutus* (Della Greca et al., 2002) and *J. effusus* (Wang et al., 2012), increasing its potential for its use in low income countries.

In conclusion, we showed that dehydrojuncusol, an active compound present in *J. maritimus* rhizomes, was able to inhibit HCV replication in a dose dependent manner. Although it probably targeted NS5A, it inhibited the replication of resistant viruses appearing in patients treated with anti-NS5A inhibitors and responsible for treatment failure. This molecule should be further investigated for being able to be used in patients of developing countries or in patients resistant to therapy for whom re-treatments are envisaged.

References

Abreu, A.C., McBain, A.J., Simões, M., 2012. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. Nat. Prod. Rep. 29, 1007–1021.

Aquino, R., Conti, C., De Simone, F., Orsi, N., Pizza, C., Stein, M.L., 1991. Antiviral activity of constituents of Tamus communis. J. Chemother. Florence Italy 3, 305–309.

Bartosch, B., Dubuisson, J., 2010. Recent Advances in Hepatitis C Virus Cell Entry. Viruses 2, 692–709.

Bartosch, B., Dubuisson, J., Cosset, F.-L., 2003. Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1–E2 Envelope Protein Complexes. J. Exp. Med. 197, 633–642.

Behery, F.A.A., Naeem, Z.E.M., Maatooq, G.T., Amer, M.M.A., Wen, Z.-H., Sheu, J.-H., Ahmed, A.F., 2007. Phenanthrenoids from Juncus acutus L., new natural lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase inhibitors. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 55, 1264–1266.

Calland, N., Dubuisson, J., Rouillé, Y., Séron, K., 2012. Hepatitis C virus and natural compounds: a new antiviral approach? Viruses 4, 2197–2217.

Calland, N., Sahuc, M.-E., Belouzard, S., Pène, V., Bonnafous, P., Mesalam, A.A., Deloison, G., Descamps, V., Sahpaz, S., Wychowski, C., Lambert, O., Brodin, P., Duverlie, G., Meuleman, P., Rosenberg, A.R., Dubuisson, J., Rouillé, Y., Séron, K., 2015. Polyphenols Inhibit Hepatitis C Virus Entry by a New Mechanism of Action. J. Virol.

Delgrange, D., Pillez, A., Castelain, S., Cocquerel, L., Rouillé, Y., Dubuisson, J., Wakita, T., Duverlie, G., Wychowski, C., 2007. Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. J. Gen. Virol. 88, 2495–2503.

Della Greca, M., Fiorentino, A., Isidori, M., Lavorgna, M., Monaco, P., Previtera, L., Zarrelli, A., 2002. Phenanthrenoids from the wetland Juncus acutus. Phytochemistry 60, 633–638.

Della Greca, M., Fiorentino, A., Mangoni, L., Molinaro, A., Monaco, P., Previtera, L., 1992. 9, 10-dihydrophenanthrene metabolites from Juncus effusus L. Tetrahedron Lett. 33, 5257–5260.

Dubuisson, J., Hsu, H.H., Cheung, R.C., Greenberg, H.B., Russell, D.G., Rice, C.M., 1994. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. J. Virol. 68, 6147–6160.

Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., Bienz, K., 2002. Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. J. Virol. 76, 5974–5984.

El-Shamy, A.I., Abdel-Razek, A.F., Nassar, M.I., 2015. Phytochemical review of Juncus L. genus (Fam. Juncaceae). Arab. J. Chem. 8, 614–623.

Fridell, R.A., Qiu, D., Valera, L., Wang, C., Rose, R.E., Gao, M., 2011. Distinct Functions of NS5A in Hepatitis C Virus RNA Replication Uncovered by Studies with the NS5A Inhibitor BMS-790052. J. Virol. 85, 7312–7320.

Gibbons, S., 2004. Anti-staphylococcal plant natural products. Nat. Prod. Rep. 21, 263–277.

Goueslain, L., Alsaleh, K., Horellou, P., Roingeard, P., Descamps, V., Duverlie, G., Ciczora, Y., Wychowski, C., Dubuisson, J., Rouillé, Y., 2010. Identification of GBF1 as a Cellular Factor Required for Hepatitis C Virus RNA Replication. J. Virol. 84, 773–787.

Graham, C.S., Swan, T., 2015. A path to eradication of hepatitis C in low- and middle-income countries. Antiviral Res. 119, 89–96.

Hajarizadeh, B., Grebely, J., Dore, G.J., 2013. Epidemiology and natural history of HCV infection. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 10, 553–562.

Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M., Wakita, T., 2003. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. Gastroenterology 125, 1808–1817.

Kovács, A., Vasas, A., Hohmann, J., 2008. Natural phenanthrenes and their biological activity. Phytochemistry 69, 1084–1110.

Krishnan, P., Beyer, J., Mistry, N., Koev, G., Reisch, T., DeGoey, D., Kati, W., Campbell, A., Williams, L., Xie, W., Setze, C., Molla, A., Collins, C., Pilot-Matias, T., 2015. In Vitro and In Vivo Antiviral Activity and Resistance Profile of Ombitasvir, an Inhibitor of Hepatitis C Virus NS5A. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 979–987.

Ksouri, R., 2012. Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. Crit Rev Biotechnol 32, 289–326.

Lavanchy, D., 2011. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. Clin. Microbiol. Infect. 17, 107–115.

Lecot, S., Belouzard, S., Dubuisson, J., Rouillé, Y., 2005. Bovine Viral Diarrhea Virus Entry Is Dependent on Clathrin-Mediated Endocytosis. J. Virol. 79, 10826–10829.

Levrero, M., 2006. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. Oncogene 25, 3834–3847.

Liang, T.J., Ghany, M.G., 2013. Current and Future Therapies for Hepatitis C Virus Infection. N. Engl. J. Med. 368, 1907–1917.

Lindenbach, B.D., Thiel, H.-J., Rice, C.M., 2007. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Fields Virology 5th Edition. David M. Knipe, Peter M. Howley, pp. 1101–1152.

Messina, J.P., Humphreys, I., Flaxman, A., Brown, A., Cooke, G.S., Pybus, O.G., Barnes, E., 2015. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. Hepatology 61, 77–87.

Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., Shimotohno, K., 2007. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. Nat. Cell Biol. 9, 1089–1097.

Moradpour, D., Evans, M.J., Gosert, R., Yuan, Z., Blum, H.E., Goff, S.P., Lindenbach, B.D., Rice, C.M., 2004. Insertion of Green Fluorescent Protein into Nonstructural Protein 5A Allows Direct Visualization of Functional Hepatitis C Virus Replication Complexes. J. Virol. 78, 7400–7409.

Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., Sato, J., 1982. Growth of Human Hepatoma Cell Lines with Differentiated Functions in Chemically Defined Medium. Cancer Res. 42, 3858–3863.

Newman, D.J., Cragg, G.M., 2012. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. J. Nat. Prod. 75, 311–335.

Pawlotsky, J., 2014. New Hepatitis C Therapies: The Toolbox, Strategies, and Challenges. Gastroenterology 146, 1176–1192.

Pawlotsky, J.-M., 2016. Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antiviral Drugs in Interferon-Free Regimens. Gastroenterology 151, 70–86.

Pène, V., Hernandez, C., Vauloup-Fellous, C., Garaud-Aunis, J., Rosenberg, A.R., 2009. Sequential processing of hepatitis C virus core protein by host cell signal peptidase and signal peptide peptidase: a reassessment. J. Viral Hepat. 16, 705–715.

Podevin, P., Carpentier, A., Pène, V., Aoudjehane, L., Carrière, M., Zaïdi, S., Hernandez, C., Calle, V., Méritet, J., Scatton, O., Dreux, M., Cosset, F., Wakita, T., Bartenschlager, R., Demignot, S., Conti, F., Rosenberg, A.R., Calmus, Y., 2010. Production of Infectious Hepatitis C Virus in Primary Cultures of Human Adult Hepatocytes. Gastroenterology 139, 1355–1364.e6.

Polyak, S.J., Oberlies, N.H., Pécheur, E.-I., Dahari, H., Ferenci, P., Pawlotsky1, J.-M., 2013. Silymarin for hepatitis C virus infection. Antivir. Ther. 18, 141–147.

Rouillé, Y., Helle, F., Delgrange, D., Roingeard, P., Voisset, C., Blanchard, E., Belouzard, S., McKeating, J., Patel, A.H., Maertens, G., Wakita, T., Wychowski, C., Dubuisson, J., 2006. Subcellular Localization of Hepatitis C Virus Structural Proteins in a Cell Culture System That Efficiently Replicates the Virus. J. Virol. 80, 2832–2841.

Sarkar, H., Zerezghi, M., Bhattacharyya, J., 1988. Dehydrojuncusol, a constituent of the roots of Juncus roemerianus. Phytochemistry 27, 3006–3008.

Sarrazin, C., 2016. The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice. J. Hepatol. 64, 486–504.

Tarr, A.W., Khera, T., Hueging, K., Sheldon, J., Steinmann, E., Pietschmann, T., Brown, R.J.P., 2015. Genetic Diversity Underlying the Envelope Glycoproteins of Hepatitis C Virus: Structural and Functional Consequences and the Implications for Vaccine Design. Viruses 7, 3995–4046.

Wang, Y.-G., Wang, Y.-L., Zhai, H.-F., Liao, Y.-J., Zhang, B., Huang, J.-M., 2012. Phenanthrenes from Juncus effusus with anxiolytic and sedative activities. Nat. Prod. Res. 26, 1234–1239.

Wright, C.W., 2010. Recent developments in research on terrestrial plants used for the treatment of malaria. Nat. Prod. Rep. 27, 961–968.

Legend to figures

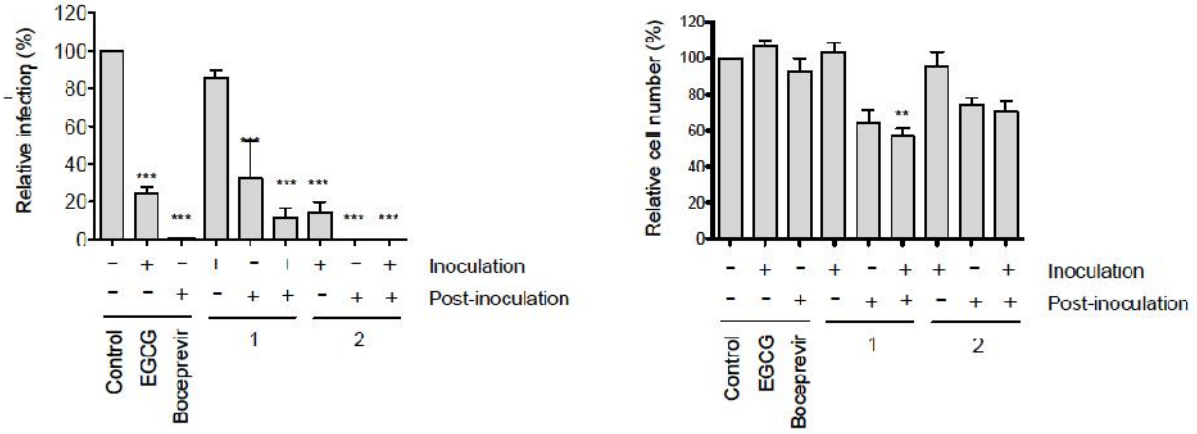


Figure 1. Screening of compounds isolated from *J. maritimus* rhizome extract for anti-HCV activity. Huh-7 cells were inoculated with HCVcc for 2h either in the presence (+) or not (-) of isolated compounds at 10 µg/mL, or 50 µM EGCG, or 1 µM boceprevir. DMSO was used as a control. Cells were further incubated in medium containing (+) or not (-) the compounds for 28h and cells were fixed. **(A)** Infectivity was measured by the use of immunofluorescence labeling of HCV E1 envelope protein, and by calculating the number of infected cells. Data are expressed as a percentage of values measured with DMSO. Data are means of values obtained in 3 independent experiments performed in triplicate. Error bars represent standard error of the means (SEM). **(B)** Nuclei were stained with DAPI to quantify the number of cells.

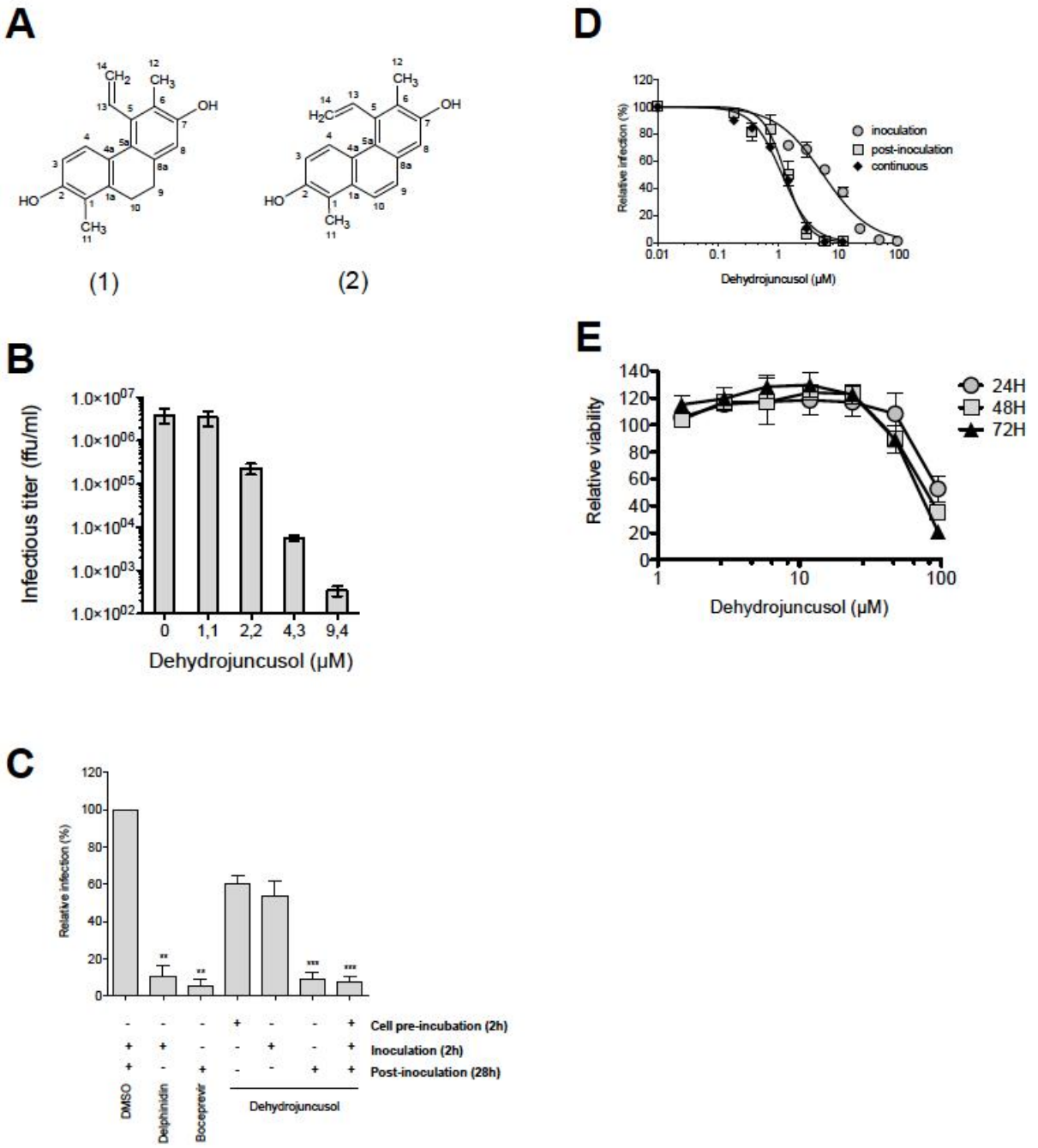


Figure 2. Dehydrojuncusol inhibits HCV infection in a dose dependent manner. (A) Chemical structure of juncusol (1) and dehydrojuncusol (2). **(B)** Huh-7 cells were infected with HCVcc in the presence of dehydrojuncusol at different concentrations. 48h post-infection, supernatants were collected and infectious titers measured serial dilutions of the supernatants and reinfection of naive Huh-7 cells. Ffu/ml were quantified after 48h **(C)** Time-addition assay. Dehydrojuncusol at 3.8 µM, delphinidin at 50 µM or boceprevir at 1 µM were added at different time points as indicated (+). Cells were either pre-incubated with the compounds for 2h, or compounds added during HCVcc inoculation (2h) or post inoculation (28h). Infectivity was measured by the use of immunofluorescence labeling of HCV E1 envelope protein, and by calculating the number of infected cells. **(D)** Huh-7 cells were

inoculated with HCVcc in the presence of increasing concentration of dehydrojuncusol either for 2h inoculation, 28h post-inoculation or continuously. Infectivity was measured by the use of immunofluorescence labeling of HCV E1 envelope protein, and by calculating the number of infected cells. **(E)** Huh-7 cells were cultured in the presence of given concentrations of dehydrojuncusol. The viability was monitored using an MTS-based viability assay after 24h, 48h and 72h. Data are expressed as a ratio to control i.e. the condition without extracts. Data are means of values obtained in 3 independent experiments performed in triplicate. Error bars represent SEM.

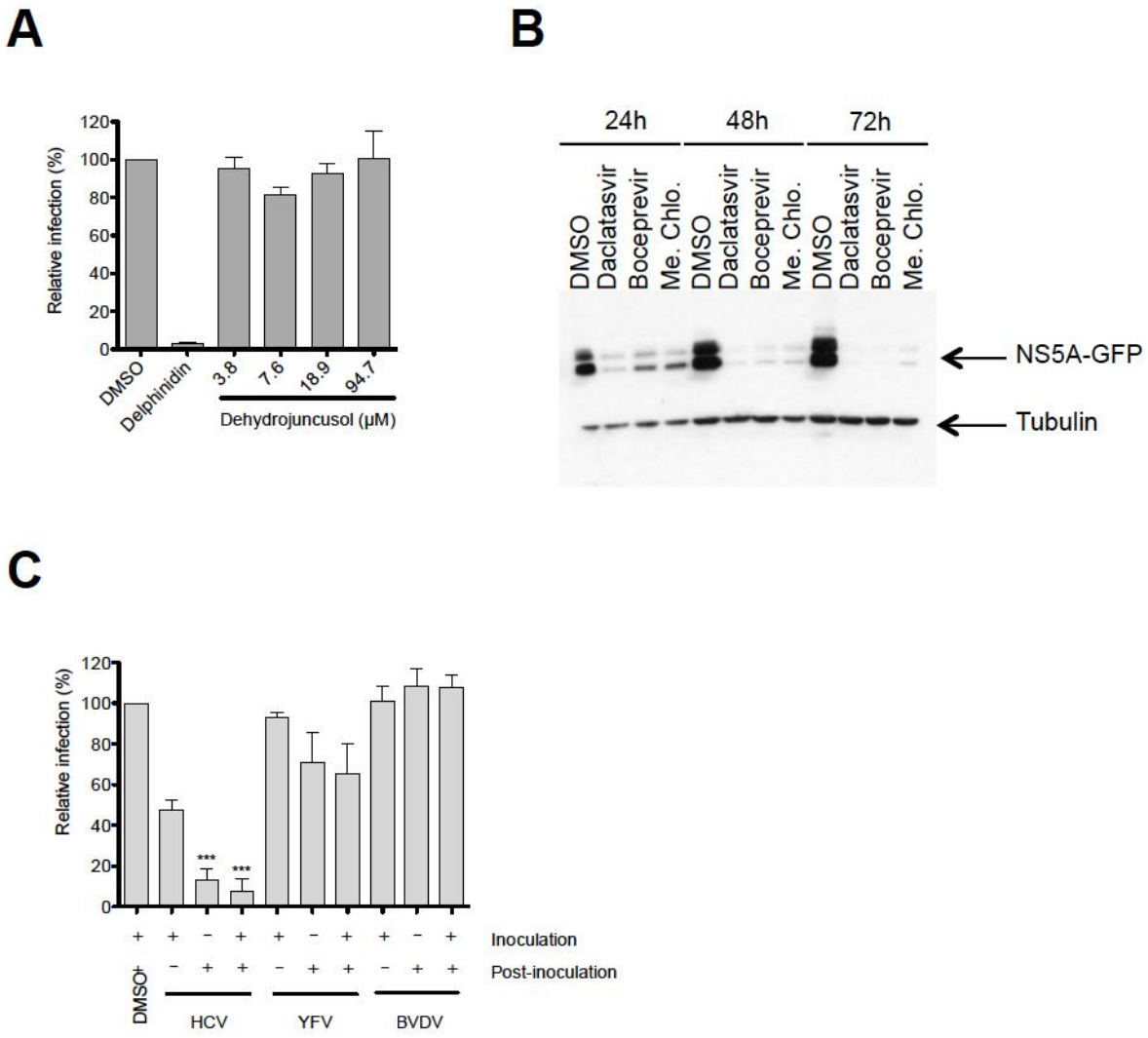


Figure 3. Dehydrojuncusol inhibits HCV replication. (A) HCVpp were used to inoculate Huh-7 cells in the presence of dehydrojuncusol at indicated concentrations. Delphinidin at 50 µM was used as a control. 48h post-infection, cells were lysed and luciferase activity quantified. Data are expressed as a ratio to the DMSO control (100%). **(B)** Established replicon SGR-JFH1-NS5AGFP Huh-7 cells were incubated for the indicated time with either 0.5 nM daclatasvir, 1 µM boceprevir, or 10 µg/mL of methylene chloride partition of *J. maritimus*. DMSO was used as a control. Cells were lysed and

lysates subjected to SDS-PAGE followed by Western blot revelation of GFP and tubulin. **(C)** Huh-7 cells were inoculated with HCVcc, or YFV and MDBK cells with BVDV in the presence (+) or absence (-) of 10 µg/mL of methylene chloride partition of *J. maritimus*. Inoculum was removed and replaced with medium with (+) or without (-) 10 µg/mL of methylene chloride partition of *J. maritimus*. Cells were fixed and infection detected by immunofluorescence labeling of viral proteins. Data are means of values obtained in 3 independent experiments performed in triplicate. Error bars represent SEM.

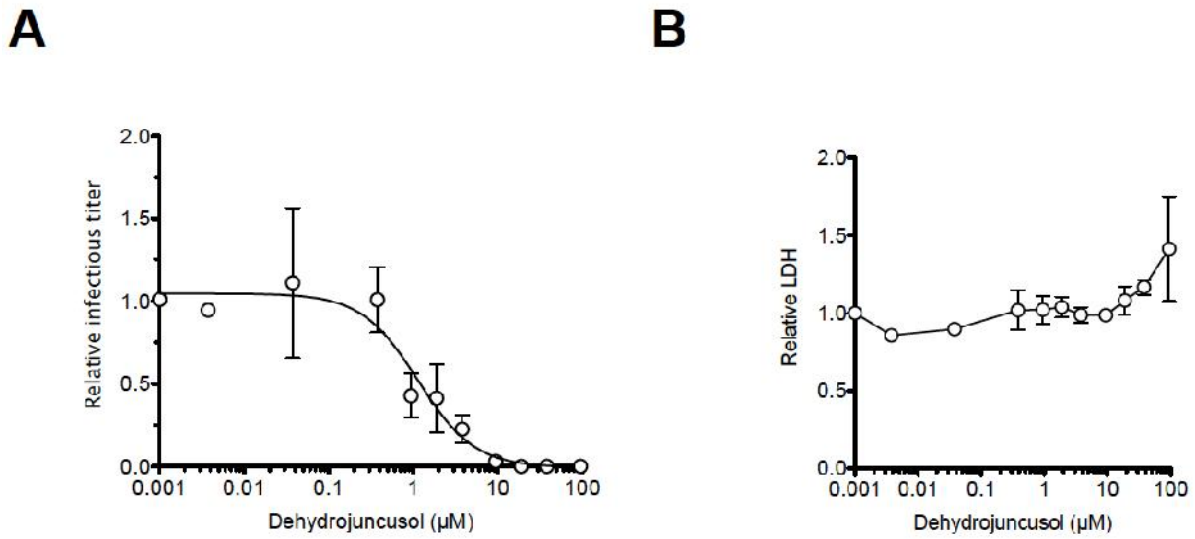


Figure 4. Dehydrojuncusol inhibits HCV infection in PHH. PHH were inoculated with HCVcc in the presence of the indicated concentrations of dehydrojuncusol. (A) Infectious titers in culture supernatants were expressed as ratio to carrier control. (B) Cytotoxicity was expressed as a ratio to carrier control. Data are means (± SEM) of 3 independent experiments performed in triplicate.

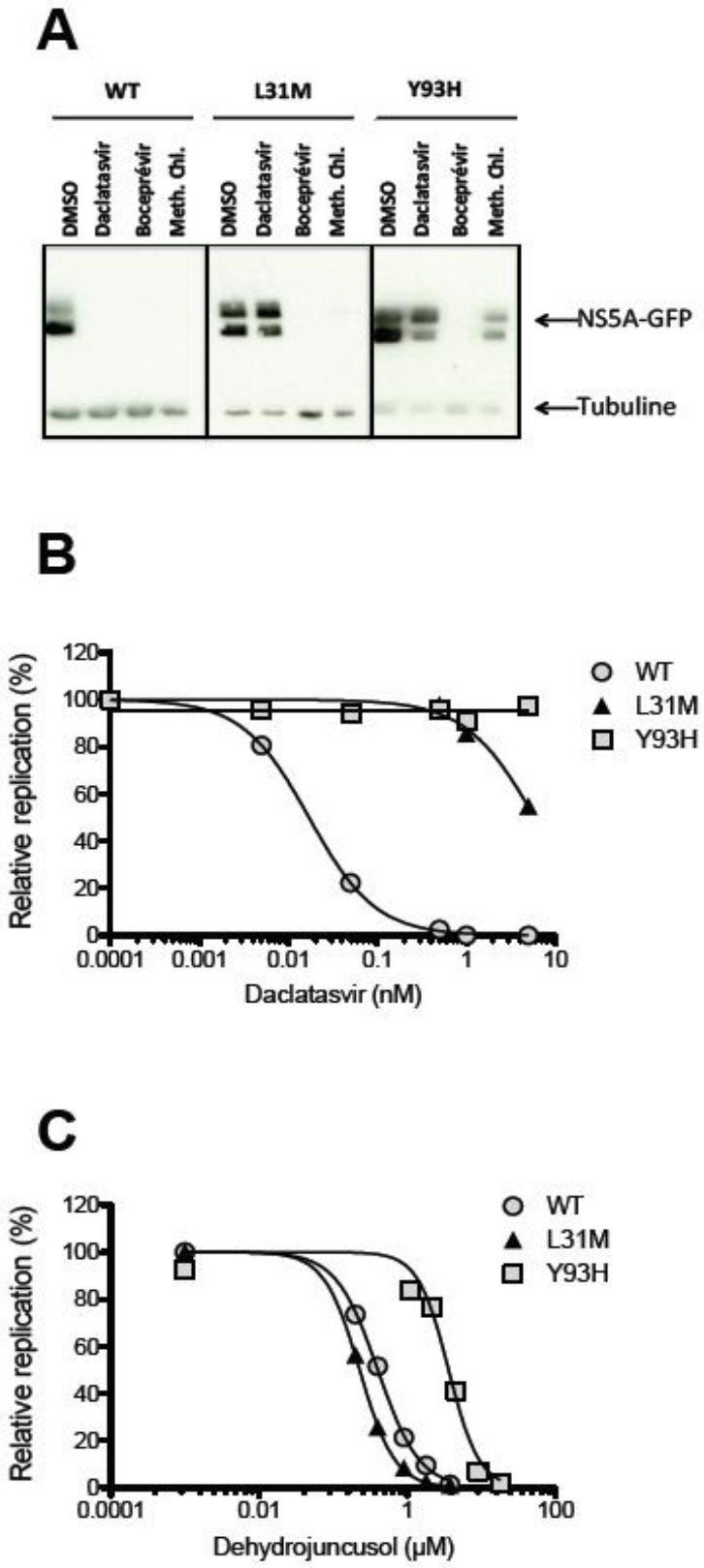


Figure 5. Dehydrojuncusol inhibits daclatasvir NS5A resistant mutants. (A) Huh-7 cells stably expressing subgenomic replicon SGR-JFH1-NS5A wild-type or harboring L31M or Y93H mutation in NS5A conferring resistance to daclatasvir were incubated for 72h either with 0.5 nM daclatasvir, 1 µM boceprevir, or 10 µg/mL of methylene chloride partition of *J. maritimus*. DMSO was used as a control.

Cells were lysed and lysates subjected to SDS-PAGE followed by Western blot revelation of GFP and tubulin. **(B)(C)** Huh-7 cells stably expressing subgenomic replicon SGR-JFH1-NS5A wild-type or harboring L31M or Y93H mutation in NS5A conferring resistance to daclatasvir were incubated for 72h with increasing concentrations of daclatasvir **(B)** or dehydrojuncusol **(C)**. Cells were fixed and GFP positive cells, representing replication, quantified. Replication of subgenomic replicon was expressed as a ratio to carrier control DMSO. Data are means of values obtained in 3 independent experiments performed in triplicate. Error bars represent SEM.

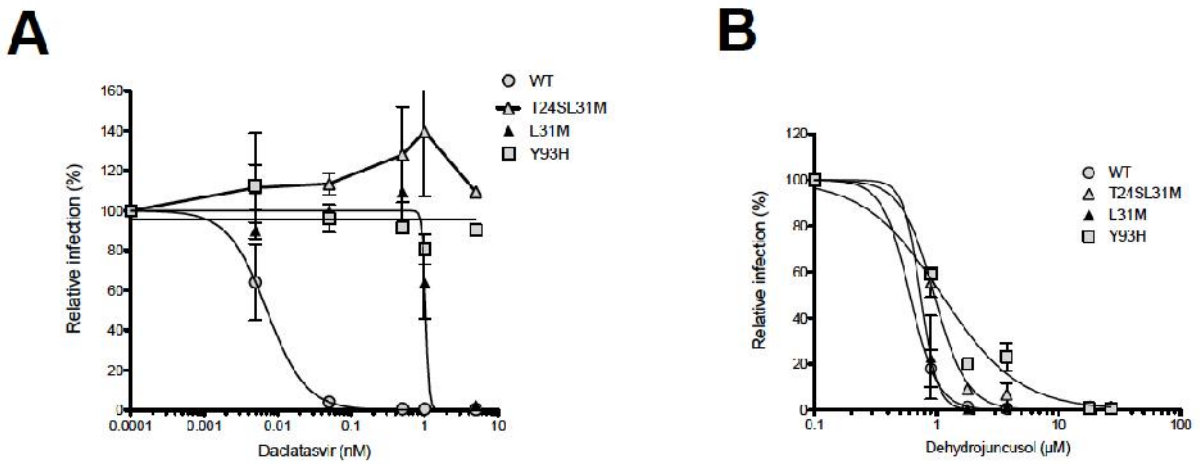


Figure 6. Double mutations T24S-L31M and single mutation Y93H confer partial resistance to dehydrojuncusol. Huh-7 cells were inoculated with wild-type (WT) HCVcc or harboring different mutations, T24S-L31M, L31M or Y93H in the presence of **(A)** daclatasvir or **(B)** dehydrojuncusol at different concentrations for 2h. Inoculum was removed and replaced with medium containing the different drugs at the same concentration for 28h. Cells were fixed and infection detected by immunofluorescence labeling of E1 envelope protein. Data are means of values obtained in 3 independent experiments performed in triplicate. Error bars represent SEM.

III.2. Purification de composés minoritaires et analyse de leurs activités sur le virus de l'hépatite C

Dans l'étude précédente, nous avons réussi à déterminer le composé responsable de l'activité anti-HCV du sous-extrait dichlorométhane des rhizomes de *J. maritimus* (JMR-MC), le dehydrojuncusol, mais aussi de caractériser son activité. Nous avons également testé un autre dérivé phénanthrénique, le juncusol, qui était moins actif. En examinant le chromatogramme de JMR-MC à 256 nm, on distingue, en plus des pics du juncusol et du dehydrojuncusol, un 3ème pic majoritaire (III), qui englobe plusieurs composés très apolaires qui ont des polarités très proches. En raison de l'activité remarquable du dehydrojuncusol et de la richesse de JMR-MC en métabolites secondaires, nous avons cherché à purifier et à tester ces molécules plus apolaires (pic III) (figure 32).

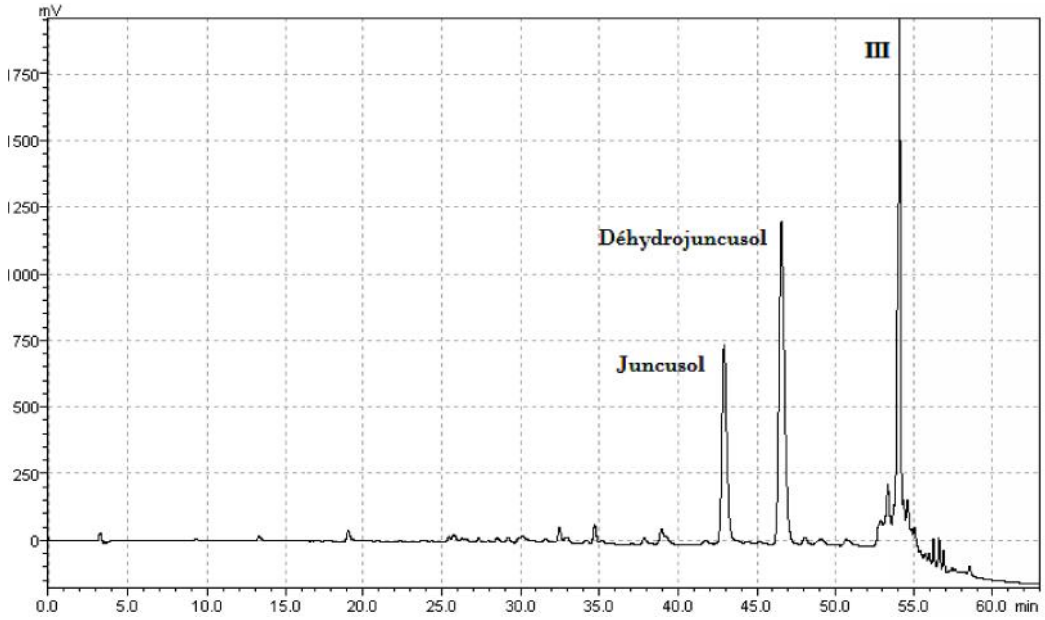


Figure 32. Chromatogramme de JMR-MC (256 nm)
La phase mobile : solvant A (eau à 0,01% d'acide formique) ; solvant B (acétonitrile); Gradient utilisé : 10-38% B (0-30 min), 38% B (30-40 min), 38-45% B (40-45 min), 45-51% B (45-47 min), 51-95% B (47-48 min), 95-98,8% B (48-62 min), 98,8-100% B (62-63 min).

III.2.1. Processus de purification des composés

Dans le but de purifier les composés du pic (III), différentes techniques chromatographiques ont été combinées, la chromatographie de partage centrifuge (CPC) et la CLHP semi-préparative et préparative.

Pour les analyses par CPC, des systèmes de solvants biphasiques Arizona ont été utilisés. Le système Arizona X utilisé précédemment pour isoler le juncusol et le dehydrojuncusol, a été à nouveau utilisé pour purifier certains composés du pic III, ainsi que des composés minoritaires ayant des polarités proches de celle du juncusol. Un deuxième système de solvants a été déterminé, Arizona R, nécessaire pour la purification d'autres composés du pic III.

Pour toutes les analyses, les 2 phases (stationnaire et mobile) du système de solvants biphasique (Arizona X ou Arizona R), sont séparées et la colonne de CPC est remplie à un débit de 30 mL/min (500 rpm) avec 400 mL de la phase stationnaire. L'équilibration avec la phase mobile est faite à 1600 rpm avec un débit de 8 mL/min. L'échantillon est dissous dans un mélange des phases inférieure et supérieure (50:50) puis injecté à travers la boucle d'injection dans le système. Des fractions de 8 mL sont collectées toutes les minutes puis l'ensemble des fractions sont regroupées après analyse par CCM.

L'analyse par CPC utilisant le système Arizona R est réalisée en mode ascendant pendant 40 minutes, puis en mode descendant pour encore 20 minutes ; au terme de laquelle 12 fractions ont été obtenues (MCR1-MCR12). Pour la purification par le système Arizona X, l'analyse par CPC est réalisée seulement en mode ascendant (30 minutes) où 15 fractions (MCX1–MCX15) ont été obtenues. Des purifications par CLHP semi-préparative et préparative ont ensuite été réalisées sur un certain nombre des fractions obtenues, en utilisant différents gradients. Pour toutes les analyses, la phase mobile utilisée est constituée de deux solvants (solvant A : eau à 0,01% d'acide formique et solvant B : acétonitrile). Au final, 11 composés ont été isolés en plus du juncusol et du dehydrojuncusol. La figure 33 résume les stratégies mises en place pour purifier ces composés.

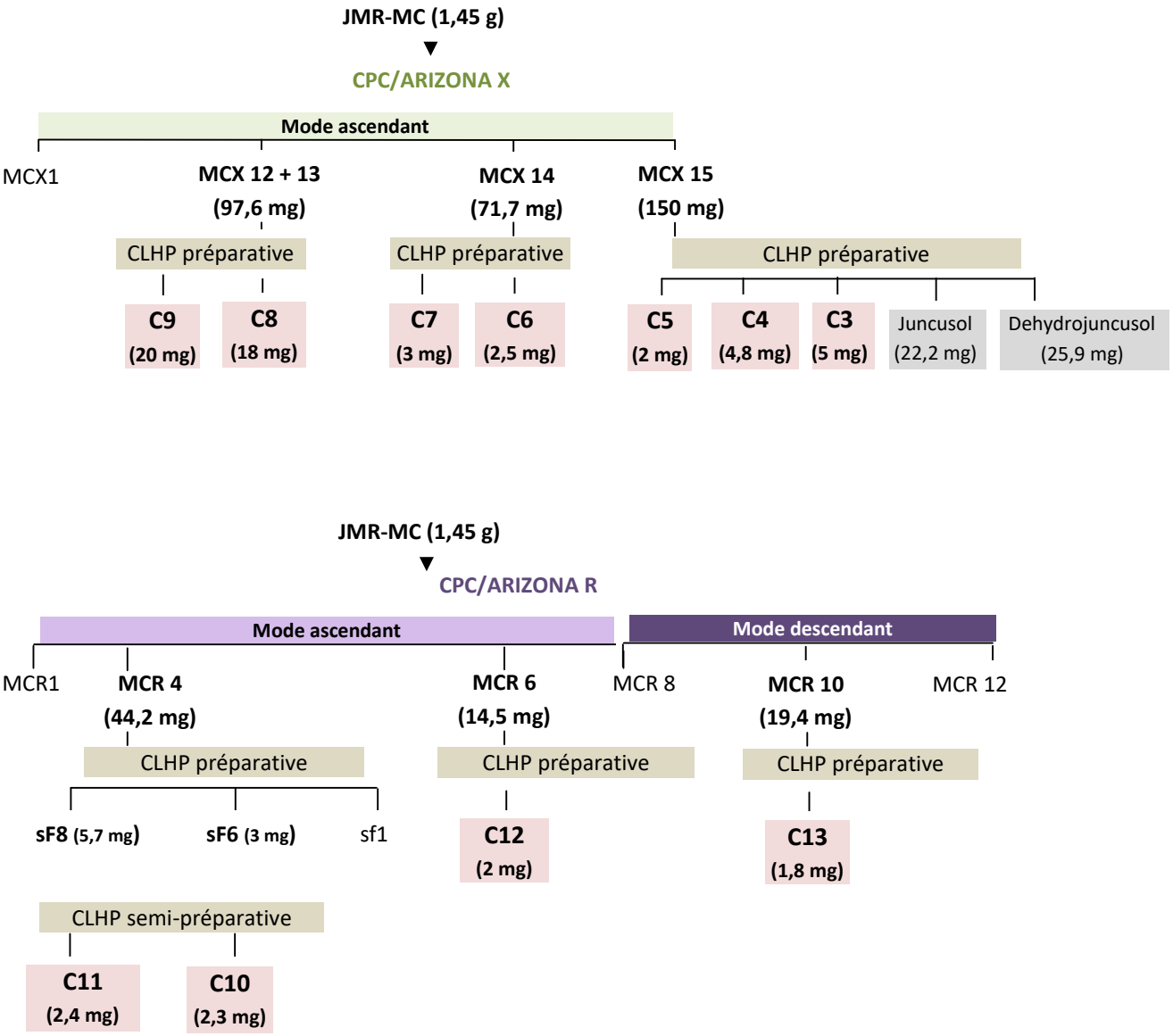


Figure 33 : Stratégie de purification des composés à partir de JMR-MC

A partir de la CPC utilisant le système Arizona X, trois composés minoritaires, C3 (5 mg), C4 (4,8 mg) et C5 (2 mg), ayant des polarités proches de celle du juncusol, ont été isolés par CLHP préparative à partir de la fraction MCX15 (150 mg). Le gradient utilisé (G1) est : 10-38% B (0-2 min), 38-45% B (2-8 min), 45-51% B (8-25 min), 51-96% B (25-29 min), 96-100% B (29-30 min).

D'autre part, à partir de cette même CPC, nous avons réussi à purifier 4 composés (C6 à C9) parmi les composés très apolaires présents sous le pic III. C6 (2,5 mg) et C7 (3 mg) ont été isolés par CLHP préparative depuis les fractions MCX14 (71,7 mg), alors que les composés C8 (18 mg) et C9 (20 mg) ont été isolés à partir des fractions MCX12 et MCX13 rassemblées

(97,6 mg). Le gradient utilisé (G2) est : 10-40% B (0-2 min), 40-96% B (2-8 min), 96-96,1% B (8-29 min), 96,1-100% B (29-30 min).

Quatre autres composés très apolaires présents sous le pic III (C10 à C13) ont été purifiés *via* la deuxième analyse par CPC (Arizona R). L'analyse en mode ascendant a donné 7 fractions, dont MCR4 (44,2 mg) et MCRC10 (14,5 mg). C12 (2 mg) a été isolé par CLHP préparative depuis MCR10, alors que des séries d'analyses par CLHP semi-préparative et préparative à partir MCR4 ont été nécessaires pour obtenir les composés C10 (2,3 mg) et C11 (2,4 mg). Le composé C13 (1,8 mg) a été isolé à partir de la fraction MCR10 (19,4 mg) obtenue suite au passage au mode descendant au cours de l'analyse par CPC. Le gradient (G2) a été utilisé pour toutes les purifications par CLHP semi-préparative et préparative.

III.2.2. Identification de certains des composés isolés

Les composés purifiés ont ensuite été analysés pas spectroscopie de masse (HR-MS) et par spectroscopie RMN. L'analyse des données obtenues a permis de déterminer que certains sont des dérivés phénanthréniques (C3, C4, C6, C8 et C12), alors que d'autres sont des triterpènes (C9, C10 et C11). Les structures de 3 phénanthrènes ont été complètement déterminées (C3, C4 et C8). L'élucidation complète des structures des autres composés est en cours.

L'identification des composés C3, C4 et C8 a été réalisée par l'analyse des données de la masse et de la RMN (Annexe 2) et la comparaison des resultants obtenus avec les données de la littérature (Shima *et al.,* 1991 ; Dellagreca *et al.,* 1992). Il s'agit de composés déjà identifiés chez différentes espèces de *Juncus*. Les composés C4 et C3 sont respectivement l'effusol et son dérivé le dehydroeffusol. Le dehydroeffusol a déjà été identifié dans les parties aériennes de *J. effusus* (Shima *et al.*, 1991). On retrouve aussi l'effusol dans cette plante, ainsi que dans d'autres espèces de *Juncus*, notamment dans les parties aériennes de *J. acutus* et dans les rhizomes de *J. subulatus* (Shima *et al.*, 1991 ; Dellagreca *et al.*, 1993 ; Dellagreca *et al.*, 2004 ; Abdel-Mogib, 2001 ; Abdel-Razik *et al.*, 2009). Le composé C8 est le juncunol. Sa présence a été signalée dans les parties aériennes de *J. acutus* et de *J. effusus*, ainsi que dans les rhizomes et les parties aériennes de *J. roemerianus* (Sarkar *et al.*, 1988 ; Dellagreca *et al.*, 2002 ; 2004 ; Abdel-Mogib, 2001 ; Abdel-Razik *et al.*, 2009).

Les structures chimiques de ces 3 dérivés phénanthréniques sont présentées dans la figure 34.

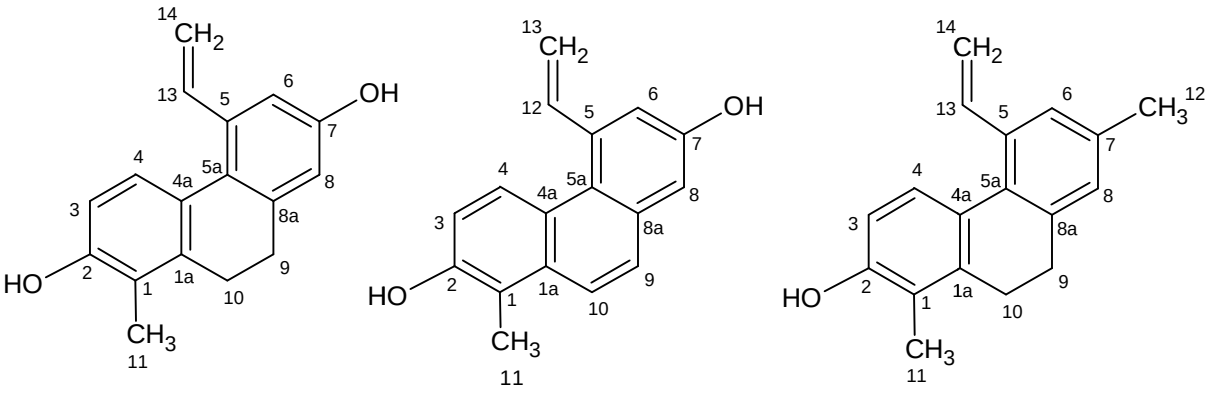


Figure 34. Structures chimiques des composés identifiées (JMR-MC)

Le juncunol, ainsi que deux autres composés dont la détermination structurale est presque achevée (C12 et C10) ont été testé sur le virus de l'hépatite C. Des analyses sont en cours pour déterminer des effets de l'effusol et du dehydroeffusol sur le VHC. L'ensemble de ces composés testés sont localisés dans le chromatogramme de JMR-MC (figure 35).

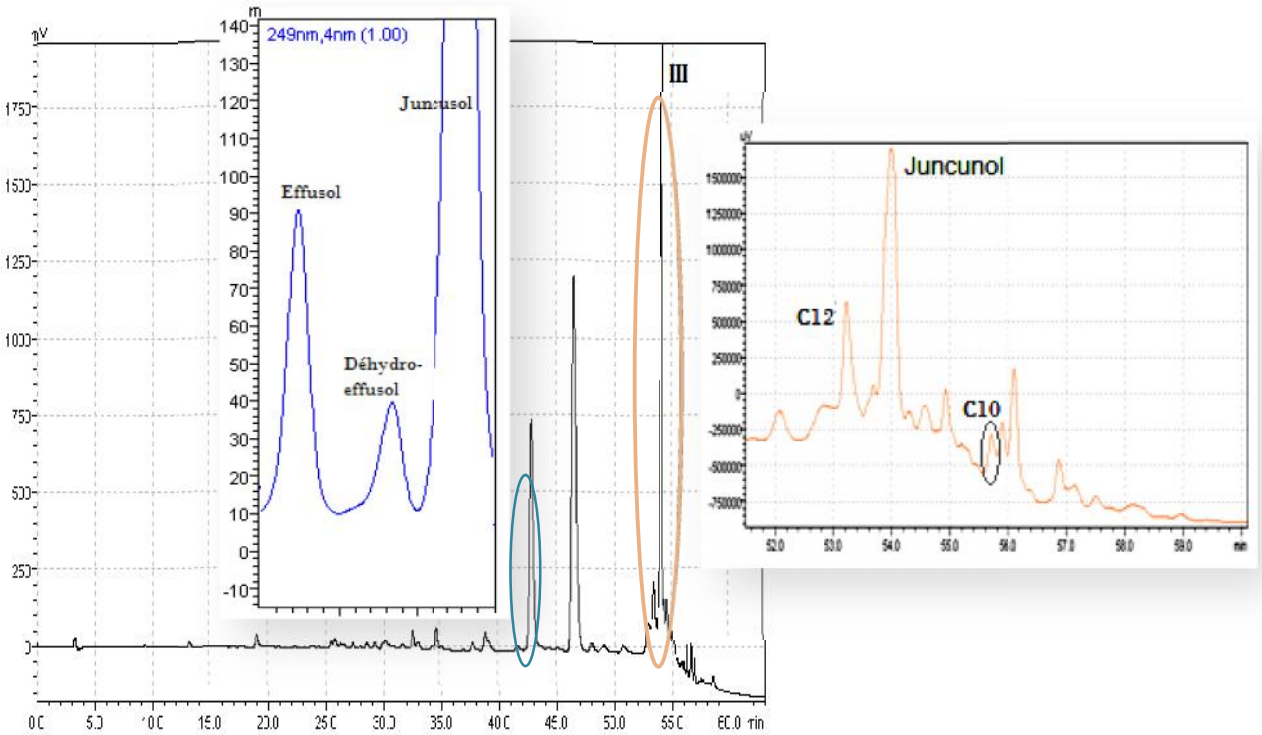


Figure 35 : Localisation des composés purifiés sur le chromatogramme de JMR-MC (254 nm)

La phase mobile : solvant A (eau à 0,01% d'acide formique) ; solvant B (acétonitrile) ; Gradient utilisé : 10-38% B (0-30 min), 38% B (30-40 min), 38-45% B (40-45 min), 45-51% B (45-47 min), 51-95% B (47-48 min), 95-98,8% B (48-62 min), 98,8-100% B (62-63 min).

III.2.3. Analyse de l'activité de certains des composés purifiés sur le virus de l'hépatite C (VHC)

L'effet des composés (juncunol, C10 et C12) sur l'infection virale a été analysé de la même manière que pour le juncusol et le déhydrojuncusol (sous-chapitre **III.1**), et ceci en ajoutant les molécules aux cellules Huh-7 infectées par le VHC, à différents temps correspondants aux principales étapes du cycle viral du VHC : pendant l'entrée du virus (uniquement lors de l'inoculation : co-addition), après inoculation (réplication), ou encore de façon continue (post-inoculation). Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 36.

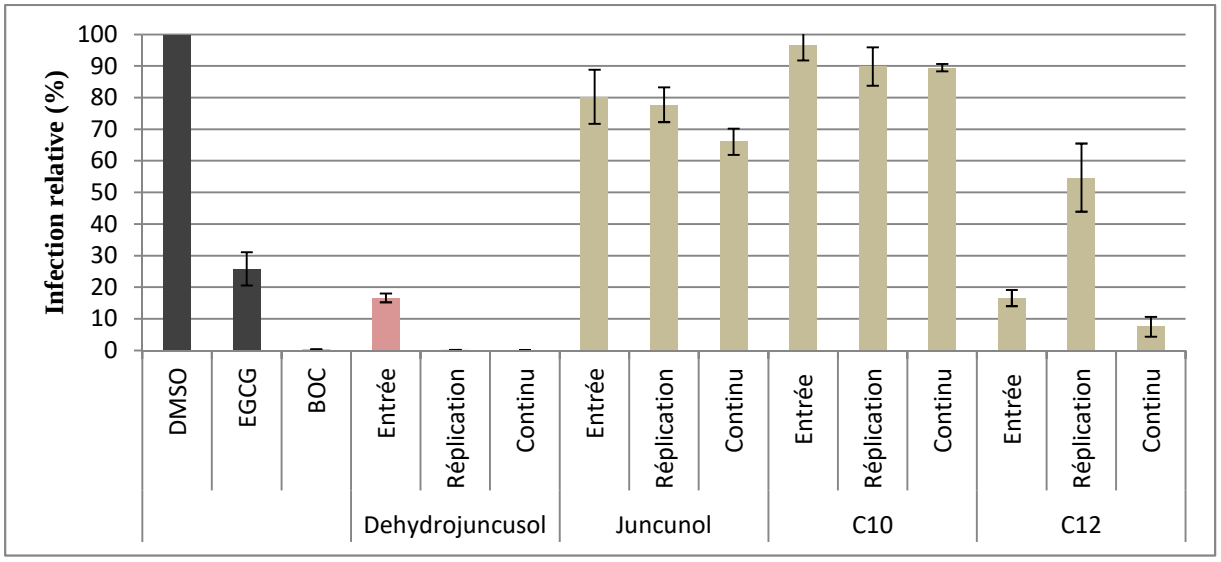


Figure 36. Effets des composés (juncunol, C10 et C12) sur l'inhibition des 3 étapes principales du cycle du VHC, en comparaison avec le dehydrojuncusol

Les résultats montrent que le dehydrojuncusol détient toujours la place de l'inhibiteur le plus efficace sur la réplication du VHC. En revanche, C12, a montré une activité fort intéressante sur l'entrée du VHC, qui est supérieure à celle de l''épigallocatéchine gallate (EGCG), un inhibiteur de l'entrée du VHC (respectivement 16,60% et 25,82%).

Le juncunol, ainsi que le triterpène C10 n'étaient pas actifs sur les trois étapes du cycle viral du VHC (infection relative >50 %).

Des essais ont été initiés pour évaluer les activités de l'effusol et du dehydroeffusol sur le VHC. Les résultats préliminaires sur les activités de ces 2 composés pendent l'étape de post-innoculation (continu) ont montré des résultats intéressants, et en particulier pour l'effusol.

Le sous-extrait dichlorométhane des rhizomes de *J. maritimus* semble être un réservoir de molécules actives sur l'inhibition du VHC, et qui mérite donc d'être analyser d'avantage, notamment d'achever l'identification des composés dont la structure n'est pas entièrement déterminée, en particulier pour C12, et de caractériser leurs activités ou potentiels effets sur l'inhibition du VHC.

III.3. Fractionnement bioguidé du sous-extrait responsable de l'activité antibactérienne de *J. maritimus* et détermination des composés les plus actifs

L'extrait des rhizomes de *J. maritimus* (JMR-CE) s'est aussi distingué par son potentiel antibactérien sélectif envers certaines souches bactériennes à Gram-positif (particulièrement *Streptococcus dysgalactiae* T46C14 : CMI = 78 µg/mL). Les sous-extraits obtenus par extraction liquide-liquide de JMR-CE (JMR-MC, JMR-EA et JMR-H_2O) ont également été analysés sur la collection de 36 souches de bactéries à Gram + et -, montrant que JMR-MC est principalement responsable de cette activité (particulièrement actif contre *Streptococcus dysgalactiae* T46C14, CMI = 39 µg/mL) (cf chapitre **I**).

III.3.1. Analyse de l'activité antibactérienne sur une nouvelle collection de bactéries à Gram positif

Dans cette étude menée au sein du Laboratoire de bactériologie (INSERM U995, collaboration avec le Dr C. Neut), j'ai réalisé un deuxième criblage de l'activité antibactérienne des 3 sous-extraits JMR-MC, JMR-EA et JMR-H_2O, ainsi que de l'extrait brut (JMR-CE), en utilisant une nouvelle collection de bactéries composée uniquement de bactéries à Gram + (majoritairement des souches de staphylocoques et de streptocoques) et comprenant les souches sur lesquelles JMR-MC était initialement actif (Annexe 3). L'extrait brut et les sous-extraits ont été testés aux concentrations suivantes : 1250 ; 625 ; 312 ; 156 ; 78 et 39 µg/mL. Le tableau 6 précise les concentrations minimales inhibitrices (CMI) mesurées pour les extraits actifs et ne présente que les souches qui ont montré une certaine sensibilité.

Tableau 6 : CMI (µg/mL) des sous extraits de JMR-CE, qui sont actifs sur les souches bactériennes (Gram +)

	JMR-CE	**JMR-MC**	**JMR-EA**
Corynebacterium T27.17	N.A	312	625
Staphylococcus aureus CIP224	N.A	N.A	625
Staphylococcus aureus 8147	N.A	N.A	312
Staphylococcus aureus 8146	N.A	N.A	625
Staphylococcus aureus T28.1	N.A	N.A	625
Staphylococcus aureus T47.A12	N.A	N.A	625
Staphylococcus epidermidis T30.1	625	625	625
Streptococcus agalactiae T25-7	625	N.A	N.A
Streptococcus agalactiae T53C2	625	312	625
Streptococcus agalactiae T38-2	625	312	625
Streptococcus agalactiae T40A2	625	312	625
Streptococcus agalactiae 13225	625	312	625
Streptococcus agalactiae 13226	625	312	625
Streptococcus dysgalactiae T46C14	156	39	312
Streptococcus pyogenes 13240	156	39	312

JMR-CE : *Juncus maritimus* rhizome-extrait brut ; JMR-MC : *J. maritimus*-sous-extrait dichlorométhane ; JMR-EA : *J. maritimus*-sous-extrait acetate d'éthyle. (JMR-H_2O : sous-extrait aqueux, non actif car a montré des CMI > 1000 µg/mL pour toutes les souches testées). CMI (µg/mL) de l'extrait brut et des sous-extraits : CMI < 100 µg/mL : activité élevée ; 100 µg/mL < CMI < 500 µg/mL : activité modérée ; 500 µg/mL < CMI < 1000 µg/mL : activité faible ; MIC ≥ 1000 µg/mL : n'est plus considéré actif (NA).

JMR-CE montre toujours une activité élevée contre *Streptococcus dysgalactiae* T46C14, mais aussi sur une nouvelle souche, *Streptococcus pyogenes* 13240. JMR-MC et JMR-EA ont montré des activités contre différentes souches de staphylocoques et de streptocoques alors que le sous-extrait aqueux n'a montré aucune activité sur l'ensemble des bactéries testées (CMI > 1000 µg/mL). JMR-EA a montré un spectre d'activité plus large que celui de JMR-MC mais une activité globalement plus faible (CMI = 625 µg/mL pour la majorité des souches testées). Les activités les plus élevées ont été enregistrées pour JMR-MC. Ce sous-extrait se trouve le plus actif sur *S. dysgalactiae* T46C14 et *S. pyogenes* 13240 (CMI égales à 39 µg/mL), souches sur lesquelles l'extrait brut a montré les activités les plus élevées.

III.3.2. Détermination de la CMB du sous-extrait le plus actif sur les souches *Streptococcus dysgalactiae* T46C14 et *Streptococcus pyogenes* 13240

Nous avons voulu déterminer la concentration minimale bactéricide (CMB) de JMR-MC sur *S. dysgalactiae* T46C14 et *S. pyogenes* 13240 par la méthode de dilution en milieu liquide, en utilisant des plaques 96 puits.

Un échantillon de JMR-MC a été préparé à 10 concentrations (625-1 µg/mL) dans des tubes eppendorfs. Les puits utilisés sont d'abord chargés par 100 µL de milieu liquide, puis, 10 µL de chaque dilution de JMR-MC sont déposés dans les puits (1-10). Enfin, la suspension bactérienne déjà incubée pendant 24h dans du milieu liquide est directement chargée dans tous les puits utilisés à raison de 10 µL (figure 37). Après un temps d'incubation de 24h à 37 °C, la détermination de la CMI se fait visuellement. Pour déterminer la CMB, 100 µL sont prélevés du puits contenant le mélange à la CMI, ainsi que de deux autres puits contenant le mélange à des concentrations inférieures. Ces prélèvements sont ensemencés sur des milieux de culture solide. La concentration à laquelle il n'y a aucune croissance bactérienne correspond donc à la CMB.

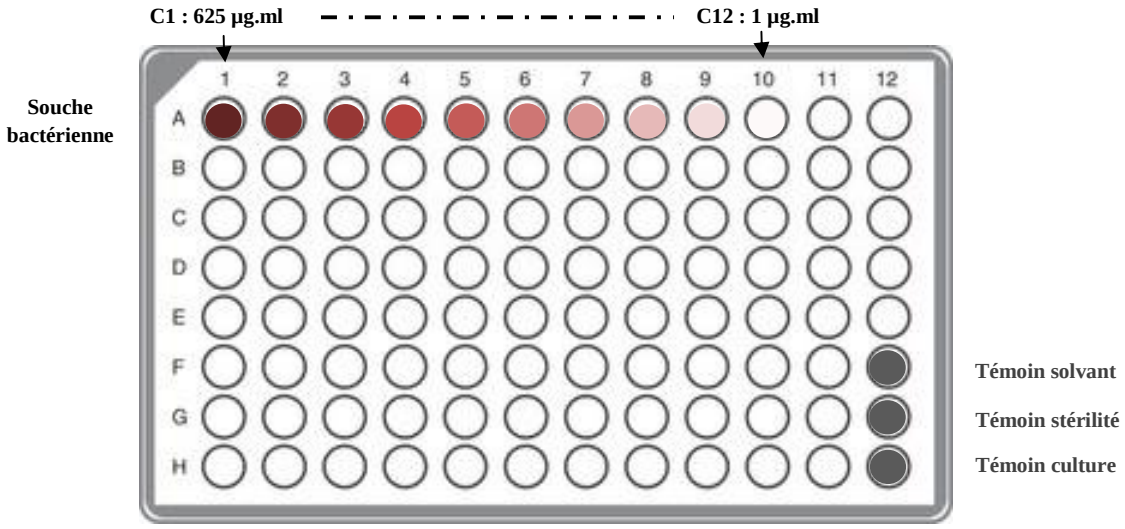


Figure 37 : Schéma de la plaque utilisé pour les essais contre *S. dysgalactiae* et *S. pyogenes*

Les multiples essais réalisés sur *S. dysgalactiae* T46C14 n'ont pas été concluants. Les CMI obtenues sont très différentes de celles obtenues lors du test de criblage sur les 36 souches avec une très grande variabilité des CMI et des CMB selon les expériences. Ceci est probablement dû à une certaine sensibilité de la souche au méthanol en milieu liquide, solvant utilisé pour solubiliser le sous-extrait JMR-MC qui n'est pas bien soluble dans l'eau ou dans le DMSO. Ces essais ont ainsi été abandonnés. Par contre, les essais sur *S. pyogenes* 13240 se sont montrés beaucoup plus reproductibles, avec les mêmes CMI que celles obtenues lors du

test de criblage sur les 36 souches (CMI = 39 µg/mL et CMB = 156 µg/mL). Nous nous sommes donc concentrés sur l'étude de l'activité antibactérienne de JMR-MC contre *S. pyogenes* 13240.

III.3.3. Détermination de la CMB du sous-extrait le plus actif sur d'autres souches de *S. pyogenes*

Plusieurs souches de *S. pyogenes* étant disponibles au Laboratoire de bactériologie, nous avons testé l'activité antibactérienne de JMR-MC sur ces souches par la même méthode de dilution en milieu liquide, comme détaillée précédemment, pour déterminer les CMI et CMB. L'amoxicilline a été utilisée comme témoin positif (64-0,5 µg/mL). Les résultats sont détaillés dans le tableau 7.

Tableau 7 : CMI et CMB (µg/mL) observées pour JMR-MC contre 8 souches de *S. pyogenes*

	JMR-MC			
***Streptococcus pyogenes*souches**	**CMI**	**CMB**	**CMB/CMI**	**Amox.**
16102	39	78	2	R
16114	78	156	2	R
16135	19	39	2	R
16137	78	156	2	R
16138	39	156	4	R
16139	78	312	4	R
16140	39	39	1	R
16142	78	156	2	R

CMI (µg/mL) de l'extrait brut et des sous-extraits : CMI < 100 µg/mL : activité élevée ; 100 µg/mL < CMI < 500 µg/mL : activité modérée ; 500 µg/mL < CMI < 1000 µg/mL : activité faible ; CMI ≥ 1000 µg/mL : n'est pas considéré actif (NA). CMB/CMI ≤ 4 : bactéricide ; CMB/CMI > 4 : bactériostatique. Amox. Amoxicilline, S : ≤ 4, R : > 16 ; R : résistante ; S : sensible.

JMR-MC est bactéricide et montre des activités élevées sur toutes les souches de *S. pyogenes* testées, avec l'activité la plus élevée notée contre *S. pyogenes* 16135 (CMI = 19 µg/mL et CMB = 39 µg/mL). Nous avons donc cherché à localiser les composés responsables des activités de JMR-MC.

III.3.4. Localisation des composés potentiellement actifs sur *S. pyogenes* 16135

Pour localiser les composés responsables de l'activité antibactérienne, nous avons effectué des analyses par bioautographie. Cependant, les différentes tentatives réalisées n'ont pas été fructueuses dans la mesure où la visualisation des zones d'inhibition n'était pas facile. En effet, les souches testées ne semblent pas avoir bien poussées sur la gélose en contact avec la plaque CCM et n'ont donc pas pu bien réagir avec les composés ayant migré sur la plaque. Les tentatives d'optimisation du protocole (ajout du sang dans le milieu) n'ont pas fonctionné. Nous avons été notamment confronté à un manque de reproductibilité des expériences ; le rapport frontal des composés localisés comme étant actifs changeant d'une expérience à une autre (Annexes 4). Nous avons donc testé directement les composés purifiés de JMR-MC et identifiés au cours de l'étude précédente.

III.3.5. Analyse de l'activité antibactérienne des composés purifiés sur *S. pyogenes* 16135

Nous avons testé l'activité antibactérienne sur *S. pyogenes* 16135 des dérivés phénanthréniques précédemment identifiés : juncusol, dehydrojuncusol, dehydroeffusol, effusol et juncunol, et ceci par la même méthode de dilution en milieu liquide détaillée précédemment (concentrations : 312-0,14 µg/mL). Nous n'avons pas pu tester les composés C12 et C10 analysés dans l'étude précédente (VHC), car ils ont été isolés en trop faibles quantités. De plus, l'élucidation structurale de ces composés n'est pas encore achevée.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8 : CMI et CMB (en µg/mL) enregistrées pour les composés testés sur *S. pyogenes*16135

Composés	CMI	CMB	CMB/CMI
Juncusol	156	312	2
Dehydrojuncusol	>312	>312	NC
Dehydroeffusol	>312	>312	NC
Effusol	>312	>312	NC
Juncunol	19	39	2

CMI (µg/mL) de l'extrait brut et des sous-extraits : CMI < 100 µg/mL : activité élevée ; 100 µg/mL < CMI < 500 µg/mL : activité modérée ; 500 µg/mL < CMI < 1000 µg/mL : activité faible ; MIC ≥ 1000 µg/mL : n'est pas considéré actif. NC, non calculé. CMB/CMI ≤ 4 : bactéricide ; CMB/CMI > 4 : bactériostatique.

Parmi les composés testés, seuls deux produits ont montré des activités intéressantes, le juncusol, avec une activité modérée (100 µg/mL < CMI < 500 µg/mL), mais surtout le juncunol, qui a montré l'activité la plus élevée, similaire à celle de JMR-MC (CMI = 19 µg/mL).

Le juncunol serait donc en partie responsable de l'activité antibactérienne observée pour JMR-MC.

Aucune étude n'a été trouvée dans la littérature concernant l'analyse de son activité antibactérienne. Il serait donc intéressant d'étudier davantage l'activité du juncunol contre les souches de *S. pyogenes*. Par ailleurs, d'autres composés isolés de JMR-MC pourraient avoir des activités plus élevées. L'identification et l'évaluation de l'activité antibactérienne des autres composés purifiés pourraient aider à mieux comprendre l'activité antibactérienne de JMR-MC.

IV. Exploration des effets des plantes halophytes et xérophytes sur la santé du végétal, l'exemple de la septoriose du blé

Dans un premier travail de criblage, nous nous sommes intéressés aux bénéfices que peuvent apporter les plantes halophytes et xérophytes en santé humaine. En raison de leurs activités antimicrobiennes intéressantes et d'une collaboration avec l'ISA au sein de l'Institut Charles Viollette (Prof. Patrice Halama et Dr Ali Siah), nous nous sommes intéressés aux propriétés antifongiques que peuvent avoir les 8 plantes extrêmophiles étudiées (*Atractylis serratuloides*, *Cirsium scabrum*, *Scabiosa maritima*, *Limonium virgatum*, *Juncus maritimus*, *Silene succulenta*, *Atriplex tatarica* et *Aeluropus littoralis*), en particulier contre *Zymoseptoria tritici*, un pathogène fongique qui attaque les cultures de blé provoquant la maladie de la septoriose.

A l'égard du potentiel antimicrobien remarquable de l'extrait des rhizomes de *J. maritimus* (cf chapitre **III**), et en prenant en compte la variabilité des écosystèmes salins que peut occuper cette halophyte (marais, sebkhas,…), une exploration des effets édaphiques, mais également des effets physiologiques, sur les potentielles activités antifongiques de cette plante contre *Zymoseptoria tritici* a été initiée.

Les extraits méthanoliques préparés à partir d'organes des 8 plantes extrêmophiles étudiées ont donc été testés sur *Zymoseptoria tritici*. A ce criblage, un deuxième extrait des rhizomes de *J. maritimus* a été intégré, nommé JMR1, pour faire la distinction avec l'extrait des rhizomes de la même plante utilisé initialement dans ce travail de thèse (ici nommé JMR0). L'échantillon des rhizomes de JMR1 a été collecté sur un substrat à tendance marneux et durant la période de floraison, contrairement à JMR0 étant collecté sur un substrat plutôt sableux/marneux et durant la période de maturation des graines.

Les essais antifongiques ont été réalisés en utilisant des boites de pétri coulées par de la gélose dextrosée à la pomme de terre (PDA) mélangée aux extraits (1250 µg/mL) et ensemencée par une souche de *Z. tritici* ($5x10^5$ spores/mL).

Curieusement, l'activité la plus élevée sur *Z. tritici* a été enregistrée pour JMR1, parmi l'ensemble des extraits testés, y compris JMR0 qui a montré un effet significativement moins important de celui de JMR1. Cette différence d'activité entre JMR0 et JMR1 rend compte de l'influence du stade physiologique ou de l'endroit dans le quel se développent les rhizomes de la plante. En vue de vérifier ces hypothèses, six nouveaux échantillons de rhizomes de *J.*

maritimus (JMR2 à JMR7), ont été collectés en faisant varier différents paramètres, soient l'endroit, le stade physiologique, mais également l'année de collecte (tableau 9).

Tableau 9. Conditions de collectes des échantillons de rhizomes de *Juncus* maritimus (JMR2 à JMR7)

	Année	Stade physiologique	Endroit
JMR2	2014	Maturation des graines	Site (1) de collecte de JMR0 (sableux / marneux)
JMR3	2014	Maturation des graines	Site 3 (sableux)
JMR4	2014	Maturation des graines	Site 4 (sebkha)
JMR5	2014	Maturation des graines	Site (2) de collecte de JMR1 (marneux)
JMR6	2015	Floraison	Site (2) de collecte de JMR1 (marneux)
JMR7	2015	Maturation des graines	Site (1) de collecte de JMR0 (sableux / marneux)

Des extraits méthanoliques ont alors été préparés à partir de ces échantillons puis testés sur *Z. tritici*.

Les résultats indiquent initialement que l'activité antifongique des rhizomes de *J. maritimus* sur *Z. tritici* ne semble pas varier le long des années. En effet, JMR2 et JMR7, collectés sur 2 années, à partir du même endroit et durant le même stade physiologique, ont montré des activités similaires, ayant un faible effet sur la croissance de *Z. tritici*. Le stade physiologique, également, semble avoir peu d'influence sur le potentiel antifongique des rhizomes de *J. maritimus*. Ceci a été déterminé en comparant les activités de JMR6 et JMR7 sur *Z. tritici*. Ces échantillons collectés au même endroit et à la même année, mais à différents stades physiologiques, ont en effet, des activités antifongiques similaires, avec peu d'effets sur la croissance de *Z. tritici*. En contre partie, les extraits des autres échantillons (JMR2 - JMR5), collectés durant la même année et au même stade physiologique, mais à des endroits différents, ont montré des activités significativement différentes sur *Z. tritici*. On peut suggérer donc que l'activité des rhizomes de *J. maritimus* serait plutôt influencée par le milieu.

JMR3 et JMR4 se sont distingués des autres extraits par les activités les plus élevées, avec un maximum enregistré pour JMR4 (la croissance est complètement inhibée à la concentration testée, 1250 µg/mL). Cet extrait a été élaboré à partir de rhizomes poussant dans un bassin occupant le fond d'une dépression à forte salinité (Sebkhat Ariana). Afin de comprendre ces différences d'activités antifongiques, une analyse des extraits (JMR2-JMR7) par CLHP-DAD a d'abord été réalisée.

La comparaison des profils chromatographiques de l'ensemble des extraits a montré que les chromatogrammes des extraits les plus actifs, JMR3 et JMR4, sont différents des autres. Une série de composés moyennement polaires (t_R = 10 à 35 minutes) est détectée dans le chromatogramme de JMR3 avec des intensités plus élevées que dans les autres chromatogrammes. Le chromatogramme de JMR4 quant à lui, se distingue par la présence d'un pic (t_R = 38 minutes) qui est très faiblement détecté dans les autres extraits. Un fractionnement bioguidé a donc été initié pour ces deux extraits par extraction liquide-liquide. Les sous-extraits obtenus, dichlorométhane (JMR3-MC et JMR4-MC), acétate d'éthyle (JMR3-EA et JMR4-EA) et aqueux (JMR3-W et JMR4-W) ont été analysés au moyen du même test d'activité antifongique, mais en utilisant une gamme de concentrations pour déterminer les CMI et les CI_{50}. Les résultats obtenus ont montré que JMR3-EA, qui renferme majoritairement la série des composés (t_R = 10 à 35 minutes) susceptibles d'être responsables de l'activité de JMR3, n'est pas le plus actif (CI_{50} = 479,64 µg/mL) parmi les sous-extraits de JMR3. Les sous-extraits de JMR4 ont montré les activités les plus élevées avec un maximum enregistré pour JMR4-MC (CI_{50} = 26,55 µg/mL).

La comparaison des chromatogrammes des sous-extraits de JMR4 (JMR4-MC, JMR4-EA et JMR4-W) a révélé que le composé à t_R = 38 min, nommé JMR4-MC-1, est principalement présent dans JMR4-MC. Nous avons donc isolé ce composé directement par CLHP préparative (JMR4-MC-1 = 9 mg). L'analyse des données RMN 1D et 2D de JMR4-MC-1 puis la comparaison de ces données avec celles rapportées dans la littérature a permis de déterminer qu'il s'agit de l'effusol (Shima *et al.*, 1991), un des phénanthrènes isolés à partir de JMR0 (CPC et CLHP préparative) au courant des études précédentes (chapitre **III.2**). Par la suite, nous avons voulu vérifier si l'effusol est responsable de l'activité de JMR4. L'évaluation de l'activité antifongique de l'effusol sur *Z. tritici* a montré qu'il est très actif (CMI =19 µg/mL et CI_{50} = 9,98 µg/mL). Pour le confirmer, une fraction de JMR4-MC sans l'effusol a également été testée. Celle-ci n'a montré aucune activité sur *Z. tritici* (CMI > 312 µg.mL). L'effusol semble donc être le composé principalement responsable de l'activité antifongique de JMR4. Il n'y a pas d'études sur l'activité antifongique de l'effusol dans la littérature, d'où l'intérêt de poursuivre cette étude pour caractériser le mécanisme d'action de l'effusol sur *Z. tritici*, mais aussi de contribuer à la compréhension de l'effet de la salinité sur le changement du profil chimique chez les halophytes.

Contribution personnelle. Cette étude a abouti suite à un grand travail de recherche et d'investigation de plusieurs terrains en Tunisie où j'ai sélectionné différents spécimens de *J. maritimus* représentatifs de différentes conditions édaphiques et physiologiues. J'ai aussi collecté les échantillons en quantités et réalisé le travail d'extraction, y compris la préparation des échantillons (broyage, séchage) ainsi que la préparation des extraits. Les autres contributions que j'ai apportées concernent la réalisation des tests d'activités antifongiques, mais aussi le travail de fractionnement et de purification des molécules, notamment la réalisation des extractions liquide-liquide, et la purification de l'effusol directement par CLHP préparative.

Biocontrol activity of effusol from the extremophile plant, *Juncus maritimus*, against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*

Ramla Sahli[1,2], Céline Rivière[1*], Ali Siah[3], Abderrazak Smaoui[2], Jennifer Samaillie[1], Thierry Hennebelle[1], Vincent Roumy[1], Riadh Ksouri[2], Patrice Halama[3], Sevser Sahpaz[1]

1 Univ. Lille, INRA, ISA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, EA 7394 – ICV, Institut Charles Viollette, F-59000 Lille, France

2 The Laboratory of Aromatic and Medicinal Plants, Biotechnology Centre of Borj-Cédria (CBBC), Hammam-lif, Tunisia;

3 ISA, INRA, Univ. Artois, Univ. Lille, Univ. Littoral Côte d'Opale, EA 7394 – ICV, Institut Charles Viollette, F-59000 Lille, France

Corresponding author: Céline Rivière

E-mail: celine.riviere-3@univ-lille2.fr

Phone number: 0033 3 20 96 40 41

Abstract

Zymoseptoria tritici, responsible for Septoria tritici blotch, is the most important pathogen of wheat. The control of this parasite relies mainly on synthetic fungicides, but their use is increasingly controversial and searching for alternative management strategies is encouraged. In this context, the biocontrol potential of crude methanolic extracts of eight extremophile plant species from Tunisia, including three xerophytes and five halophytes, against *Z. tritici* was assessed. Only the extract of *Juncus maritimus* rhizomes showed significant *in vitro* antifungal activity. In extremophile plants, the production of secondary metabolites is often influenced by abiotic conditions. Thus, we collected several samples of *J. maritimus* rhizomes at different vegetative stages, at different periods and from different substrates to compare their antifungal activities. Our results suggest that the plant environment, especially the substrate of the soil, should be taken into account to identify great sources of natural antifungal products. From the most active sample, a 9,10-dehydrophenanthrene derivative, effusol, absent from other *J. maritimus* rhizomes extracts, was purified. This product showed a strong antifungal activity against the pathogen, with a MIC of 19 µg/mL and an IC_{50} of 9.98 µg/mL. This phenanthrene derivative could be a promising biocontrol molecule against *Z. tritici*.

Keywords: *Zymoseptoria tritici*, Wheat, Biofungicides, Extremophile plants, *Juncus maritimus*, effusol

Introduction

Wheat is the most widely grown crop in the world. Within the European Union, wheat advanced from its world position of second most important food crop (after rice) to the status of the most important cereal (Fones and Gurr 2015). Pests and pathogens constitute a serious and persistent challenge to the wheat industry. Among pathogens of wheat, *Zymoseptoria tritici* (anamorph: *Mycosphaerella graminicola*), causing Septoria tritici blotch (STB), is the most frequently occurring one, inducing up to 50% yield losses (Ponomarenko et al. 2011). Pathogen control relies mainly on the use of conventional synthetic fungicides such as demethylation inhibitors (DMIs) and succinate dehydrogenase inhibitors (SDHIs), and at lesser extent the deployment of partially-resistant wheat cultivars. However, the wide use of some products because of their strong protection efficacy led to (i) an emergence and widespread of resistant strains towards several fungicide families including quinone outside inhibitors (QoI) and to (ii) a frequent overcoming of plant host resistance (Cowger et al. 2000; Cheval et al. 2017). Besides, there is a growing public concern about the potential negative impact of chemical fungicides on both the environment and human health. Over the last decade, many pesticides were removed from the market. Changes in the regulatory processes within the European Union are also expected to curtail the availability of effective fungicides (Jess et al. 2014). Hence, looking for alternative control strategies is strongly encouraged, especially in Europe, where several national action plans were set up to reduce the use of conventional pesticides (Ravensberg et al. 2015).

Biocontrol products are considered as one of the most promising save and eco-friendly plant protection tools. Currently, biofungicides hold just 5% of the worldwide crop protection market (approx. $3 billion/year), but this segment of the industry is growing and it is projected to increase by 8.84% annually, reaching more than 7% of the total crop protection market by 2025 (more than $4.5 billion/year) (Olson 2015). Biological control agents include

living microorganisms or their metabolites, but also extracts and compounds from plants that have the ability to alter the pathogen development (Ravensberg et al. 2015). Extremophile plants are a good example of this kind of plants. Unlike other vascular plants, they are able to thrive under severe environmental constraints (salinity, drought, light stress, extreme temperatures, etc.). Such potential was associated to their ability to resist to pathogens infections, as many extremophile plants were proven to possess antimicrobial activity (Ksouri et al. 2012).

Today, there is a growing demand for new sources of biocontrol agents, since only few active substances of such products are available in the market. For instance, in France, only laminarin (Vacciplant®, Goëmar, France), a low-molecular-weight polysaccharide, is registered as plant resistance inducer on wheat against *Z. tritici*, despite the strong significance of this pathogen. However, a range of microbial-derived products belonging to a wide range of genera, including for example Bacillus species, are available for management of plant diseases in organic agriculture (Dayan et al. 2009). Natural compounds discovered from plants are less encountered. Some marketed biofungicides are formulated with essential oils, but their mode of action against individual plant pathogens are largely unknown (Dayan et al. 2009). The most studied plant extract for induced resistance is probably an extract of the giant knotweed *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai (Polygonaceae), which is the main ingredient of a marketed fungicide (Milsana^{TM}) effective against a wide spectrum of plant diseases (Dayan et al. 2009). Baysal-Gurel and Muiller (2015) confirmed the protective effect of a new formulation of *R. sachalinensis* extract marketed as Regalia® by Marrone Bio Innovations (Davis, CA, USA) on greenhouse produced tomato against powdery mildew (Siah et al. in press).

The objective of the present study was to assess the biofungicide potential of extracts from eight extremophile plants, including three xerophytes and five halophytes, against *Z. tritici*.

Different parts of these plants were collected and crude methanolic extracts were prepared and assessed for *in vitro* activity against the pathogen. The rhizomes of the most active plant, *Juncus maritimus*, were thereafter collected at different vegetative stages, at different periods and from different substrates to compare their antifungal activity. From the most active *J. maritimus* sample, HPLC-UV analyses highlighted the presence of a peak not detected in other samples, corresponding to effusol. Further investigations revealed that this biomolecule was responsible for the observed activity against *Z. tritici*.

Materials and methods

Plant collection and identification

Xerophyte plants (*Cirsium scabrum* Bonnet & Baratte, Asteraceae, and *Scabiosa maritima* L., Caprifoliaceae) were collected in August 2013, in North Tunisia, and in February 2013, in South Tunisia (*Atractylis serratuloides* Sieber ex Cass. (Asteraceae). Halophyte plants (*Aeluropus littoralis* (Gouan) Parl., Poaceae; *Atriplex tatarica* Aellen, Amaranthaceae; *Juncus maritimus* Lam., Juncaceae (JMR0); *Limonium virgatum* Fourr., Plumbaginaceae; *Silene succulenta* Forssk., Caryophyllaceae) were collected in September-October 2013 from a coastal region of north-eastern part of Tunisia (Soliman beach, marly-sandy soil). In addition, rhizomes of the halophyte plant *J. maritimus* (JMR1) were collected at a different period (flowering stage, March 2014) and from a different substrate (Soliman beach, marly soil). All plants were identified at the Biotechnology Centre of Borj-Cédria by Dr Abderrazak Smaoui. Voucher numbers are indicated in brackets: *Atractylis serratuloides* (167), *Cirsium scabrum* (181), *Scabiosa maritima* (182), *Silene succulenta* (183), *Juncus maritimus* JMR0 (184), *Limonium virgatum* (185), *Atriplex tatarica* (186), *Aeluropus littoralis* (187), *Juncus maritimus* JMR1 (192). Furthermore, new rhizomes of *J. maritimus* (JMR2 to JMR7) were

collected in October 2014 and March or October 2015 take into consideration three different abiotic parameters (year of collection, vegetative stage and substrate) (Table 1).

Plant extract preparation

Collected plant materials were dried at 25 °C for one week. Different parts of some of these plants were powdered separately as detailed as follows: *Limonium virgatum* (leaves (137g) and stems (167.2g)); *Juncus maritimus* (flowers (92.4g), stems (217.1g) and rhizomes (40.5g)); *Scabiosa maritima* (flowers (156.8g), leaves (46.7g) and stems (273.9g)); *Cirsium scabrum* (flowers (243.9g), leaves (310.8g) and stems (141.1g)); *Silene succulenta* (leaves (107.5g) and stems (81g)). In case of other species, the entire plant was powdered (*Aeluropus littoralis* (111.3g), *Atractylis serratuloides* (99g) and *Atriplex tartarica* (97.3g)).

The dried and powdered parts were then extracted three times (3 x 48 h) by maceration with methanol at room temperature (15 mL g^{-1}). After filtration and removal of methanol *in vacuo* at 35 °C, the extracts were suspended in water and lyophilized: *A. littoralis* (AL = 9.34%); *A. serratuloides* (AS = 7.63%); *Atriplex tartarica* (AT = 14.23%); *Cirsium scabrum* flowers (CSF = 6.13%), leaves (CSL = 12.12%) and stems (CSS = 9.33%); *J. maritimus* (JMR0) flowers (JMF = 7.33%), stems (JMS = 12.65%) and rhizomes (JMR = 12.53%); *J. maritimus* (JMR1) rhizomes (JMR1 = 14.84%); *L. virgatum* leaves (LVL = 19.39%) and stems (LVS = 17.85%); *S. maritima* flowers (SMF = 3.28%), leaves (SML = 7.65%) and stems (SMS = 2.32%); *S. succulenta* leaves (SSL = 23.73%) and stems (SSS = 10.76%).

Juncus maritimus rhizomes (JMR2-JMR7) were dried at 25 °C for one week. Dried rhizomes were powdered and extracted by maceration with methanol (24 h) at room temperature (15 mL g^{-1}) using a double-arm agitator pattern. Extracts were then filtered and dried *in vacuo* at 35 °C.

Phytochemical analyses

HPLC analysis of crude J. maritimus extracts

HPLC-UV analysis of the plant extracts were carried out using a Shimadzu binary LC-10AS pump, aSCL-10A UV-visible detector and a VisionHT Basic C18 (5 µm, 250 x 4 mm) column (Grace, Epernon, France). Twenty microliters of samples (10 $mg.mL^{-1}$ of plant extract solution in MeOH) were injected and the flow rate was set at 1 mL/min at room temperature. The mobile phase was composed of solvent A (0.01% formic acid in water) and solvent B (acetonitrile). The gradient elution program used was 10-38% B (0–30 min), 38% B (30–40 min), 38-45% B (40–45 min), 45-51% B (45–47 min), 51-95% B (47–48 min), 95-98.8% B (48–62 min) and 98.8–100% B (62–63 min).

Solvent-solvent partition of JMR3 and JMR4

A portion of the crude extracts of *J. maritimus* JMR3 and JMR4 (150 mg) was suspended in water (20 mL) and solvent-solvent partition was performed with methylene chloride (10 × 20 mL) and then with ethyl acetate (10 × 20 mL). Each fractions were concentrated at 35 °C under reduced pressure to yield methylene chloride fraction (JMR3-MC = 152 mg; JMR4-MC = 230 mg) and ethyl acetate fraction (JMR3-EA = 138 mg; JMR4-EA = 89 mg). The remaining aqueous fractions were lyophilized (JMR2-W = 818 mg; JMR4-W = 633 mg).

Purification of JMR4-MC-1 by preparative HPLC

The active compound of JMR4 (JMR4-MC-1) was isolated by preparative HPLC. It was performed using a Shimadzu HPLC system equipped with a LC-20AP binary high-pressure pump, a SPD-M20A photodiode array detector and a VisionHT Basic C18 (5 µm, 250 × 22 mm) column. A portion of JMR4-MC (50 $mg.mL^{-1}$) was injected three times through a preparative HPLC system at a flow rate of 15 $mL.min^{-1}$ to give 9 mg of a pure compound

(JMR4-MC-1). The mobile phase was composed of solvent A (0.01% formic acid in water) and solvent B (acetonitrile). The gradient elution program used was 10-38% B (0–2 min), 38-45% B (2–8 min), 45-51% B (8–25 min), 51-100% B (25–26 min) and 100% B (26–45 min).

Structural elucidation of JMR4-MC-1 by NMR

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Bruker DPX-500 spectrometer (^{1}H and ^{13}C NMR at 500 MHz) in $CDCl_3$. HRMS analysis was carried out in negative mode with a range of *m/z* 100-1000, using a Thermo Fisher Scientific Exactive Orbitrap mass spectrometer equipped with an atmospheric pressure chemical ionization (APCI) ion source. The vaporizer temperature of the source was set at 100 °C, the nitrogen sheath gas at 10-20, and the auxiliary gas at 2-6 (arbitrary units).

Spectroscopic data of effusol (JMR4-MC-1); white powder (9 mg): ESI-MS *m/z* 251.10645 $[M-H]^-$ (theorical mass 251.10775; $C_{17}H_{16}O_2$ requires 252); ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.34 (1H, *d*, *J* = 9.3 Hz, H-4), 6.97 (1H, *dd*, *J* = 17.5, 11.8 Hz, H-13), 6.92 (1H, *d*, *J* = 2.5 Hz, H-6), 6.72 (1H, *d*, *J* = 2.5 Hz, H-8), 6.71 (1H, *d*, *J* = 9.3 Hz, H-3), 5.71 (1H, *dd*, *J* = 17.5, 0.9 Hz, H2-14a), 5.28 (1H, *dd*, *J* = 10.8, 0.9 Hz, H2-14b), 2.77 (2H, *m*, H2-10), 2.71 (2H, *m*, H2-9), 2.29 (3H, *s*, H3-11) and ^{13}C NMR (500 MHz, $CDCl_3$): 153.3 (C-7), 151.9 (C-2), 139.5 (C-1a), 138.5 (C-13), 137.2 (C-8a), 136.5 (C-5), 127.3 (C-4), 126.9 (C-5a), 126.0 (C-4a), 120.5 (C-1), 114.1 (C-14), 113.8 (C-8), 112.8 (C-6), 112.6 (C-3), 29.2 (C-9), 24.7 (C-10), 10.7 (C-11).

Antifungal bioassay

Antifungal activity of plant extracts against *Z. tritici* was assessed *in vitro* using potato dextrose agar (PDA) medium (Fluka) amended with different plant extracts, using the spotting method described by Siah et al. (2010). Plant extracts were added to the medium at 30 °C

after autoclaving and after solubilizing in 0.5 mL of methanol. Final concentration of methanol in the medium, including controls without plant extracts, did not exceed 2%. Crude extracts from different plant species and from *J. maritimus* rhizomes were tested using only one concentration (1.25 g L^{-1}), while purified extracts (JMR3 and JMR4) were tested using several concentrations (625, 312, 156, 78, 39, 19.5 and 9.75 $mg.mL^{-1}$). Effusol obtained from JMR4-MC, as well as Bixafen (Sigma-Aldrich), used as a reference synthetic fungicide molecule, were tested using eight concentrations (312, 156, 78, 39, 19.5, 9.75, 4.87, 2.43 $mg.mL^{-1}$). After preparation, each PDA plate was spotted with 5 µL of 5 x 10^5 $spores.mL^{-1}$ suspension, obtained by washing a 7 day-old fungal culture grown on PDA at 20 °C, using sterile distilled water. The screening of crude extracts from different plant species was performed using the *Z. tritici* strain T01193, while further assays were carried out using the *Z. tritici* strain T02596. Both isolates we used in our experiments were collected, respectively in 2009 and 2014, in North France (Lorgies locality) from a wheat plants infected with *Septoria tritici* blotch (*Zymoseptoria tritici*). The two isolates were obtained in our lab using a fungal isolation procedure. Three different plates were used as replicates for each condition, including controls. After spotting, the plates were incubated for 10 days in dark at 18 °C and then the fungal growth was scored by measuring colony perpendicular diameters of each fungal spot.

Statistical analyses

Comparisons of fungal growth (means of colony perpendicular diameters) for crude plant extracts were performed with the Tukey test at a significance level of $P < 0.05$, using the XLSTAT software (Addinsoft, France). For purified extracts, half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) and minimal inhibitory concentration (MIC) values were calculated from

the corresponding dose-response curves, using linear regression implemented in the XLSTAT software.

Results and discussion

Antifungal activity of crude plant extracts against *Z. tritici*

The antifungal activity of crude methanolic extracts from eight extremophile plants collected in Tunisia, including three xerophytes and five halophytes, was evaluated at 1.25 g L^{-1} against *Z. tritici*. Interestingly, several plant extracts (*i.e.* extract from stems of *S. maritima* and leaves from *C. scabrum*), as well as methanol used as solvent to dissolve plant extracts, showed a stimulatory effect on the pathogen growth when compared to the control (Figure 1). Among the tested crude extracts, only the extract JMR1 from *J. maritimus* rhizomes, collected in March 2014, at "flowering" stage and growing on marly soil, exhibited a significant reduction of fungal growth (mean of colony diameter = 1.85 ± 0.45 mm) (Figure 1). *Juncus maritimus* is a halophyte plant from the *Juncaceae* family. To date, no data was reported on the phytochemical composition of this plant and on its biological activity against *Z. tritici*. Previous studies on *Juncus* species focused mainly on antibacterial activity against medical bacteria. For instance, it was recently demonstrated that extracts from sixteen *Juncus* species, including *J. maritimus*, displayed strong inhibitory activities against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains (Tóth et al. 2016). Only few studies have been reported the antifungal activity of Juncus species, e.g. Awaad et al. (2015) demonstrated that ethanol extract prepared from the aerial parts of *J. acutus* possessed low inhibitory activity against unicellular and filamentous fungi.

Impact of plant growing conditions on the activity of *J. maritimus* rhizome extracts

Curiously, the extract JMR0, prepared from also *J. maritimus* rhizome, but collected in a different period (October 2013, at "full seed" stage) and growing on a different substrate (marly-sandy soil), did not show any significant activity. This difference of activity between JMR0 and JMR1 could be explained by the vegetative stage (physiological properties) of the plant at the moment of sampling, as well as by the type of substrate since JMR0 and JMR1 were sampled from different types of soil. In order to verify these hypotheses and to evaluate the impact of the variation of environmental parameters on antifungal activity, six new *J. maritimus* rhizome samples (JMR2 to JMR7) were collected in October 2014, and March and October 2015 according to different abiotic parameters (substrate of the soil, vegetative stage and year of collection).

Samples JMR2 and JMR7, collected over two years, on the same site and at the same vegetative stage, had overall similar and low antifungal activities against *Z. tritici* (Figure 2), suggesting that the year of collection do not significantly influence the antifungal activity level of *J. maritimus* rhizome extracts. In fact, 2014 experienced heavier rainfall (78 mm) than in 2015 (13 mm), but similar temperature levels were recorded over these two years (http://www.infoclimat.fr). On the other hand, it seems that the vegetative stage does not affect the antifungal activity of *J. maritimus* rhizome extracts. In fact, JMR6 and JMR7, both collected from the same substrate, but at different stages ("full seed" and "flowering", respectively) showed similar antifungal activities (Figure 2). Taken together, these finding indicate that the year of collection and the vegetative stage would have a low impact on the antifungal activity of *J. maritimus* rhizomes.

However, *J. maritimus* rhizomes collected on the same year and vegetative stages, but from different types of substrate, displayed significant reductions of fungal growth and the level of

antifungal effect varies depending on the substrate from which the plants were collected (Figure 2). *J. maritimus* rhizomes growing in an endorheic salt lake (sabkha) (JMR4) showed the highest activity against *Z. tritici* (total inhibition of fungal growth), while the other samples (JMR2, JMR3 and JMR5) displayed lower extent of reduction. This result indicates that substrate, especially salty environment, have a strong impact on the antifungal potential of *J. maritimus* rhizomes. Salinity stress is capable of triggering changes in the plant metabolism by affecting the plant growth, the biosynthesis of some metabolites, and therefore the qualitative and quantitative composition of these constituents (Dow et al. 1981). This abiotic stress may lead to an oxidative damage for many vascular plants. However, halophyte plants are able to grow optimally under this environment, as they developed different adaptive mechanisms, through for example the biosynthesis of a cascade of antioxidants (Ksouri et al. 2007). Moreover, it has been proven that harder environmental conditions, such as high salinity, is linked to an increase in the production of antioxidant and antimicrobial components in some of these plants (Maisuthisakul et al. 2007). Our results support these data, suggesting that high salinity environment could stimulate the synthesis of phytoalexins (e.g. in the rhizomes of *J. maritimus*) resulted in a promising antifungal activity.

HPLC characterization of crude *J. maritimus* rhizome extracts

J. maritimus rhizome extracts (JMR2 to JMR7) were analyzed using HPLC-UV as a primary phytochemical investigation approach. JMR3 and JMR4 clearly showed different chromatographic profiles in comparison with the other extracts (Figure 3). Compounds with retention times between 10 and 35 min are presented at higher concentration in JMR3 than in the other extracts. Moreover, the chromatogram of JMR4 showed the presence of a compound (t_R = 38 min) almost missing from the other extracts. Chromatographic data confirmed that the substrate, especially salty environment (sabkha), have an effect on the biosynthesis of

secondary metabolites that are likely involved in *J. maritimus* defense mechanisms, and that the vegetative stage and the year of collection have lower impact on the biosynthesis of such compounds.

Bioguided fractionation of JMR3 and JMR4 and activity assessment of the fractions

In order to identify the compounds responsible for antifungal activity against *Z. tritici*, the crude methanolic extract of *J. maritimus* rhizomes (JMR4) was subjected to a bioguided fractionation. In addition, JMR3 was also selected for the same phytochemical investigation to deepen the understanding of *J. maritimus* antifungal potential.

A preliminary fractionation was carried out using a solvent-solvent partition. Three fractions were obtained for both JMR3 and JMR4: methylene chloride (JMR3-MC and JMR4-MC), ethyl acetate (JMR3-EA and JMR4-EA) and aqueous (JMR3-W and JMR4-W) ones. All fractions as well as JMR3 and JMR4 crude extracts were tested for their antifungal activity against *Z. tritici* by determining MIC and IC_{50} values (Table 2). The ethyl acetate fraction from JMR3 (JMR3-EA) showed a lower activity (IC_{50} = 479.64 µg.mL^{-1}) than the methylene chloride fraction from JMR3 (JMR3-MC) (IC_{50} = 187.16 µg.mL^{-1}). On the other hand, fractions from the most active crude methanolic extract of *J. maritimus* rhizome (JMR4), displayed overall higher activities. The methylene chloride fraction (JMR4-MC) had the strongest activity among all the investigated fractions, with an IC_{50} value of 26.55 µg.mL^{-1}.

Comparison of the HPLC chromatograms of JMR4 fractions (JMR4-MC, JMR4-EA, JMR4-W) revealed that compound JMR4-MC-1 (at t_R = 38 min) is mostly presented in JMR4-MC (Figure 4), suggesting that this compound is mainly responsible for the remarkable antifungal property of JMR4.

Purification, structural elucidation and antifungal activity of JMR4-MC-1 (effusol)

The major compound (JMR4-MC-1, 9 mg) was purified by preparative HPLC from the most active fraction (JMR4-MC). This component was not detected in other *J. maritimus* rhizome extracts. The comparison of the 1D- and 2D-NMR data of JMR4-MC-1 with those reported in literature allowed to the identification of effusol (Bhattacharyya 1980), a phenanthrene only encountered in the genus *Juncus* (El-Shamy et al. 2015). Effusol (Figure 5) was already isolated from other *Juncus* species, such as the aerial parts of *J. effusus* and *J. acutus*, and the rhizomes of *J. subulatus* (El-Shamy et al. 2015). To the best of our knowledge, this is the first time that this natural product is isolated from *J. maritimus* rhizomes.

To confirm the antifungal property of JMR4-MC is due to effusol, additional antifungal tests were performed using the same spotting assay undertaken above. Effusol showed a high antifungal activity against *Z. tritici* (Figure 6). The MIC and IC_{50} values obtained for this natural product were 19 $\mu g.mL^{-1}$ and 9.98 $\mu g.mL^{-1}$, respectively (Table 2). In addition, the methylene chloride fraction (JMR4-MC) without effusol was also tested and showed no activity (CMI > 312 $\mu g.mL^{-1}$), confirming that the activity of this fraction (JMR4-MC) is mainly due to effusol. No reports on the antifungal activity of effusol have been provided in the literature so far. The few studies on the biological potential of effusol highlighted cytotoxic, anxiolytic and sedative activities (Ishiuchi et al. 2015; Wang et al. 2012). Moreover, no reports exist in the literature on the antifungal activity against *Z. tritici* for *J. maritimus*, neither for the *Juncus* genus. However, some studies highlighted the antimicrobial potential of some *Juncus* species and the implication of some dihydrophenanthrenes in this activity (El Shamy et al. 2015). These natural products are already known to be phytoalexins in some plant families such as Orchidaceae (Fisch et al., 1973; Kovács et al., 2008).

Conclusions

Methanolic extracts from eight Tunisian extremophile plants were tested for their activity against *Z. tritici*. Only extracts from *J. maritimus* rhizomes showed significant inhibitory activity against this pathogen. Further investigations showed that the substrate, especially salty environment, would have significant effect on the biosynthesis of compounds responsible for antifungal activity, as it was observed in case of *J. maritimus*. By contrast, the vegetative stage and the year of plant collection had lower effect on antifungal compound biosynthesis. Solvent-solvent partition suggested that the methylene chloride fraction JMR4-MC of the most active extract JMR4 was responsible for the antifungal activity. In addition, HPLC-UV analyses showed the presence of a compound (rt = 38 min) which could only be detected in the methylene chloride fraction (JMR4-MC) of the sample JMR4. This component was then isolated by preparative HPLC and identified as effusol, a phenanthrene derivative already described in the *Juncus* genus, but never in *J. maritimus*. It would be interesting to carry out further analyses to understand its mechanism of action against *Z. tritici*. This phenanthrene derivative could be a promising biological control molecule of this pathogen.

Acknowledgement

This study was supported by an internal financial support from the Charles Viollette Institute. The authors wish to thank platforms of CUMA (University of Lille 2, Pr. J.F. Goossens) and LARMN (University of Lille 2, Pr. N. Azaroual) for access to equipment.

References

Awaad AS, Zain ME, Al Othman MR, Al-Dosary SK (2014). Phytochemical analysis and antimicrobial activity of medicinal plants against pathogenic microorganisms. Life Sci J 11:350-354.

Baysal-Gurel F, Miller SA (2015). Management of powdery mildew in greenhouse tomato production with biorational products and fungicides. Sci Hortic 1069:179-184.

Bhattacharyya J (1980) Structure of effusol: A new phenolic constituent from *Juncus effusus*. Experientia 36: 27–28

Cheval P, Siah A, Bomble M et al (2017). Evolution of QoI resistance of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in Northern France. Crop Prot 92:131–133.

Cowger C, Hoffer ME, Mundt CC (2000) Specific adaptation by *Mycosphaerella graminicola* to a resistant wheat cultivar. Plant Pathol 49:445–451.

Dayan FE, Cantrell CL, Duke SO (2009). Natural products in crop protection. Bioorg. Med. Chem 17:4022–4034.

Dow AI, Cline TA, Horning EV (1981) Salt tolerance studies on irrigated Mint. Bulletin of Agriculture Research Center, Washington State University, Pullman 906: 11

El-Shamy AI, Abdel-Razek AF, Nassar MI (2015) Phytochemical review of *Juncus* L. genus (Fam. Juncaceae). Arabian J. Chem 8: 614-623

Fones H, Gurr S (2015) The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective. Fungal Genet Biol 79: 3-7

Fisch H, Flick BH, Arditti J (1973) Structure and antifungal activity of hircinol, loroglossol and orchinol. Phytochemistry 12, 437-441

Ishiuchi K, Kosuge Y, Hamagami H et al (2015) Chemical constituents isolated from *Juncus effusus* induce cytotoxicity in HT22 cells. Nat Med 69:421-426

Jess S, Kildea S, Moody A, Rennick G, Murchie AK, Cooke LR (2014) European Union policy on pesticides: implications for agriculture in Ireland. Pest Manag Sci 70: 1646-1654

Kovács A, Vasas A, Hohmann J (2008) Natural phenanthrenes and their biological activity. Phytochemistry 69: 1084-1110.

Ksouri R, Megdiche W, Debez A et al (2007) Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte Cakile maritime. Plant Physiol Biochem 45:244–249

Ksouri R, Ksouri WM, Jallali I et al (2012) Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. Crit Rev Biotechnol 32: 289-326

Maisuthisakul P, Suttajit M, Pongsawatmanit R (2007) Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some Thai indigenous plants. Food Chem 100:1409–1418

Olson S (2015) An analysis of the biopesticide market now and where it is going. Outlooks on Pest Management 26:203–206

Ponomarenko A, Goodwin SB, Kema GH (2011) *Septoria tritici* blotch (STB) of wheat. Plant Health Instructor.

Ravensberg W (2015) Crop protection in 2030: towards a natural, efficient, safe and sustainable approach. International Symposium Swansea University 7-9 September 2015

Siah A, Deweer C, Morand E et al (2010) Azoxystrobin resistance of French *Mycosphaerella graminicola* strains assessed by four *in vitro* bioassays and by screening of G143A substitution. Crop Prot 29:737–743.

Siah A, Magnin-Robert M, Randoux B et al. Natural agents inducing plant resistance against pests and diseases. In Mérillon JM & Rivière C, Plant kingdom and biodiversity: an endless source of antimicrobials in human and plant health. Springer Nature. In press.

Tóth B, Liktor-Busa E, Urbán E et al (2016) Antibacterial screening of Juncaceae species native to the Carpathian Basin against resistant strains and LC-MS investigation of phenanthrenes responsible for the effect. Fitoterapia 115:69-73

Wang YG, Wang YL, Zhai HF et al (2012) Phenanthrenes from *Juncus effusus* with anxiolytic and sedative activities. Nat Prod Res 26:1234-1239

Figures

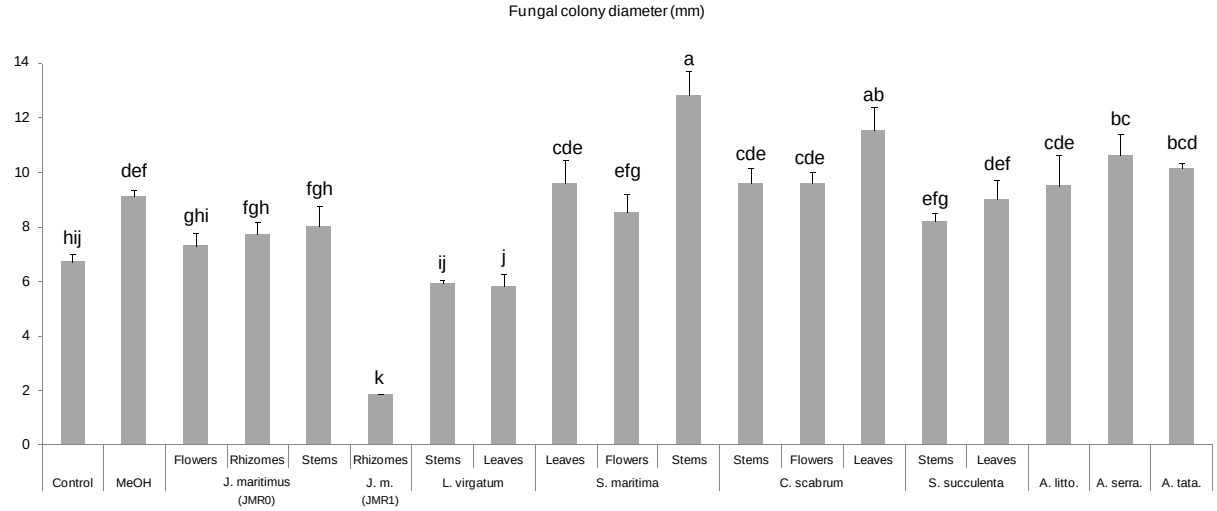


Fig. 1 Effect of crude plant extracts on the *in vitro* growth of *Zymoseptoria tritici*.
MeOH: control with methanol; *J. maritimus* (JMR0): *Juncus maritimus* collected in September-October 2013 ("full seed" stage) on marly-sandy soil; J. m (JMR1): *J. maritimus* collected in March 2014 ("flowering" stage) on marly soil; L. virgatum: *Limonium virgatum*; S. maritima: *Scabiosa maritima*; C. scabrum: *Cirsium scabrum*; S. succulenta: *Silene succulenta*; A. litto: *Aeluropus littoralis*; A. serra: *Atractylis serratuloides*; A. tata: *Atriplex tatarica*. Means tagged with the same letter are not significantly different using the Tukey test at $P = 0.05$.

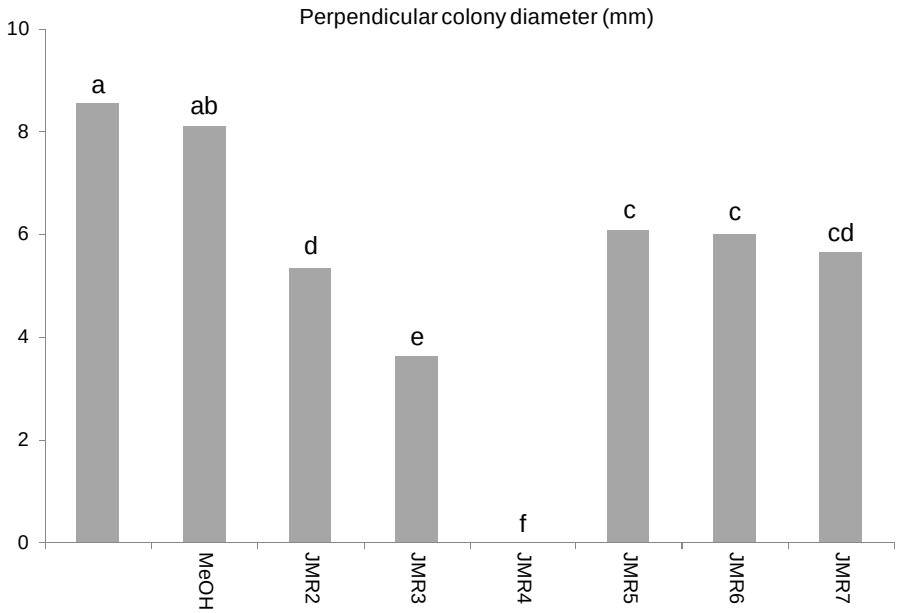


Fig. 2 Effect of *Juncus maritimus* rhizomes extracts on the *in vitro* growth of *Zymoseptoria tritici*.
MeOH: control with methanol; Means tagged with the same letter are not significantly different using the Tukey test at $P = 0.05$.

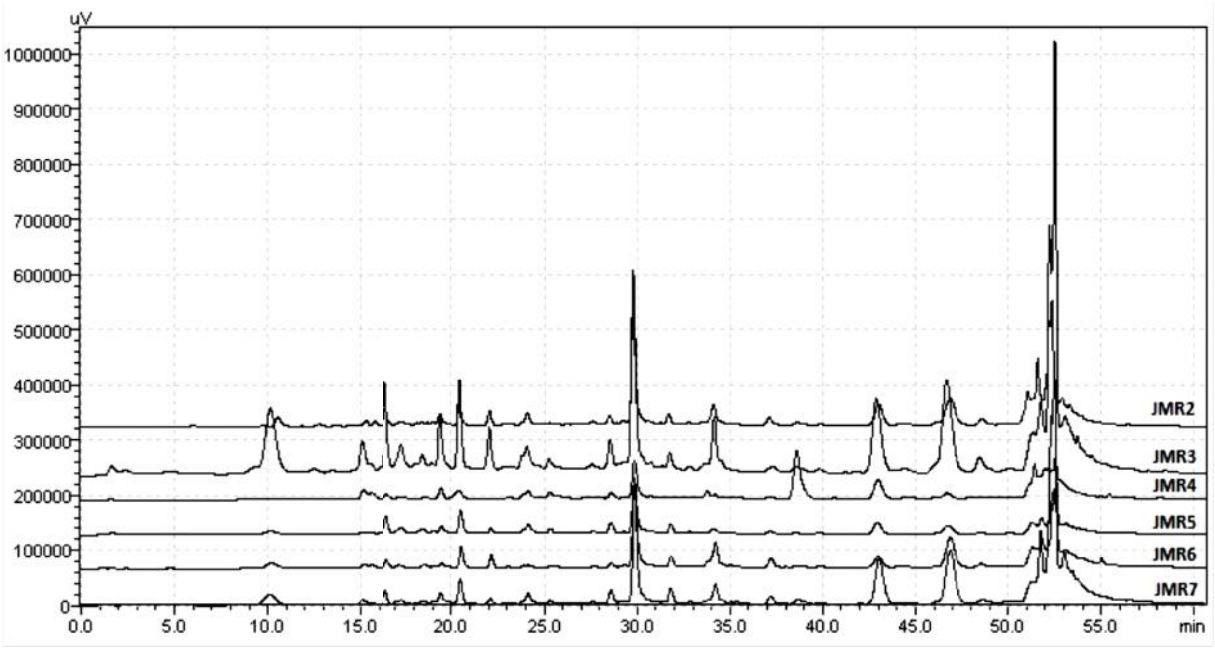


Fig. 3 JMR2-JMR7 chromatograms at 320 nm (acetonitrile/water with 0.1% acetic acid)

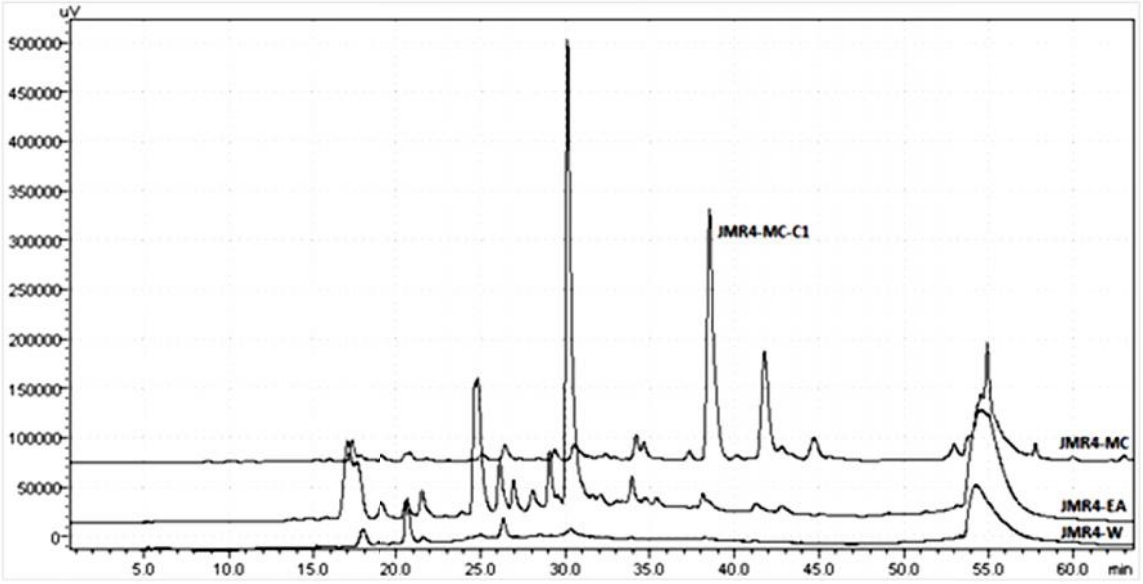


Fig. 4 JMR4 partitions chromatograms at 320 nm (acetonitrile/water with 0.1% acetic acid)

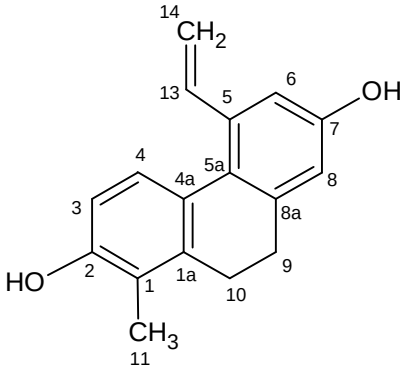


Fig. 5 Effusol chemical structure

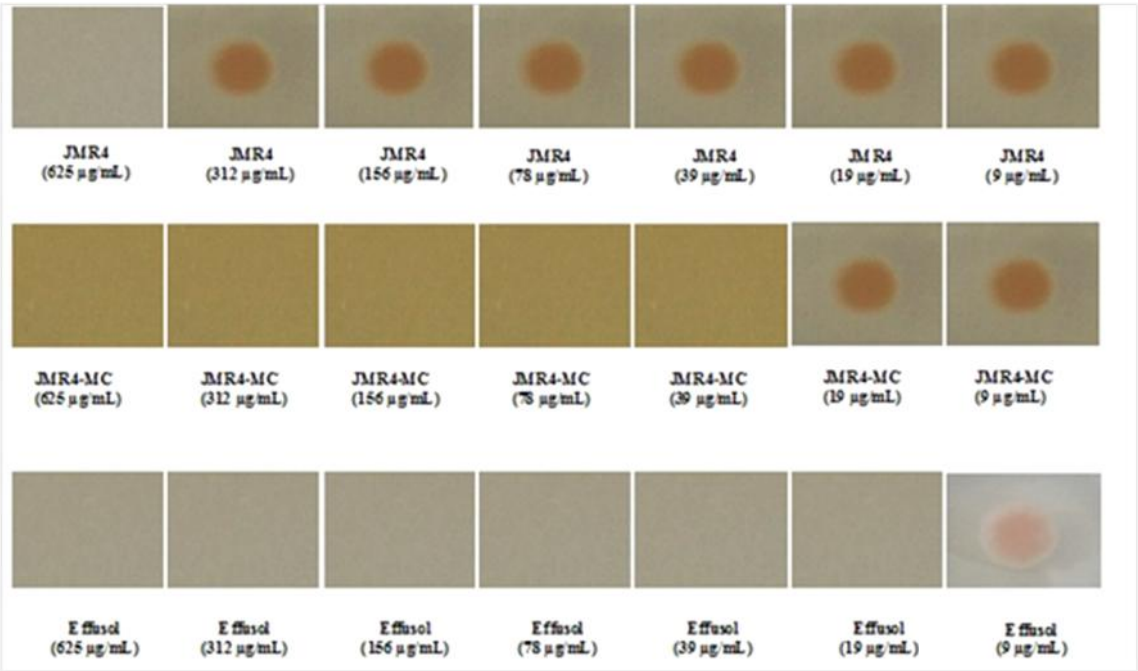


Fig. 6 Growth inhibition of *Zymoseptoria tritici* by JMR4, JMR4-MC and JMR4-MC-1 19 (effusol)

Tables

Table 1 Year of collect, vegetative stage and substrate of the soil for the seven *Juncus maritimus* rhizomes samples

Sample	Collection time	Vegetative stage	Substrate
JMR2	October 2014	“full seed" stage	Site 1 : marly sandy soil
JMR3	October 2014	“full seed" stage	Site 3 : sandy soil
JMR4	October 2014	“full seed" stage	Site 4 : endorheic salt lake
JMR5	October 2014	“full seed" stage	Site 2: marly soil
JMR6	March 2015	“flowering” stage	Site 2 : marly sandy soil
JMR7	October 2015	“full seed" stage	Site 1 : marly sandy soil

Table 2 Effect of JMR3 and JMR4 partitions against *Z. tritici* strain T02596 growth

	MIC (µg/mL)	IC_{50} (µg/mL)	SD
JMR3	> 625	> 625	
JMR3-MC	> 625	187.16	0.38
JMR3-EA	> 625	479.64	0.23
JMR3-W	> 625	> 625	
JMR4	625.00	361.25	0.12
JMR4-MC	39.00	26.55	0.06
JMR4-EA	> 625	> 625	
JMR4-W	> 625	> 625	
Bixafen	1.25	0.33	0.10

CONCLUSION GENERALE

Le regain porté aux substances d'origine végétale ces dernières années est lié au fait qu'elles peuvent constituer un véritable arsenal thérapeutique dans le domaine de la santé humaine mais aussi du végétal.

La recherche de molécules bioactives repose souvent sur la connaissance de l'usage traditionnel des plantes. D'autres approches sont également considérées, comme les approches écologiques. En effet, les plantes soumises à des stress abiotiques peuvent également être une source riche en molécules bioactives. Ces molécules sont souvent impliquées dans les mécanismes d'adaptation et de défense de la plante à ces différents stress. Les plantes extrêmophiles ont, de ce fait, des effets pharmacologiques d'intérêt.

Dans une perspective de valorisation des ressources naturelles des milieux salins et arides de la Tunisie, nous avons réalisé au cours de ce travail, un criblage biologique [activités antiradicalaire, cytotoxique, antibactérienne, anti-VHC et antifongique (*Z. tritici*)] de 8 plantes sélectionnées parmi 30 plantes xérophytes et halophytes. Nous avons commencé le criblage en testant les extraits bruts méthanoliques des différents organes de ces plantes.

Il s'agit de 3 xérophytes : *Atractylis serratuloides* (Cass.) DC. (Asteracées), *Cirsium scabrum* (Poir.) Bonnet & Barratte (Asteracées), *Scabiosa maritima* L. (Caprifoliacées) ; et 5 halophytes : *Limonium virgatum* (Willd.) Fourr. (Plumbaginacées), *Juncus maritimus* Lam.

(Juncacées), *Silene succulenta* Forssk. (Caryophyllacées), *Atriplex tatarica* L. (Amaranthacées) et *Aeluropus littoralis* (Gouan) Parl. (Poacées).

En se basant sur l'hypothèse que les plantes halophytes et xérophytes sont équipées d'un système antioxydant puissant par la présence notamment de polyphénols, nous nous attendions à avoir un résultat global intéressant pour l'ensemble des huit plantes testées. Nous n'avons pas eu les résultats attendus. Seules deux plantes étaient relativement riches en polyphénols avec un potentiel antioxydant intéressant (*Limonium virgatum* et *Juncus maritimus*). Des études ont montré que le taux de polyphénols et l'activité antioxydante chez les plantes dépendent des conditions édaphiques environnementales (température, salinité, stress hydrique et intensité lumineuse), mais aussi de facteurs biologiques (génotype, organes et ontogenèse). De plus, la solubilité des composés phénoliques est régie par le type de solvant utilisé, le degré de polymérisation des composés phénoliques, et leur interaction (Medini *et al.,* 2014).

Parmi les plantes étudiées, seule *A. serratuloides* a fait l'objet de travaux antérieurs par d'autres équipes pour son contenu en polyphénols et pour son activité anti-radicalaire. D'après les travaux effectués par Bouaziz *et al.* (2009), l'extrait méthanolique d'*A. serratuloides* a montré une activité anti-radicalaire intéressante (CI_{50} = 4,11 µg/mL). Cette activité est plus élevée que celle obtenue pour notre échantillon (% DPPH restant = 86,7% à la concentration testée de 40 µg/mL), alors que les deux prélèvements ont été effectués au sud de la Tunisie. Cette différence pourrait s'expliquer par la méthode d'extraction différente de la nôtre (par Soxhlet : hexane, acétate d'éthyle, méthanol et eau), mais surtout par une différence de période de récolte (notre échantillon a été collecté en hiver alors que leur échantillon a été colleté en été). L'évaluation de ces plantes dans d'autres périodes de leur cycle de vie et en testant d'autres solvants pourrait éventuellement conduire à des teneurs en polyphénols et des activités anti-radicalaires plus intéressantes. Dans le cadre de ce criblage qui met en jeu encore d'autres activités biologiques, la standardisation des conditions expérimentales est importante.

Les deux plantes qui ont montré les contenus en polyphénols les plus élevés, soit *Limonium virgatum* et *Juncus maritimus*, ressortent aussi comme étant les plus actives au cours des analyses d'activités antimicrobiennes. Les composés de ces deux plantes, définis ou suggérés comme étant responsables de ces activités, sont des composés phénoliques ou apparentés (phénanthrènes de *J. maritimus*). Ceci suggère que la présence de composés phénoliques au

sein des halophytes peut être indicatrice de la présence d'un pouvoir antimicrobien chez ces plantes. Plusieurs études ont mis en évidence cette corrélation. Par exemple, différentes espèces d'halophytes (*Eryngium maritimum* (Apiacées), *Crithmum maritimum* (Apiacées) et *Cakile maritima* (Brassicacées)) au potentiel antimicrobien démontré sur différents types de pathogènes, sont riches en composés phénoliques (Meot-Duros et *al*., 2008).

Par contre, *Cirsium scabrum*, qui a montré l'activité cytotoxique la plus élevée, ne présente pas de pouvoir antioxydant particulièrement intéressant. Ainsi, *C. scabrum* rejoint diverses espèces du genre *Cirsium* connues pour leur pouvoir cytotoxique et antitumoral (*Cirsium japonicum* var. *ussuriense*, *Cirsium tenoreanum* ...) (Loizzo *et al.*, 2004).

Ce criblage initial nous a permis de mettre en exergue les potentialités biologiques de certaines des plantes halophytes et xérophytes testées en général pour la première fois. Cela nous a conduits ensuite à nous intéresser à leur composition chimique. Il a également mis en évidence des activités biologiques originales de molécules à potentiel très prometteur dans diverses applications en santé humaine et du végétal.

Limonium virgatum, une halophyte riche en substances antioxydantes et antibactériennes

Limonium virgatum est une halophyte de la famille des Plumbaginacées, qui est bien distribuée au nord et au centre de la Tunisie (Pottier-Alapetite, 1981). À notre connaissance, aucune étude du point de vue phytochimique et biologique n'a été réalisée sur cette plante. Nous avons montré que les extraits des tiges et des feuilles de *Limonium virgatum* présentent des activités anti-radicalaires intéressantes, en relation avec leur contenu en polyphénols, incluant les tanins. Ces résultats concordent avec les données de la littérature dans la mesure où la majorité des espèces du genre *Limonium* sont connues par leur grande richesse en flavonoïdes. De plus, certains auteurs ont signalé la présence de tanins dans les plantes du genre *Limonium* (Medini *et al*., 2011, 2014). L'activité antioxydante des polyphénols et des tanins est largement étudiée.

Les mécanismes d'actions de divers polyphénols sont bien caractérisés. D'une manière générale, les composés phénoliques sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants, mais aussi d'arrêter l'auto-oxydation par transfert d'hydrogène. Les polyphénols ont également un pouvoir chélateur des ions métalliques impliqués dans la production du radical hydroxyle selon les réactions de Fenton et Haber Weiss (Wang *et al*.,

2006). Ils sont aussi capables d'inhiber une large gamme d'enzymes génératrices de radicaux libres oxygénés.

Les extraits des tiges et des feuilles de *Limonium virgatum* ont montré également une activité antibactérienne à spectre assez large vis-à-vis de bactéries à Gram négatif et Gram positif. L'activité antibactérienne de certaines espèces de *Limonium* a déjà été soulignée. Des extraits de *L. densiflorum* et de *L. delicatulum* ont montré une activité antibactérienne contre des souches de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (Medini *et al.*, 2011, 2014). Ceci est en accord avec nos résultats puisque les extraits de *L. virgatum* ont montré également une activité antibactérienne contre ces souches. Une seule étude a évalué l'activité antibactérienne de composés purifiés d'une espèce de *Limonium* (*L. caspium*), toutefois, ces composés, incluant la myricétine et plusieurs de ses dérivés, n'ont montré aucune activité contre les souches de *Staphylococcus*, *Escherichia* et *Pseudomonas* (Gadetskaya *et al*., 2015).

Dans notre étude, avons suggéré que deux phénylpropanoïdes, dont l'un est le N-*trans*-feruloyl tyramine, seraient responsables de l'activité antibactérienne de *L. virgatum*. Les phénylpropanoïdes constituent une classe chimique abondante de métabolites secondaires dans le règne végétal. Ils protègent les plantes contre les stress biotiques et abiotiques. Différentes études ont montré le potentiel antimicrobien de certains phénylpropanoïdes (Kang *et al*., 1994 ; Laouer *et al*., 2009).

Par ailleurs, la richesse de *L. virgatum* en tanins peut aussi participer à son activité antibactérienne. En effet, les tanins sont bien connus pour avoir diverses activités antibactériennes. Les mécanismes d'action proposés comprennent, l'inhibition des enzymes microbiennes extracellulaires, la limitation des substrats nécessaires pour la croissance microbienne, mais aussi par une action directe sur le métabolisme microbien par l'inhibition de la phosphorylation oxydante (Fernández-Natal *et al.*, 2013).

Il est donc intéressant d'explorer davantage l'activité antibactérienne de *L. virgatum*.

Cirsium scabrum, une xérophyte dotée de potentialités cytotoxique et antibactériennes prometteuses

Cirsium scarbrum est une xérophyte de la famille des Asteracées qui a été localisée dans différentes régions du Nord de la Tunisie (Pottier-Alapetite, 1981).

Cirsium scabrum n'a pas été étudiée précédemment d'un point de vue phytochimique ou biologique. Au cours de ce travail, nous avons montré que l'extrait des feuilles de *C. scabrum* possède un pouvoir cytotoxique qui est sélectif envers la lignée de macrophages dérivée d'un réticulosarcome de souris (J774). Nous avons identifié un mélange indissociable (1:1) de deux triterpènes de type cycloartane hydroperoxydés (25-hydroperoxycycloart-23-en-3*ß*-ol et 24-hydroperoxycycloart-25-en-3*β*- ol) comme étant responsables en partie de cette activité. Des tentatives pour séparer les 2 composés n'ont pas abouti car les produits séparés finissent toujours par se dégrader. Lee *et al.* (2002) ont isolé ces composés à partir d'une autre espèce de *Cirsium*, *C. setidens*, et ont mis en évidence leur activité antiproliférative sur des lignées cellulaires cancéreuses ovariennes ainsi que sur des mélanomes (DE_{50} = 4,24 et 2,66 µM, respectivement).

L'activité cytotoxique de *Cirsium scabrum*, se trouve aussi associée à la présence d'un autre triterpène, le lupeol. Ce composé est largement distribué dans diverses familles botaniques. Plusieurs études suggèrent que le lupéol possède un large éventail d'activités biologiques, y compris anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antiprotozoaires, anti-cholestérolémiantes, et notamment antiprolifératives (Wal *et al.*, 2015). Le lupéol est aussi capable de moduler différents mécanismes moléculaires contribuant au développement de certains mélanomes (Gajos-Michniewicz et Czyz, 2016 ; Stricklanda et al., 2015).

D'autre part, nous avons montré que l'extrait des feuilles de *Cirsium scabrum* possède un pouvoir antibactérien contre 6 souches de *Staphylococcus aureus* et 2 souches de *Dermabacter hominis*. Cette activité serait liée à une présence de flavones glycosylées : un mélange (3:1) de la lutéoline 7-*O*-*β*-D-glucuronide et de la lutéoline 7-*O*-*β*-D-glucoside ; et l'apigénine 7-*O*-*β*-D-glucuronide.

Il n'y a pas beaucoup de données dans la littérature concernant l'activité antibactérienne de la lutéoline 7-*O*-*β*-D-glucuronide et de l'apigénine 7-*O*-*β*-D-glucuronide. Certaines espèces de plantes contenant ces deux flavones ont montré une activité antibactérienne contre certaines bactéries à Gram positive et Gram négative, y compris sur des souches de *Staphylococcus*

aureus (Salawu *et al.*, 2010 ; Moussaoui *et al.*, 2011) Concernant la lutéoline 7-*O*-*β*-D-glucoside, il a été démontré qu'elle possède une activité antibactérienne spécialement contre les bactéries à Gram négative (Žemlicka *et al.*, 2011). Bien que le mécanisme d'action de ces hétérosides n'a pas été bien définie, l'action des génines est, quant-à-elle, bien caractérisée contre *Staphylococcus aureus*. L'apigénine peut considérablement diminuer la production de l'α-hémolysine dans *S. aureus*, et ceci à de faibles concentrations (Dong *et al.*, 2013). L'apigénine est également capable de diminuer les taux de cytokines et d'atténuer les lésions du tissu pulmonaire dans le cas de pneumonies liées à *S. aureus*. En ce qui concerne la lutéoline, Wang *et al.* (2010) ont suggéré que cette flavone pourrait inhiber l'activité de l'ADN topoisomérase I et II, ce qui entraîne une diminution de la synthèse des acides nucléiques et des protéines. Une étude récente qui a analysé le mécanisme d'action de la lutéoline contre des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline (SARM) (Joung *et al.*, 2016), a montré qu'elle agit en synergie en augmentant la perméabilité de la membrane cytoplasmique et en inhibant les ATPases. L'étude suggère également l'existence d'une interaction directe entre la lutéoline et le constituant principal de la paroi cellulaire de *S. aureus*.

Concernant l'activité antibactérienne de *C. scabrum* sur les 2 souches de *Dermabacter hominis*, il n'existe pas de données dans la littérature concernant ce type d'activité des flavones identifiées. De plus, les données sur l'activité de biomolécules végétales contre des souches de *D. hominis* sont rares. D'où l'intérêt d'analyser davantage l'activité des flavones de *C. scabrum* sur *D. hominis*.

Juncus maritimus, un véritable réservoir en composés bioactifs

Juncus maritimus est une halophyte de la famille des Juncacées qui est bien répandue dans les régions côtières de la Tunisie. À notre connaissance, la majorité des études relatives à *J. maritimus* concernent peu ou pas les aspects phytochimiques et biologiques. Dans notre travail, nous avons montré que l'extrait des rhizomes de *J. maritimus* possède un large éventail d'activités biologiques, qui, pour la plupart, se sont montrées originales.

- une activité anti-radicalaire modérée,
- une activité originale contre la réplication du virus de l'hépatite C,

- une activité antibactérienne spécifique d'un certain groupe de bactéries à Gram positif (particulièrement sur une souche de *Streptococcus dysgalactiae* et sur différentes souches de *Streptococcus pyogenes*),
- une activité antifongique marquée contre *Zymoseptoria tritici* (pathogène de la septoriose du blé).

La lutéoline, responsable, de l'activité anti-radicalaire de *J. maritimus*

Une flavone, la lutéoline (figure 38) a été déterminée comme étant le composé responsable de l'activité anti-radicalaire des rhizomes de *J. maritimus*. La lutéoline est synthétisée par de nombreuses plantes. Elle est largement connue pour diverses activités biologiques, notamment pour son pouvoir antioxydant. Il a été montré que le noyau B est le pharmacophore responsable de son activité antioxydante (Leopoldini et Russo, 2011).

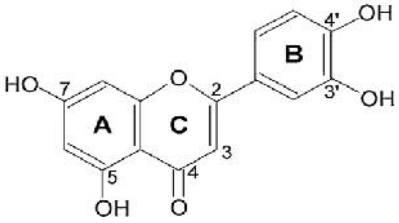


Figure 38. Structure chimique de la lutéoline

Dans le genre *Juncus*, la lutéoline a été identifiée chez différentes espèces : dans les parties aériennes de *J. acutus* et *J. rigidus* ainsi que dans les rhizomes de *J. subulatus* (Mansour *et al.*, 1986 ; Abdel-Razik *et al.*, 2009 ; Abdel-Mogib, 2001 ; Shan *et al.*, 2008). Chez *J. subulatus*, un fractionnement bioguidé a permis d'identifier la lutéoline comme étant la plus active parmi les 7 flavonoïdes isolés, avec une CI_{50} à 4,98 µg/mL (Abdel-Razik *et al.*, 2009).

Le dehydrojuncusol, un nouvel inhibiteur de la réplication du virus de l'hépatite C

Nous avons montré que le dehydrojuncusol (figure 39), un dehydrophénanthrène, est capable d'inhiber la réplication du VHC, d'une manière remarquable, avec une CE_{50} proche de 1 µM, à la fois dans le système VHCcc, et dans les PHH. En effet, il est assez rare qu'un composé d'origine naturelle soit à la fois actif *in vitro*, et sur un modèle pré-clinique humain (PHH), et en même temps dénué de toxicité.

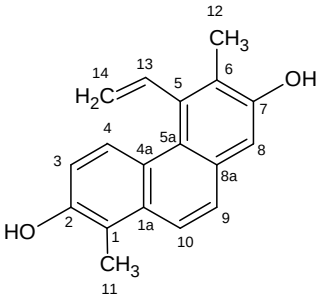


Figure 39. Structure chimique du dehydrojuncusol

De plus, il agit sur les premières étapes de l'infection par les particules virales. Cette capacité, n'est probablement pas due à une inhibition de l'entrée du VHC, car cette molécule n'est pas active sur VHCpp. Il est donc probable que le dehydrojuncusol qui entre dans les cellules pendant l'inoculation virale, reste piégé à l'intérieur et peut par la suite inhiber la réplication du VHC.

L'action inhibitrice du dehydrojuncusol sur la réplication du VHC aurait pour cible la protéine NS5A, avec une résistance partielle au double mutant T24S-L31M, et au mutant NS5A Y93H. Cette résistance partielle suggère que le mécanisme d'action du dehydrojuncusol sur NS5A est probablement différent de celui du daclatasvir (résistant au mutant NS5A Y93H).

Le dehydrojuncusol inhibe efficacement la réplication du mutant résistant au daclatasvir (NS5A L31M) retrouvé chez les patients traités. Les cas d'échecs de traitements avec le daclatasvir observés chez les patients, sont de 63% pour la mutation L31M. La double mutation de NS5A qui est résistante au dehydrojuncusol (T24S-L31M) est rarement retrouvée chez les patients traités. En ce qui concerne le mutant NS5A Y93H, il est responsable de l'échec de la thérapie pour 14% des patients.

Il n'existe pas d'études de biodisponibilité dans la littérature pour ce composé dans des modèles animaux ou chez l'Homme. De plus, des études de pharmacocinétique (*in vivo* ou chez l'Homme) d'autres dérivés phénanthrèniques sont peu ou pas disponibles. Ces données sont importantes à prendre en compte dans le cas d'essais cliniques. Cette molécule devra donc être étudiée davantage si on souhaite une utilisation thérapeutique chez les patients résistants à la thérapie conventionnelle, mais aussi chez certains patients issus de pays en développement. Pour ces populations, l'utilisation d'un extrait de la plante standardisé en dehydrojuncusol pourrait aussi avoir un intérêt.

Le juncunol, un agent antibactérien prometteur contre des souches de *Streptococcus pyogenes* résistantes à l'amoxicilline

Le sous-extrait dichlorométhane des rhizomes de *J. maritimus* s'est distingué par des activités antibactériennes élevées sur *Streptococcus dysgalactiae* T46C14 (isolée d'une ostéite), et sur différentes souches de *Streptococcus pyogenes* (isolées soit d'une ostéite ou soit d'une hémoculture). Ces dernières se sont montrées résistantes à l'amoxicilline, contrairement à *S. dysgalactiae* qui est sensible à divers antibiotiques. La pénicilline ou l'un de ses dérivés (par

exemple, l'amoxicilline) constituent le traitement antibiotique recommandé pour les patients non-allergiques diagnostiqués avec des infections par *S. pyogenes* et *S. agalactiae*. Ces souches sont en général non résistantes aux pénicillines (Frieden, 2013).

Streptococcus pyogenes (streptocoque du groupe A) est une bactérie pathogène strictement humaine connue depuis longtemps. La particularité de cette bactérie provient de son pouvoir pathogène aux multiples facettes. En effet, *S. pyogenes* peut causer une large variété d'infections allant d'infections localisées non-compliquées (pharyngites aiguës, infections cutanées superficielles,…) à des infections invasives pouvant engager le pronostic vital (Billon, 2014). Différents polyphénols sont capables d'agir suivant différentes modalités contre *S. pyogenes*. Par exemple, des prodelphinidines possèdent une propriété non-adhésive spécifique à *S. pyogenes* (Janecki *et al.,* 2010 ; Janecki *et al.,* 2011) ; un flavonol (la morine), est capable de réduire la formation de biofilms de *S. pyogenes* (Green *et al.,* 2012).

Nous avons ainsi mis en évidence le pouvoir antibactérien marqué du juncunol (figure 40), un autre dehydrophénanthrène, contre *S. pyogenes* 16135, souche sur laquelle le sous-extrait dichlorométhane des rhizomes de *J. maritimus* était la plus active. A notre connaissance, il n'existe pas d'études concernant le potentiel antibactérien du juncunol.

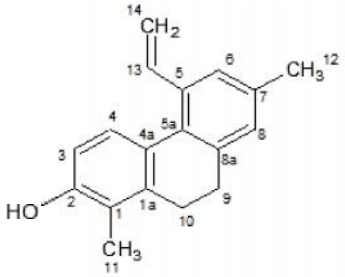


Figure 40. Structure chimique du juncunol

Les quelques études trouvées dans la littérature montrent qu'il présente une cytotoxicité sélective in *vitro* vis-à-vis de diverses lignées cellulaires cancéreuses humaines (Rodrigues *et al.*, 2014), et sur une microalgue (*Selenastrum capricornutum*) (DellaGreca *et al.*, 2004). Il présente aussi une activité antiparasitaire (*Trypanosoma cruzi*) (Oliveira *et al.*, 2016) et neuroprotectrice (inhibition de la cholinestérase) (Rodrigues *et al.*, *in press*). De plus, peu ou pas d'études existent sur l'activité des phénanthrènes sur *S. pyogenes*.

Il convient de signaler que le juncusol, qui était moins actif que le juncunol sur *Streptococcus pyogenes* (16135), a montré une activité spécifique à des bactéries à Gram + (Chapatwala *et al.*, 1981). Il est donc très intéressant d'explorer davantage l'activité du juncunol sur la collection de souches de *S. pyogenes* résistantes à l'amoxicilline. Déterminer son mécanisme d'action donnera accès à une meilleure compréhension de la pathogénicité de *Streptococcus pyogenes* qui, bien que particulièrement étudiée, demeure encore loin d'être complètement élucidée.

L’effusol, au service de la bioprotection des cultures de blé contre la septoriose

Nous avons montré que l’extrait des rhizomes de *Juncus maritimus* présente l’activité contre *Zymoseptoria tritici* la plus élevée lorsqu’il peuple un écosystème particulièrement salin (sebkha), en comparaison avec d’autres écosystèmes moins salins.

De plus, les profils chimiques des extraits de rhizomes sont différents d’un écosystème à un autre, révélant une biosynthèse accentuée pour certains composés en cas de salinité élevée. Ceci est particulièrement vrai pour un phénanthrène, l’effusol (figure 41). Nous avons mis en évidence son activité antifongique contre *Zymoseptoria tritici*.

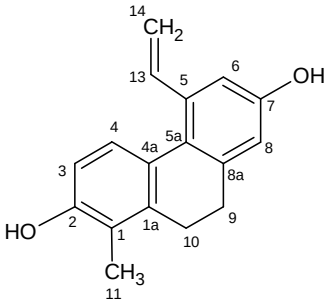


Figure 41. Structure chimique de l’effusol

D’une manière générale, la distribution et la composition des composés phénoliques au sein des plantes peuvent être affectées par les teneurs en sels du milieu sur lequel ces plantes vivent. Ainsi, plus la salinité est élevée, plus les teneurs en composés phénoliques sont importantes (Lim *et al*., 2012). Ceci a été confirmé par les travaux de Mehr *et al*. (2012) portant sur les pousses et les racines d’une halophyte *Anethum graveolens* (Apiacées). Ils ont prouvé que la culture de cette plante dans un milieu contenant 100 mM de NaCl est capable de quadripler le contenu phenolique dans les racines et de le tripler au niveau des pousses. Cet enrichissement en polyphénols totaux est un mécanisme d’adaptation des plantes à la salinité car les composés phénoliques améliorent les effets ioniques de NaCl dans les tissus (Parida *et al*., 2004).

Concernant l'activité antifongique de l’effusol, aucune donnée n’existe dans la littérature. Les quelques études sur le potentiel biologique de l’effusol ont mis en évidence des activités cytotoxiques, anxiolytiques et sédatives (Ishiuchi *et al.*, 2015 ; Wang *et al*, 2011). En outre, il n’y a pas d’études dans la littérature sur l'activité contre *Z. tritici*, pour *J. maritimus*, ni pour d’autres espèces du genre *Juncus*. En revanche, certaines études ont mis en évidence le potentiel antimicrobien de certaines espèces de *Juncus* et l'implication de certains dihydrophénanthènes dans cette activité (El-Shamy *et al.*, 2015). Les phénanthrènes sont déjà connus pour être des phytoalexines dans certaines familles de plantes telles que les Orchidacées (Kovács, 2008).

Les moyens de contrôle usuels de *Zymoseptoria tritici* sont essentiellement chimiques. Sous la pression conjuguée d’une réglementation plus restreinte et des actions en faveur de

l'environnement, une stratégie raisonnée moins dépendante des fongicides synthétiques est en train de se développer. Dans la lutte biologique contre la septoriose, seul la laminarine (Vaccipant®, Goëmar, France), un polysaccharide de faible poids moléculaire dérivé d'une algue *Laminaria digitata*, est enregistrée en France comme inducteur de la résistance du blé à *Z. tritici*. Etudier davantage l'effet de l'effusol sur la septoriose du blé devient donc très intéressant. Ceci permettra, d'une part, de contribuer à la compréhension de l'effet de la salinité sur le changement du profil chimique chez les halophytes. D'autre part, pour une éventuelle introduction sur champ de ce phénanthrène, différentes analyses sont nécessaires, notamment de déterminer à quel niveau du cycle biologique de *Z. tritici* il est le plus actif, mais aussi de vérifier sa biodisponibilité et son éventuelle toxicité sur le blé.

Perspectives. Nous avons montré que les halophytes et les xérophytes sont un véritable réservoir en biomolécules qui devraient bénéficier d'une plus grande attention par le monde de la recherche dans le domaine des substances naturelles. L'exploitation de ressources végétales identifiées dans ce travail, notamment *Juncus maritimus*, vers une perspective de conception de médicaments ou de formulation de biofongicides est envisageable, en prenant en compte la large distribution de cette plante, aussi bien sur le territoire tunisien, que dans d'autres parties du monde. La présence des molécules bioactives dans *J. maritimus* et dans les parties aériennes de diverses autres espèces de *Juncus* plaide en faveur de la valorisation économique de ces molécules. Cependant, les parties de la plante les plus actives de *J. maritimus* sont les rhizomes, organes par lesquels la plante se propage. Cultiver des espèces de *Juncus* ne constitue pas une aberration sur le plan cultural ; bien au contraire, cette stratégie est bien établie depuis le XX^{e} siècle dans le delta du Nil en Egypte, où on cultivait à petite échelle des espèces de *Juncus* pour la production de nattes (Brink *et al.,* 2012). Des stratégies de synthèse chimique peuvent aussi êtres envisagées, notamment pour le juncunol dans la mesure où un protocole de synthèse de cette molécule est déjà prédéfini (Cossey *et al.,* 1980), mais aussi pour le dehydrojuncusol, qui peut être hémi-synthétisé par la conversion du juncusol dont la méthode de synthèse est bien décrite (McDonald et Martin, 1978). Une autre alternative serait d'envisager l'utilisation des biotechnologies végétales.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abd El Raheim D M (2013) Phytochemical content and antibacterial activity of atriplex nummularia extracts, International Journal of Biology, *Pharmacy and Allied Sciences*, 2(6), 12601269.

Abdel-Mogib M (2001) New 9,10-dihydrophenanthrene derivative from two Juncus species. *Alexandria J. Pharm. Sci*, 15, 13–15.

Abdel-Razik A F, Elshamy A I, Nassar M I, El-Kousy S M, Hamdy H (2009) Chemical constituents and hepatoprotective activity of *Juncus subulatus*. *Rev. Latinoamer. de Quim*, 37 (1), 70–84.

Agrios G N (2005) Plant Pathology, *Elsevier Academic Press*, Burlington (MA), USA, 5 édition.

Aguilera-Carbo A, Augur C, Prado-Barragan L A, Favela-Torres E, Aguilar C N (2008) Microbial production of ellagic acid and biodégradation of ellagitannins, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 189-199.

Alekshun M N, Levy S B (2007**)** Molecular mechanism of antibacterial multidrug resistance, *Cell*, 128, 1037-1050.

Andres A, Donovan S M, Kuhlenschmidt M S (2009) Soy isoflavones and virus infections, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20, 563-569.

Aniya Y, Miyagi C, Nakandakari A, Kamiya S, Imaizumi N, Ichiba T (2002) Free radical scavenging action of the medicinal herb Limonium wrightii from the Okinawa islands, Phytomedicine, 9, 239–244.

Avaz S, Korcan S E, Kargioglu M, Serteser A, Konuk M, Erol I (2013) Antimicrobial activities in root extracts of Limonium spp. growing in Afyonkarahisar, Turkey, *J Environ Biol*, 34(3), 561-8.

Bailey L H (1977) Manual of Cultivated Plants, Macmillan, *New York*, p 786.

Barhoumi Z, Djebali W, Smaoui A, Chaibi W, Abdelly C (2007) Contribution of NaCl excretion to salt resistance of *Aeluropus littoralis* (Willd) Parl, *J Plant Physiol*, 164(7), 842-50.

Baysal-Gurel F, Miller S A (2015) Management of powdery mildew in greenhouse tomato production with biorational products and fungicides, *Sci Hortic 1069*, 179–184.

Behery F A, Naeem Z E, Maatooq G T, Amer M M, Wen Z H, Sheu J H, Ahmed A F (2007) Phenanthrenoids from *Juncus acutus* L. new natural lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase inhibitors, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 55(8), 1264-6.

Bellakhdar J (1978) Médecine traditionnelle et toxicologie ouest-sahariennes: contribution à l'étude de la pharmacopée marocaine. Éditions techniques nord-africaines, 357 pp.

Benaissa O, Amrani A, Bicha S, Zama D, Benayache F, Marchioni E, Benayache S (2013) Free radical scavenging action of phenolic compounds from *Limonium Bondueli* (Plumbaginaceae), *Der Pharmacia Lettre 01*, 5(5), 234-240.

Billon L (2014) Etude épidémiologique des infections invasives et non invasives à *Streptococcus pyogenes* au CHU de Toulouse (2009-2013) : relations entre facteurs de virulence des souches, pr_esentation clinique et issue des cas. Sciences pharmaceutiques. *Thèse de doctorat.*

Bohm B A, Stuessy T F (2001) Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae), *Springer*, p.831.

Bouaziz M, Dhouib A, Loukil S, Boukhris M, Sayadi S (2009) Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts of some wild plants collected from the south of Tunisia, *African Journal of Biotechnology*, 8(24), 7017-7027.

Brink M, Achigan-Dako E G (2012) Plantes à fibres, *Ressources végétales de l'Afrique Tropicale*, Fondation PROTA/CTA, 319, 659 pages.

Bruneton J (2008) Pharmacognosie (4° Éd.) Phytochimie - Plantes médicinales, *Tec and Doc, Lavoisier, Paris.* 1269pp.

Bruneton J (2015) Pharmacognosie (5° Éd.) Phytochimie - Plantes médicinales, *Tec and Doc, Lavoisier, Paris.* 1504pp.

Brzozowska J, Hanower P (1976) Sur les composes phénoliques des vegetaux et leur rapport avec un deficit hydrique chez des cotonniers, *Annales de l'Université d'Abidjan, série C Sciences*, *tome XII*, p.65-87

Calland N (2012 a) L'EGCG et la delphinidine: deux nouvelles molécules naturelles inhibant l'entrée du virus de l'hépatite C, *Thèse de doctorat de l'Université Lille 2.*

Calland N, Dubuisson J, Rouillé Y, Séron K (2012b) Hepatitis C Virus and Natural Compounds: A New Antiviral Approach, *Viruses*, *4*, 2197-2217

Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández M L, Páez-Hernández M E, Rodríguez J A, Galán-Vidal C A (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review, *Food Chemistry*, 113, 859-871.

Chabani S, Haba H, Lavaud C, Benkhaled M, Harakat D (2013) Flavonoid glycosides and triterpenoids from *Atractylis flava*, *Phytochemistry Letters*, 6(1), 9–13.

Chanwitheesuk A, Teerawutgulrag A, Kilburn J D, Rakariyatham N (2007) Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk, *Food Chemistry,* 100 (3), 1044-1048.

Chapatwala K D, de la Cruz A A, Miles D H (1981) Antimicrobial activity of juncusol, a novel 9,10-dihydrophenanthrene from the marsh plant Juncus roemerianus, *Life Sci*, 29, 1997–2001.

Chehma A (2006) catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien, *Edition Dar Elhouda, AM mlila*.

Chiang L C, Chiang W, Chang M Y, Ng L T, Lin C C (2002) Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds in vitro, *Antiviral Res*, 55, 53–62.

Chikhi I, Allali H, Dib M A, Medjdoub H, Tabti B (2014) Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of A triplex halimus L . (C henopodiaceae) in streptozotocin-induced diabetic rats, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(3), 181-184.

Clifford M N (1999) Appendix 1. A nomenclature for phenols with special reference to tea, *Washington, DC, CRC Press, Boca Raton Florida*, 41 (5), 393-397.

Conrad J, Vogler B, Klaiber I, Roos G, Walter U, Kraus W (1998) Two triterpene esters from *Terminalia macroptera* bark, *Phytochemistry*, 48, 647-650.

Corbaz R (1990) Principes de Phytopathologie et de Lutte Contre les maladies des plantes, 1ère édition, *Press Polytechniques et Universitaires Romandes*, p 286.

Cossey A L, Gunter M J and Lewis N (1980) Juncunol : revision of structure and synthesis, *Qtrahedron Lettere*, 21, 3309 - 312.

Cowan M M (1999) Plant products as antimicrobial agents, *Clinical Microbiology Reviews,* 12, 564-582.

Daglia M (2011) Polyphenols as antimicrobial agents, *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 1-8.

Dayan F E, Cantrell C L, Duke S O (2009) Natural products in crop protection, Bioorg Med Chem, 17, 4022–4034.

De Rijke E, Out P, Niessen W M A, Ariese F, Gooijer C, Brinkman U A T (2006) Analytical separation and detection methods for flavonoids, *Journal of Chromatography A*, 1112, 31 – 63.

Dellagreca, M., Fiorentino, A., Molinaro, A., Monaco, P., Previtera, L., 1992. 9,10-Dihydrophenanthrene metabolites from Juncus effusus L. Tetrahed. Lett. 33, 5257–5260.

Dellagreca M, Fiorentino A, Mangoni A, Molinaro A, Monaco P, Previtera L (1993) A bioactive dihydrodibenzoxepin from Juncus effuses, *Phytochemistry*, 34 (4), 1182–1184.

Dellagreca M, Previtera L, Fiorentino A, Monaco P, Zarrelli A (1995) Effusides I-V: 9,10-dihydrophenanthrene glucosides from Juncus effuses, *Phytochemistry*, 40, 533–535.

Dellagreca M, Fiorentino A, Monaco P, Previtera L, Sorrentino M (1998) Antialgal Phenylpropane Glycerides from Juncus effuses, *Nat. Prodt*. Res, 12 (4), 263–270.

Dellagreca M, Fiorentino A, Monaco P, Previtera L, Zarrelli A (2002) Phenanthrenoids from the wetland Juncus acutus, *Phytochemistry*, 60, 633–638.

Dellagreca, M., Isidori, M., Lavorgna, M., Monaco, P., Previtera, L., Zarrelli, A., 2004. Bioactivity of phenanthrenes from *Juncus acutus* on Selenastrum capricornutum. J. Chem. Ecol. 30, 867–879.

Dellagreca M, Previtera L, Zarrelli A (2005) Dimeric phenanthrenoids from Juncus acutus, *Nat Prod Res*, 19(1), 69-74.Boulos L. (1983). ''Medicinal plants of North Africa'', Ref. Publication, Inc.,98.

Demidchik V (2015) Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology, *Environmental and Experimental Botany*, 109, 212-228.

Demirtas I, Tufekci A R, yaglioglu A S et al (2017) "Studies on the antioxidant and antiproliferative potentials of *Cirsium arvense* subsp, Vestitum, *Journal of Food Biochemistry*, vol.41, e12299.

Dhouha N S, Bouzidi A, Boussaada O, Helal A N , Mahjoub M A, Echafai N , Mighri Z (2014) The antioxidant and free-radical scavenging activities of *tamarix boveana* and *suaeda fruticosa* fractions and related active compound, *European Scientific Journal*, 10, (18), 1857-7431.

Dong J, Qiu J, Wang J (2013) Apigenin alleviates the symptoms of *Staphylococcus aureus* pneumonia by inhibiting the production of alpha-hemolysin, *FEMS Microbiology Letters*, 338, 124–131.

Duncan K E, Howard R J (2000) Cytological analysis of wheat infection by the leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*, *Mycological Research*, 104(9), 1074–1082.

Elhawary S S, El Tantawy M E, Sleem A A, Abdallah H M, Mohamed N M (2011) Investigation of Phenolic Content and Biological Activities of Scabiosa atropurpurea L, *World Applied Sciences Journal*, 15 (3), 311-317.

El-Shamy A I, Abdel-Razek A F, Nassar M I (2012) Phytochemical review of Juncus L. genus (Fam.Juncaceae), *Arabian Journal of Chemistry*. 8,(5), 614–623

Falconner S B, Brown E D (2009) New screens and targets in antibacterial drug discovery, *Curr. Opinion Microbiol.* 12, 497-504.

Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba, M, Abdelly C (2008) Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities, *C R Biol*, 331, 372–379.

Falleh H, Ksouri R, Oueslati S, Guyot S, Magné C H, Abdelly C H (2009) Interspecifique variability of antioxidant activities and phenolic composition in *Mesembryanthemum* genus, *Food and Chemical Toxicology*, 47 (9), 2308-2313.

Feng X, Wang X, Liu Y, Di X (2015) Linarin Inhibits the Acetylcholinesterase Activity In-vitro and Ex-vivo, *Iran J Pharm Res*,14(3),949-54.

Fernández-Natal I, Sáez-Nieto J A, Medina-Pascual M J (2013) *Dermabacter hominis*: a usually daptomycin-resistant gram-positive organism infrequently isolated from human clinical samples, *New Microbes and New Infections*, 1,(3), 35–40.

Ferrazzano G F, Amato I, Ingenito A, Zarrelli A, Pinto G, Pollio A (2011) Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties: A Review, *Molecules*, 16, 1486-1507.

Fitt B D L, McCartney H A, Walklate P J (1989) The role of rain in dispersal of pathogen inoculum, *Annual Review of Phytopathology*, 27(1), 241–270.

Fogliani B (2002) De la connaissance physiologique des Cunoniaceae endémiques de la nouvelle-Calédonie, à la recherche des caractéristiques physico-chimiques et biologiques de leurs substances bioactives d'intérêt. Thèse de Doctorat en physiologie végétale et phytochimie, pp 42-52.

Fones H, Gurr S (2015) The impact of *Septoria tritici blotch* disease on wheat: an EU perspective, *Fungal Genet Biol*, 79, 3–7.

Fournet J (1969) Propriétés et rôle du cirrhe du *Septoria nodorum* berk, *Annales de Phytopathologie*, 1, 87–94.

Fried M W, Navarro V J, Afdhal N, Belle S H, Wahed A S, Hawke R L, Doo E, Meyers C M, Reddy K R (2012) Silymarin in NASH and C Hepatitis (SyNCH) Study Group Effect of silymarin (milk thistle) on liver disease in patients with chronic hepatitis C unsuccessfully treated with interferon therapy: a randomized controlled trial, *JAMA*, *308*, 274–282.

Frieden T (2013) Antibiotic Resistance Threats in the United States, *Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta, GA, USA*,11–93.

Fujita M, Shiota S, Kuroda T, Hatano T, Yoshida T, Mizushima T, Tsuchiya T (2005) Remarkable synergies between baicalein and tetracycline and baicalein and ß-lactams against methicillin-resistan, *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Immunol,* 49, 391-396.

Gadetskaya A V, Tarawneh A H, Zhusupova G E, Gemejiyeva N G, Cantrell C L, Cutler S J, and Ross S A (2015) Sulfated phenolic compounds from *Limonium caspium*: Isolation, structural elucidation, and biological evaluation., *Fitoterapia*, 104, 80–85.

Gajos-Michniewicz A and M. Czyz (2016) Modulation of WNT/ß-catenin pathway in melanoma by biologically active components derived from plants, *Fitoterapia*, 109, 283-292.

Ghedira K (2005) Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique, *Phytothérapie*, 4, 162-169.

Gigot C (2013), Potentialités des associations de variétéz pour limiter la progression épidémique de la septoriose du blé : rôle des mécanismes de dispersion des spores par la pluie dans un couvert végétal hétérogène, *Thèse de doctorat, AgroParisTech*.

Gordon A, Hobbs D A, Bowden D S, Bailey M J, Mitchell J, Francis A J P, Roberts S K (2012) Effects of Silybum marianum on serum hepatitis C virus RNA, alanine aminotransferase levels and well-being in patients with chronic hepatitis C, *J. Gastroenterol. Hepatol, 21*, 275–280

Green A E, Rowlands R S, Cooper R A, Maddocks S E (2012) The effect of the flavonol morin on adhesion and aggregation of *Streptococcus pyogenes*, *FEMS Microbiol. Lett*, 333, 54–58.

Guarrera P M (2005) Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium), *Fitoterapia*, 76, 1–25

Haghighi L, Majd A, Nematzadeh G, Shokri M, Kelij S, Irian S (2013) Effect of NaCl on antioxidant enzymes and protein profile in halophyte *Aeluropus littoralis* leaves, *Advances in Environmental Biology*, 7(9), 2229 – 2234.

Hamilton-Miller J M T (2004) Antibiotic resistance from two perspectives: man and microbe, *International Journal of Antimicrobial Agents,* 23(3), 209-212.

Han D (2014) Identification des stratégies collectives pour une utilisation durable des fongicides : le cas de la septoriose du blé en France, *Thèse de doctorat, Institut National de la Recherche Agronomique de Montpellier*.

Hand W D (1980) American Folk Medicine: A Symposium, *University Of California Press*, 216.

Hanna A G, Soliman H S M (1992) Fatty acids and sterols analysis of *Silene succulenta* Forssk, *Egyptian Journal of Food Science*, 20(3), 417-22.

Harborne (1999) The Handbook of Natural Flavonoids, *Wiley*, 1800pp

Hatano T, Tsugawa M, Kusuda M, Taniguchi S, Yoshida T, Shiota S, Tsuchiya T (2008) Enhancement of antibacterial effects of epigallocatechin gallate, using ascorbic acid, *Phytochemistry*, 69, 3111–3116.

Hawke R L, Schrieber S J, Soule T A, Wen Z, Smith P C, Reddy K R, Wahed A S, Belle S H, Afdhal N H, Navarro V J *et al* (2010) SyNCH Trial Group Silymarin ascending mult iple oral dosing phase I study in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C*, J. Clin. Pharmacol, 50*, 434–449.

Huraux J M, Agut H, Nicolas J C *et al*. Traité de virologie Médicale : *Flaviridae* Virus de l'Hépatite C et Virus GB-C (GVB-C), Paris : ESTEM, 2003. 699 p.

Ignat I, Volf I, Popa V I (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food Chemistry*, 126, 1821-1835.

Ishiuchi K, Kosuge Y, Hamagami H, Ozaki M, Ishige K, Ito Y, Kitanaka S (2015) Chemical constituents isolated from *Juncus effusus* induce cytotoxicity in HT22 cells. *J Nat Med.*, 69,(3),421-6.

Janecki A, Kolodziej H (2010) Anti-adhesive activities of flavan-3-ols and proanthocyanidins in the interaction of group a-streptococci and human epithelial cells. *Molecules*, 15, 7139–7152.

Janecki A, Conrad A, Engels I, Frank U, Kolodziej H (2011) Evaluation of an aqueous-ethanolic extract from *pelargonium sidoides* (EPs®7630) for its activity against group A-streptococci adhesion to human HEp-2 epithelial cells, *J. Ethnopharmacol*, 133, 147–152.

Jannesar M, Razavi K, Saboora A (2014) Effects of salinity on expression of the salt overly sensitive genes in *Aeluropus lagopoides*, *Australian Journal of Crop Science*, 8(1), 1 – 8.

Jenis J, Burasheva G Sh, Hajiakber A, Usmanova S K, Abilov Z A (2009) Chemical constituents of the aerial parts of *Atriplex tatarica*, *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*, 21(5), 782-783. 857.

Jersh, S, Scherer C, Huth G, Schlosser E (1989) Proanthocyanidins as basis for quiescence of *Botrytis ciberea* in immature strawberry, *Journal of Plant pathology*, 22, 6770.

Jess S, Kildea S, Moody A, Rennick G, Murchie A K, Cooke L R (2014) European Union policy on pesticides: implications for agriculture in Ireland, *Pest Manag Sci*, 70, 1646–1654.

Jordon-Thaden I E, Louda S M (2003) Chemistry of Cirsium and Carduus: A role in ecological risk assessment for biological control of weeds, *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(12), 1353-1396.

Joung D K, Lee Y S, Han S H (2016) Potentiating activity of luteolin on membrane permeabilizing agent and ATPase inhibitor against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus,*" *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9,(1),19–22.

Jurgens A, Witt T, Gottsberger G (2002) Flower scent composition in night-flowering Silene species (Caryophyllaceae), *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(5).

Kandil F E, Ahmed K M, Hussieny H A, Soliman A M (2000) A new flavonoid from *Limonium axillare*, *Arch Pharm (Weinheim)*, 333(8).

Kang K H, Jang S K, Kim B K, Park M K (1994) Antibacterial phenylpropanoid glycosides from *Paulownia tomentosa Steud, Arch Pharm Res*, 17(6), 470-5.

Karawya M S, Elgamal M H A, Shalaby N M M, Soliman H S M, Duddeck H (1991) Saponins of Silene succulenta Forssk, *Grown Locally Egypt J. Pharm. Sci*, 32, 879.

Kema, G H J, Yu D, Rijkenberg F H J, Shaw M W, Baayen R P (1996) Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat, *Phytopathology*, 86(7), 777–786.

Khramova D S, Golovchenko V V, Shashkov A S et al (2011) "Chemical composition and immunomodulatory activity of a pectic polysaccharide from the ground thistle *Cirsium esculentum Siev*, *Food Chemistry*, vol. 126, pp. 870–877.

Kovács A, Vasas A, Hohmann J (2008) Natural phenanthrenes and their biological activity, *Phytochemistry*,69(5):1084-110

Ksouri R, Falleh H, Megdiche W, Trabelsi N, Mhamdi B, Chaieb K, Bakrouf A, Magné C H, Abdelly C (2009) Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte

Tamarix gallica L. and related polyphenolic constituents, *Food and Chemical Toxicology,* 47, 2083-2091.

Ksouri R, Megdiche W, Jallali I, Debez D, Magné M, Hiroko I, Abdelly C H (2012) Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications, *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(4),289-326.

Kursanov A L (1952) Sintez iprevrashtcheniya dubilnykh veshtchestv v tchaynom rastenii VI1 Bakhovskoe tchtenie, *Izd. Nauka. Moscou*.

Lahsissene H, Kahouadji A, Tijane M, et Hseini S (2009) Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc occidental). *Lejeunia*, BE ISSN 0457-4184.

Laouer H, Meriem E K, Prado S, Baldovini N (2009) An antibacterial and antifungal phenylpropanoid from Carum montanum(Coss. Et Dur) Benth. Et Hook, *Phytotherapy Res*, ,23, 1726–1730.

Lattanzio V, Di Venere D, Linsalata V, Lima G, Ippolito A, Salerno M (1996) Antifungal activity of 2,5-dimethoxybenzoic acid on postharvest pathogens of strawberry fruits, *Postharvest Biology and Technology*, 9, 325-334.

Lattanzio V, Di Venere D, Linsalata V, Bertolini P, Ippolito A, Salerno M (2001) Low temperature metabolism of apple phenolics and quiescence of *Phlyctaena vagabunda*, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 5817-5821.

Lavanchy D (2011) Evolving epidemiology of hepatitis C virus, *Clinical Microbiology and infection,* 17(2), 107-115.

Lee W B, Kwon H C, Cho O R, Lee K C, Choi S U, Baek N I, Lee K R (2002) Phytochemical Constituens of *Cirsium setidens Nakai* and Their Cytotoxicity against Human Cancer Cell Lines,*Arch Pharm Res*, 25(5), 628-635.

Leopoldini M, Russo N (2011) The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants, *Food Chemistry*, 125, 288–306

Liao Y J, Zhai H F, Zhang B, Duan T X, Huang J M (2011) Anxiolytic and sedative effects of dehydroeffusol from *Juncus effusus* in mice*, Planta Med*, 77(5), 416-20

Lim J H, Park K J, Kim B K, Jeong J W, Kim H J (2012) Effect of salinity stress on phenolic compounds and carotenoids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum M*.) sprout, *Food Chemistry*, 153 (3), 1065-70.

Liu S J, Luo X, Li D X, Zhang J, Qiu D L, Liu W, She L, Yang Z R (2006) Tumor inhibition and improved immunity in mice treated with flavone from *Cirsium japonicum* DC*, International Immunopharmacology*, 6 (9), 1387-1393.

Loizzo M R, Statti G A, Tundis R, Conforti F, Andò S, Menichini F (2004) Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Cirsium tenoreanum*, *Fitoterapia*, 75,(6), 577-80.

López-Lázaro M. (2009) Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin, *Mini Rev Med Chem*, 9(1), 31-59.

Lovell D J, Hunter T, Powers S J, Parker S R, Van den Bosch F (2004) Effect of temperature on latent period of septoria leaf blotch on winter wheat under outdoor conditions, *Plant Pathology*, 53(2), 170–181.

Luo X, Su P, and Zhang W (2015) Advances in Microalgae-Derived Phytosterols for Functional Food and Pharmaceutical Applications,*Mar Drugs*,13(7), 4231–4254.

Ma X Y, Zhang L H, Shao H B, Xu G, Zhang F, Ni T, Brestic M (2011) Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus), a medicinal salt-resistant plant has high adaptability and multiple-use Values, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(8), 1272-1279.

Mabberley, D J (2008) Mabberley's plant book, a portable dictionary of plants, their classification and uses, Edition 3, *Cambridge University Press*.

Macheix J J, Fleuriet F, Jay-Allemend C H (2005) Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, pp 102-103.

MacRae W D, Towers G H N (1984) Biological activity of lignans, *Phytochemistry*, 23, 1207-1220.

Magboul A M, Geng S, Gilchrist D G, Jackson L F (1992) Environmental influence on the infection of wheat by *Mycosphaerella Graminicola*, *Phytopathology*, 82(12), 1407–1413.

Mamadalieva N Z (2012) Phytoecdysteroids from *Silene* plants: distribution, diversity and biological (antitumour, antibacterial and antioxidant) activities, *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11 (6), 474 – 497.

Mansour R M A, Zahran M A, Salah N A M (1986) Flavonoids and ecology of *Juncus acutus* and *Juncus rigidus* in Egypt. *Egypt. J. Bot*, 29/30,(1–3), 161–166.

Markham P N, Neyfakh A A (2001**)** Efflux-mediated drug resistance in Gram-positive Bacteria, *Current Opinion Microbiology,* 5, 509-514.

Matkowski A (2008) Plant in vitro culture for the production of antioxidants – A review. *Biotechnology Advances*, 26,548–560.

Maximov N A (1931) *J. Ecol.*,19, 273.

McDonald E et Martin R T (1978) Total synthesis of juncusol, *Tetrahedron Letters*, 47, 4723 - 4726.

Medini F, Ksouri R, Falleh H, Megdiche W, Trabelsi T, Abdelly A (2011) Effects of physiological stage and solvent on polyphenol composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Limonium densiflorum, Journal of Medicinal Plants Research*, 5(31), 6719-6730.

Medini F, Fellah H, Ksouri K, Abdelly A (2014) Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant andantimicrobial activities of organic extracts of shoots of the plant *Limonium delicatulum, Journal of Taibah University for Science*, 8, 216 -224

Mehr Z S, Khajeh H, Esmaeilzadeh B S, Sabbagh. S K (2012) Changes on proline, phenolic compounds and activity of antioxidant enzymes in *Anethum graveolens* L. under salt stress, *International journal of Agronomy and Plant Production*, 3 (S), 710-715.

Meot-Duros L, Cérantola S, Talarmin H, Le Meur C, Le Floch G, Magné C (2010) New antibacterial and cytotoxic activities of falcarindiol isolated in *Crithmum maritimum* L. leaf extract, *Food Chem, Toxicol*, 48(2), 553-557.

Miles D H, Bhattacharyya J, Mody N V, Atwood J L, Hedin P A (1977) Dehydrojuncusol, a constituent of the roots of Juncus roemerianus, *J. Am. Chem. Soc, 99*, 618.

Morishima C, Shuhart M C, Wang C C, Paschal D M, Apodaca M C, Liu Y, Sloan D D, Graf T N, Oberlies N H, Lee D Y W (2010) Silymarin inhibits in vitro T-cell proliferation and cytokine production in hepatitis C virus infection, *Gastroenterology*, 138, 671–681.

Moussaoui F, Zellagui A, Segueni N (2011) Flavonoid constituents from Algerian *Launaea resedifolia* (O.K.) and their antimicrobial activity," *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(4),486-492.

Murray P R, Rosenthal K S, Pfaller M A (2009) Medical Microbiology, *Elsevier edn, Philadelphia,* pp. 960.

Naczka M, Shahidi F (2004) Extraction and analysis of phenolics in food, *Journal of Chromatography A*, 1054, 95–111.

Nance C L, Siwak B E, Shearer T W (2012) Preclinical development of the green tea catechin, epigallocatechin gallate, as an HIV-1 therapy, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123, (2), 459-465.

Nazaruk J, Czechowska S K, Markiewicz R, Borawska M H (2005) Flavonoid composition and antimicrobial activity of *Cirsium rivulare* (Jacq.) All. flowers. *J Ethnopharmacol.*, 102, (2), 208-12.

Nazaruk J (2008) Antioxidant activity and total phenolic content in Cirsium five species from north–east region of Poland, *Fitoterapia*, 79, 194–196.

Noble W C, Virani Z, Cree R G (1992**)** Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from Enterococcus faecalis NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus, FEMS Microbiology Letters*, 72, 195-198.

Normak H B, Normak S (2002) Evolution and spread of antibiotic resistance, *Journal of Internal Medicine,* 252, 91-106.

Oliveira M, Sales Junior P A, Rodrigues M J, DellaGreca M, Barreira L, Murta S M, Romanha A J, Custódio L (2016) Unlocking the in vitro anti-Trypanosoma cruzi activity of halophyte plants from the southern Portugal, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine,* 9, (8), 735-41.

Olson S (2015) An analysis of the biopesticide market now and where it is going, *Outlooks on Pest Management*, 26, 203–206.

Ouarghidi A, Martin G J, Powell B, Esser G, Abbad A (2013) Botanical identification of medicinal roots collected and traded in Morocco and comparison to the existing literature, *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 9, 59.

Oyazu M, Ogihara H, Naruse U (1991) Pharm. Soc, *Jpn*, 40, 511.

Parida A K, Das A B, Sanda Y, Mohanty P (2004) Effects of salinity on biochemical components of the mangrove, *Aeceras corniculatum*, *Aquatic Botany*, 80, 77-87.

Pawlotsky J M, Dhumeaux D (2004) Hépatite C, *Paris : EDK*, 479 p.

Payan C (2012) Du virus à l'histoire naturelle de l'hépatite C, *Hépato-Gastro*, 19(8), 641-8.

Pedras M S C, Zheng Q A, Shatte G, Adio A M. (2009) Photochemical dimerization of wasalexins in UV-irradiated *Thellungiella halophila* and in vitro generates unique cruciferous phytoalexins, *Phytochem*, 70, 2010–2016.

Peirs C (2005) Contribution a l'étude phytochimique de *Galega officinalis* l. (*Fabaceae*), *Thèse de doctorat*, *Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse*.

Pineiro D, Martinez-Salas E (2012) RNA Structural element of hepatitis C virus controlling viral RNA translation and the implications for viral pathogenesis, *Viruses*, 4, (10) , 2233-50.

Polat E, A1ankus-Caliskan O, Karayi1dirim T, Bedir E (2010) Iridoids from *Scabiosa atropurpurea* L. *subsp. maritima* Arc. (L.), *Biochemica1 Systematics and Ecol*, 38, 253-255.

Polyak S J, Morishima C, Shuhart M C, Wang C C, Liu Y, Lee D Y (2007) Inhibit ion of T-cell inflammatory cytokines, hepatocyte NF-kappaB signaling, and HCV infection by standardized Silymarin, *Gastroenterology*, 132, 1925–1936.

Ponomarenko A, Goodwin S B, Kema G H (2011) *Septoria tritici blotch* (STB) of wheat, *Plant Health Instructor*.

Poole K (2004**)** Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria, *Clinical Microbiology and Infection,* 10, 12-26.

Pottier-Alapetite G (1981) Flore de la Tunisie, Angiospermes-dicotylédones, Gamopétales, *Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique et le ministère de l'agriculture de la Tunisie.*

Premanathan M, Kandasamy K, Hideki N (1999). Mangrove Halophytes: A source of antiviral substances, *South Pacific Study,*19, 1-2

Prescott L M, Harley J P, Klein D A, (1995) Microbiologie. *De Boeck ed*. p 1014.

Rahat A A, Shaheen I, Shaista P (2013) Isolation of A New Sterol from *Limonium stocksii* and Antimicrobial Activities of Crude Extract, *Journal of Basic & Applied Sciences, , 9,* 116-119.

Ravensberg W (2015) Crop protection in 2030: towards a natural, efficient, safe and sustainable approach, *International Symposium Swansea University*, 7–9 September 2015.

Rice L D, Sahm D Bonomo, R A (2003**)** Mechanisms of resistance to antimicrobial agents, *ASM Press, Washington,* p. 1074.

Robert C (2003) Étude et modélisation du fonctionnement d'un couvert de blé attaqué par le complexe parasitaire *Puccinia triticina – Mycosphaerella graminicola*, *Thèse de doctorat, Institut National Agronomique Paris-Grignon.*

Rocher F (2004) Lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes : évaluation de la systémie phloémienne de nouvelles molécules à effet fongicide et d'activateurs de réactions de défense, *Thèse de doctorat, Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées de Poitiers.*

Rodrigues M J, N.Gangadhar K, Vizetto-Duarte C, G. Wubshet S, T. Nyberg N, Barreira L, Varela J, Custódio L (2014) Species from Southern Portugal as Sources of Bioactive Molecules, *Mar Drugs*, 12(4), 2228–2244.

Rodrigues M J, Gangadhar K N, Zengin G , Mollica A, Varela J, Barreira L, Custódio L (2017) Juncaceae species as sources of innovative bioactive compounds for the food industry: *in vitro* antioxidant activity, neuroprotective properties and *in silico* studies, *in press.*

Saint-Jean S, Chelle M, Huber L (2004) Modelling water transfer by rainsplash in a 3D canopy using Monte Carlo integration, *Agricultural and Forest Meteorology*, 121(3-4), 183–196.

Sakagami Y, Murata H, Nakanishi T, Inatomi Y, Watabe K, Iinuma M, Tanaka T, Murata J, Lang FA (2001) Inhibitory effect of plant extracts on production of verotoxin by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *Journal of Health Science*, 47(5), 473–477.

Salawu S O, Ogundare A O, Ola-Salawu B B and Akindahunsi A A (2010) Antimicrobial activities of phenolic containing extracts of some tropical vegetables, *Records of Natural Products*, 4,(1), 91-95.

Sanderson F R, Hampton J G (1978) Role of the perfect states in the epidemiology of the common septoria diseases of wheat, *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 21(2), 277–281.

Šaponjac V T, Canadanovic-Brunet J, Cetkovic G, Djilas S (2016) Chapter 6: Detection of Bioactive Compounds in Plants and Food Products. In: Nedovic, Emerging and Traditional

Technologies for Safe, Healthy and Quality Food. *Food Engineering Series. Springer International Publishing, Switzerland.*

Sarkar, H., Zerezghi, M., Bhattacharyya, J. (1988) Dehydrojuncusol, a constituent of the roots of Juncus roemerianus. *Phytochemistry* 27, 3006–3008.

Sarrazi C (2016) The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice, *J. Hepatol*, 64, 486–504.

Sato K (1989) Statice, In: T. Matsuo (Editor), *Collected Data of Plant Genetic Resources*, Kodansha, Tokyo, pp, 1040-1041.

Scalbert A (1991) Antimicrobial properties of tannins, *Phytochemistry*, 30, 3875-3883.

Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 287-306.

Schmidt F R (2004) The challenge of multidrug resistance: actual strategies in the development of novel antibacterials, *Appl. Microbiol. Biotechnol,* 63, 335-343.

Sellam A, Iacomi-Vasilescu B, Hudhomme P, Simoneau P (2007) In vitro antifungal activity of brassinin, camalexin and two isothiocyanates against the crucifer pathogens *Alternaria brassicicola* and *Alternaria brassicae*, *Plant Pathol*, 56, 296–301.

Shan C Y, Ye Y H, Jiang H F, Zhang J (2008) Study on chemical constituents isolated from *Juncus effuses*, *J. Chin. Med. Mat,* 31 (3), 374–376.

Shaw M W, Royle D J (1989) Airborne inoculum as a major source of *Septoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*) infections in winter wheat crops in the UK, *Plant Pathology*, 38(1), 35–43.

Shima K, Toyota M, Asakawa, Y (1991). Phenanthrene derivatives from the medullae of *J. effusus*. Phytochemistry 30, 3149–3151.

Shukla S, Gupta S (2010) Apigenin: A Promising Molecule for Cancer Prevention, *Pharm Res*, 27(6), 962–978.

Singh S B, Barrett J F (2006) Empirical antibacterial drug discovery-foundation in natural products, *Biochemical Pharmacology*, 71, 1006-1015.

Souquet J M, Labarbe B, Le Guerneve C, Cheynier V, Moutounet M (2000) Phenolic composition of grape stems**,** *Food Chem***,** 48, 1076-1080.

Stocker O (1961) Les effets morphologiques et physiologiques du manque d'eau sur les plantes. Recherches sur la zone aride. XV- Echanges hydriques des plantes en milieu aride ou semi-aride, *Ed. UNESCO*, p.69.

Stöckigt J, Sheludko Y, Unger M, Gerasimenko I, Warzecha H, Stöckigt D (2002) High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic-electrospray ionization mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups, *Journal of chromatography A,* 967, 85-113.

Stricklanda L R, Pal H C, Elmets C. A. and Afaq F (2015) Targeting drivers of melanoma with synthetic small molecules and phytochemicals, *Cancer Letters*, 359, 20-35.

Suffert F, Sache I, Lannou C (2011) Early stages of *septoria tritici blotch* epidemics of winter wheat : build-up, overseasoning, and release of primary inoculum, *Plant Pathology*, 60(2), 166–177.

Tackholm V (1974) "Student Flora of Egypt", *Published by Cairo University printed by cooperative printing company.*

Tan Y T, Darren J (2000) Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria, *Mol. Med. Today,* 6, 309-314.

Tarle D, Dvoržak I (1990) *Acta Pharm Jugosl*, 40, 569.

Thomas M R, Cook R J, King J E (1989) Factors affecting development of *Septoria tritici* in winter wheat and its effect on yield, *Plant Pathology*, 38(2), 246–257.

Tóth B, Liktor-Busa E, Urbán E, Csorba A, Jakab G, Hohmann J, Vasas A (2016) Antibacterial screening of Juncaceae species native to the Carpathian Basin against resistant strains and LC-MS investigation of phenanthrenes responsible for the effect, *Fitoterapia* 15:69-73

Toure D (2015) études chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de Côte d'Ivoire, *Thèse de doctorat*, *Université Felix Houphouët Boigny, Côte d'Ivoire*,

Trépo C, Merle P, Zoulim F (2006) Hépatites Virale B et C. *1ère édition. Paris : John Libbey Eurotext*, 245 p.

Truchot V (2014) Nouveau traitement de l'hépatite c chronique, l'alisporivir, inhibiteur de la cyclophiline a : stratégie de développement et d'enregistrement, *Thèse de doctorat, Université angèrs-UFR sciences pharmaceutique et ingénierie de la santé*.

Vartanian N, Lemée G (1984) La notion d'adaptation à la sécheresse, *Bulletin de la Société Botanique de France - Actualités Botaniques*, 131:1, 7-15

Vidhyasekaran P (2008) Fungal pathogenesis in plant and crop "Molecular biology and host defense mechanisms, *CRC Press, Second edition*, P.509.

Vizgirdas R S, Rey-Vizgirdas E M (2009) Wild Plants of the Sierra Nevada, *University of Nevada Press*, 384 pages.

Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J, Kowalska T (2008) Thin Layer Chromatography in Phytochemistry, *Chromatographic science series,* 99, 788.

Wal A, Srivastava R. S., Wal P (2015) Lupeol as a magical drug, *Pharmaceutical and biological evaluations*, 2,(5), 142-151.

Wang L, Weller CL (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in Food Science and Technology*, 17(6), 300-312.

Wang Q and Xie M (2010) Antibacterial activity and mechanism of luteolin on *Staphylococcus aureus*, *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 50,(9),1180-1184.

Wang Y G, Wang Y L, Zhai H F, Liao Y J, Zhang B, Huang J M (2011) Phenanthrenes From *Juncus Effusus* With Anxiolytic and Sedative Activities, *Nat Prod Res*, 26, (13), 1234-1239.

Wen Z, Dumas T E, Schrieber S J, Hawke R L, Fried M W, Smith P C (2008) Pharmacokinetics and metabolic profile of free, conjugated, and total silymarin flavonolignans in human plasma after oral administration of milk thistle extract, *Drug Metab. Dispos*, *36*, 65–72.

Wollgast J, Anklam E (2000) Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification, *Food Research International*, 33, 423-447.

Wu L, Hsu H W, Chen Y C, Chiu C C, Lin Y I, Ho J A (2006) Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya, Food Chem, 95, 319-327.

Xu R, Fazio G C., Matsudu S P T (2004). On the origins of terpenoid skeletal diversity, Phytochemistry, 65, pp 261-291.

Xue, Z, Li, S, Wang S, Wang Y, Yang Y, Shi J, He L (2006) Mono-, bi-, and triphenanthrenes from the tubers of *Cremastra appendiculata*. *J. Nat. Prod*. 69, 907–913.

Yuh-Chi K, Lie-Chwen L, Wei-Jern T, Cheng-Jen C, Szu-Hao K, Yen-Hui H (2002) Samarangenin B from *Limonium sinense* Suppresses Herpes Simplex Virus Type Replication in Vero Cells by Regulation of Viral Macromolecular Synthesis, *Antimicrobiol Agents Chemotherapy,* 46 (9), 2854–2864.

Zeltich I (1967) Water and CO2 transport in the photosynthetic process in Harvesting the sun, photosynthesis in plant life, *Ed. Academic Press New-York*, p. 231.

Žemlicka L, Fodran P, Lukeš V (2014) Physicochemical and biological properties of luteolin-7-*O*-ß-D-glucoside (cynaroside) isolated from *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, 145, (8),1307-1318.

Zemtsova G N (1977) Sostoyanie I Perspektivy- Nauch Iss 1ed po Introduktsii -Lekarstv -Ras t, 176-177.

ANNEXE

ANNEXE 1. Les 30 plantes collectées

Plantes halophytes collectées de la zone Z-1

Salicornia arabica L *(Amaranthaceae)*	*Suaeda maritima* L. Dumort *(Amaranthaceae)*	*Pistacia lentiscus* L. *(Anacardiaceae)*

Plantes halophytes collectées de la zone Z-2

Limonium virgatum (Willd.) Four *(Plumpaginaceae)*	*Silene succulenta* Forssk *(Caryophyllaceae)*	*Euphorbia paralias* L. *(Euphorbiaceae)*
Eryngiym maritimum L. *(Apiaceae)*	*Euphorbia granulata* Forssk. *(Euphorbiaceae)*	*Polygonum maritimum* L. (Polygonaceae)
Eryngium canadensis L. *(Apiaceae)*	*Cyperus conglomeratus* Rottb. *(Cyperaceae)*	*Myrtus communis* L. *(Myrtaceae)*

Juniperus oxycedrus L.
(Cupressaceae)

Atriplex tatarica L.
(Amaranthaceae)

Aeluropus littoralis (Gouan) Parl.
(Poaceae)

Juncus maritimus Lam.
(Juncaceae)

Plantes xérophytes collectées de la zone Z-3

Cirsium scabrum (Poir.) Bonnet & Barratte *(Compositae)*

Thymelaea hirsuta (L.) Endl. *(Thymelaeaceae)*

Thymus capitatus (L.)Hoffmanns. & Link *(Thymelaeaceae)*

Verbascum sinuatum L. *(Scrophulariaceae)*

Cistus monspeliensis L. *(Cistaceae)*

Calicotome villosa (Poir.) Link. *(Leguminosae)*

Thapsia garganica L. *(Apiaceae)*

Plantes xérophytes collectées de la zone Z-4

Mentha pulegium L.
(Lamiaceae)

Daucus carota L.
(Apiaceae)

Hypericum triquetrifolium Turra.
(Hypericaceae)

Galium mollugo L
(Rubiaceae)

Phagnalon rupestre (L.) DC
(Compositae)

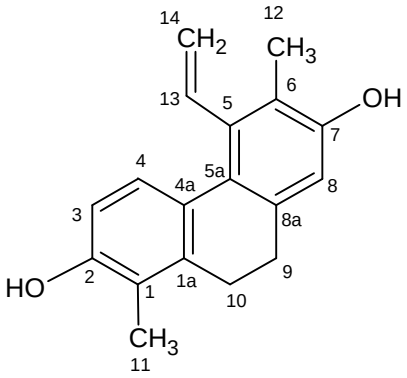
Lotus creticus L.
(Leguminosae)

Asparagus acutifolius L.
(Asparagaceae)

ANNEXE 2. Les données RMN des composés identifiés

RMN Composé DCM1

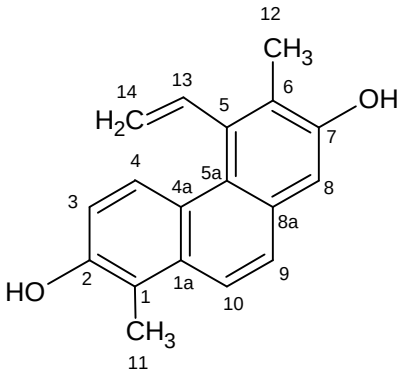
(dans MeOD)
Juncusol



$C_{18}H_{18}O_2$ (MM= 266 g/mol)

N°	^{1}H NMR	^{13}C NMR
1		120.1
2		152.8
3	6.58 *d* (9.3)	110.4
4	7.42 *d* (9.3)	127.3
5		135.7
6		120.6
7		153.2
8	6.64 *s*	111.9
9	2.57	29.4
10	2.66	25.3
1a		139
4a		126.2
5a		126.6
8a		137.2
11	2.20 *s*	9.1
12	2.22 *s*	10.6
13	6.8 *dd* (18.2 ; 11.4)	137.9
14	5.16 *dd* (18.2 ; 2.05) 5.45 *dd* (11.4 ; 2.05)	117.9

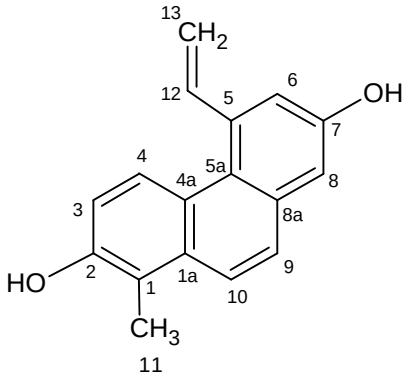
RMN Composé DCM2
(dans MeOD)
dehydrojuncusol



$C_{18}H_{16}O_2$ (MM= 264 g/mol)

N°	^{1}H NMR	^{13}C NMR
1		116.72
2		151.39
3	7.01 *d* (9.3)	113.66
4	8.85 *d* (9.3)	126.87
5		136.73
6		124.74
7		153.10
8	7.14 s	109.97
9	7.52 *d* (9.2)	126.33
10	7.8 *d* (9.2)	121.70
1a		132.68
4a		124.9
5a		123.46
8a		130.71
11	2.54 *s*	8.9
12	2.41 *s*	13.29
13	7.32 *dd* (18.2 ; 11.4)	140.20
14	5.23 *dd* (18.2 ; 2.05) 5.69 *dd* (11.4 ; 2.05)	117.58

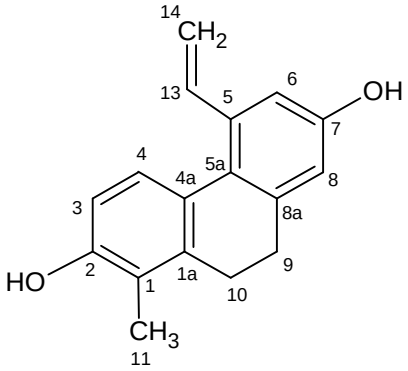
RMN Composé CPC2-F16-P6
ArizX Ex6-C10
(dans $CDCl_3$)
Dehydroeffusol



$C_{17}H_{14}O_2$ (MM= 250 g/mol)

N°	^{1}H NMR	^{13}C NMR
1		117.8
2		150.36
3	7.10 *d* (9.3)	114.8
4	8.59 *d* (9.3)	126.3
5		132.2
6	7.22 s	117.1
7		152.9
8	7.22 *s*	111.6
9	7.65 *d* (9.2)	127.01
10	7.92 *d* (9.2)	122.96
1a		132.6
4a		125.6
5a		127.7
8a		133.0
11	2.63 *s*	10.5
12	7.48 *dd* (18.2 ; 11.4)	139.1
13	5.48 *dd* (18.2 ; 2.05) 5.81 *dd* (11.4 ; 2.05)	114.5

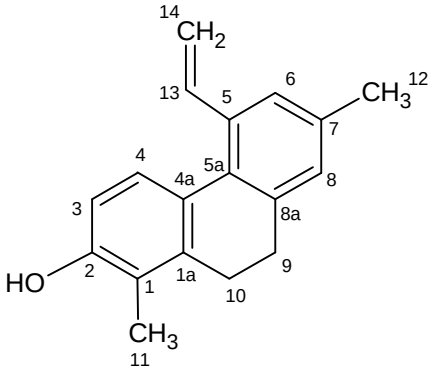
RMN Composé CPCR2-F-C9
CPC-F16-13-P4
ArizX Ex6-C9
(dans CDCl3)
Effusol



$C_{17}H_{16}O_2$ (MM= 252 g/mol)

N°	^{1}H NMR	^{13}C NMR
1		120.5
2		151.9
3	6.71 *d* (9.3)	112.6
4	7.34 *d* (9.3)	127.3
5		136.5
6	6.92 s	112.8
7		153.3
8	6.72 *s*	113.8
9	2.71	29.2
10	2.77	24.7
1a		139.5
4a		126.0
5a		126.9
8a		137.2
11	2.29 *s*	10.7
13	6.97 *dd* (17.5 ; 11.8)	138.5
14	5.71 *dd* (17.5 ; 0.9) 5.28 *dd* (10.8 ; 0.9)	114.1

RMN Composé P2021
(dans CDCl3)
Juncunol



$C_{18}H_{18}O$ (MM= 250 g/mol)

N°	^{1}H NMR	^{13}C NMR
1		120.3
2		152.3
3	6.72 *d* (9.3)	111.9
4	7.41 *d* (9.3)	127.9
5		134.8
6	7.27 (s)	127.2
7		135.8
8	7.04 (s)	127.6
9	2.74	29.8
10	2.76	24.8
1a		139.9
4a		127.0
5a		131.1
8a		138.6
11	2.30 *s*	10.9
12	2.40 *s*	21.2
13	6.9 *dd* (18.2 ; 11.4)	138.9
14	5.28 *dd* (18.2 ; 2.05) 5.72 *dd* (11.4 ; 2.05)	113.7

ANNEXE 3. LES COLLECTIONS DE SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES

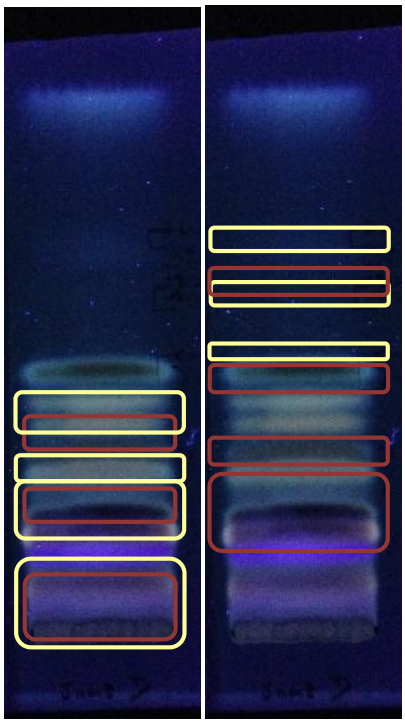
Liste des souches utilisées dans le Chapitre I

	Souches	N°
Bactéries Gram négatif	*Citrobacter freundii* 11041	1
	Citrobacter freundii 11042	2
	Escherichia coli 8138	3
	Escherichia coli 8157	4
	Escherichia coli ATCC 25922	5
	Enterobacter aerogenes 9004	6
	Enterobacter cloacae 11050	7
	Enterobacter cloacae 11051	8
	Enterobacter cloacae 11053	9
	Klebsiella pneumoniae 11016	10
	Klebsiella pneumoniae 11017	11
	Serratia marcescens 11056	12
	Serratia marcescens 11057	13
	Proteus mirabilis 11060	14
	Providencia stuartii 11038	15
	Salmonella sp. 11033	16
	Acinetobacter baumanii 9010	17
	Acinetobacter baumanii 9011	18
	Pseudomonas aeruginosa 8131	20
	P. aeruginosa ATCC 27583	21
	Stenotrophomonas maltophilia	22
	Yersinia pseudotuberculosis 2777	36
Bactéries Gram positif	*Staphylococcus epidermidis*10282	19
	Enterococcus faecalis C159-6	23
	Enterococcus sp 8153	24
	Staphylococcus aureus 8146	25
	Staphylococcus aureus 8147	26
	Staphylococcus epidermidis 5001	27
	S. lugdunensis T26A3	28
	Staphylococcus warneri T12A12	29
	Corynebacterium T25-17	31
	Mycobacterium smegmatis 5003	32
	Streptococcus agalactiae T 25-7	33
	Streptococcus dysgalactiae T46C14	34
	Streptococcus agalactiae T 53C2	35
Levure	*Candida albicans* 10286	30

Liste des souches utilisées dans le Chapitre I

Souches (Gram positif)	N°
***Corynebacterium* T27.17**	**1**
***Enterococcus faecalis* C159-6**	**2**
Enterococcus faecalis T26-B7	3
Enterococcus faecalis T34-2	4
Enterococcus faecalis T39-C11	5
Enterococcus faecalis T37A4	6
***Mycobacterium smegmatis* 5003**	**7**
Staphylococcus aureus CIP224	8
***Staphylococcus aureus* 8147**	**9**
***Staphylococcus aureus* 8146**	**10**
Staphylococcus aureus T1.1	11
Staphylococcus aureus 13125	12
Staphylococcus aureus 13126	13
Staphylococcus aureus T6.7	14
Staphylococcus aureus T25.3	15
Staphylococcus aureus T25.9"	16
Staphylococcus aureus T25.10	17
Staphylococcus aureus T26.A4	18
Staphylococcus aureus T28.1	19
Staphylococcus aureus T36.B1	20
Staphylococcus aureus 13127	21
Staphylococcus aureus T47.A12	22
***Staphylococcus epidermidis* 5001**	**23**
Staphylococcus epidermidis T30.1	24
***Staphylococcus lugdunensis* T26A3**	**25**
***Staphylococcus warneri* T12A12**	**26**
Staphylococcus pettenkoferi T3.3	27
***Streptococcus agalactiae* T 25-7**	**28**
***Streptococcus agalactiae* T53C2**	**29**
Streptococcus agalactiae T38-2	30
Streptococcus agalactiae T40A2	31
Streptococcus agalactiae 13225	32
Streptococcus agalactiae 13226	33
***Streptococcus dysgalactiae* T46C14**	**34**
Staphylococcus saprophyticus 08237	35
Streptococcus pyogenes 13240	36

ANNEXE 4. Localisation des composés actifs par bioautographie



Expérience 1 **Expérience 2**

Différences des composés actifs localisés entre deux expériences : en rouge, composés actifs contre *S. pyogenes* ; en jaune, composés actifs contre *S. dysgalactiae* ; en blanc, localisation du juncusol et du déhydrojuncusol (toluène/ acétate d'éthyle / acide formique ; 15:10:2,5 à 366 nm)

Protocole. Les différents composés d'un extrait sont séparés au préalable par la méthode de chromatographie sur couche mince (CCM). Le système de solvants utilisé a été ajusté pour avoir la meilleure séparation pour chaque échantillon testé (toluène/ acétate d'éthyle / acide formique : 15/10/2.5). Après migration, la plaque est séchée, puis laissée sous vide pendent 24 heures pour favoriser les conditions de stérilité. En parallèle à cela, *Streptococcus dysgalactiae* T46C14 et *Streptococcus pyogenes* 13240 sont cultivés dans des tubes contenant un milieu BH (Brain Heart cystéiné) puis incubées pendant 24-48 heures dans une étuve à 37 °C. Les souches ayant poussé, un volume de 5 mL est prélevée la culture microbienne pour être mis directement dans environ 30ml de gélose Columbia (CC), auquel 10 µl de solution de para-iodonitrotétrazolium (INT) à 2 mg/mL sont ajoutés. Les CCM développées et stérilisées sont introduites dans des boîtes à pétrie de forme carrée pour être couverte par la suspension gélose-bactérie-INT. Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24-72 h à 37°C. Après incubation, l'INT est transformée par une deshydrogénase en un composé d'une couleur rouge foncé. Les résultats sont observables directement sur les plaques ; la présence de zones claires correspond aux zones d'inhibition de la croissance bactérienne.