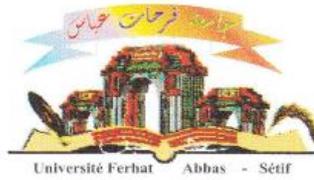


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Ferhat Abbas - Sétif  
Faculté des Sciences  
de la Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس - سطيف  
كلية علوم الطبيعة والحياة

N° ...../SNV/2021

**Département de Biochimie**

## **MEMOIRE**

Présenté par : **HARRAR Abd El Nacer**

Pour obtenir le diplôme de **Magister**

Option : Biochimie et physiologie expérimentale

### **THEME :**

# **Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L.**

Soutenu publiquement le.../.../2012

**Devant le jury**

<b>Président :</b>	Pr. Benboubetra Mustapha	Pr. Université de Sétif
<b>Rapporteur :</b>	Dr. Belhattab Rachid	Dr. Université de Sétif
<b>Examineur :</b>	Pr. Laouar Hocine	Pr. Université de Sétif
	Dr. Zerroug Mohamed Mihoub	Dr. Université de Sétif

**Année universitaire 2011-2012**

## **DEDICACE**

*Je dédie ce travail à mes **Parents** qu'ils trouvent ici toute ma  
gratitude*

*Pour leur soutien tout le long de mes études*

*A ma **Sœur** et mes **Frères***

*À mes **Amis***

*A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour*

## REMERCIEMENTS

*Je remercie DIEU tout puissant, maître des cieux et de la terre,  
qui m'a permis de mener à bien ce travail.*

*Tout d'abord je tiens surtout à adresser mes plus vifs  
remerciements à mon promoteur **Mr. Belhattab Rachid**, Maître  
de conférences qui m'a fait l'honneur de réaliser ce travail sous  
sa direction, pour sa grande patience, pour sa disponibilité et  
ses conseils judicieux.*

*Je remercie également **Mr Benboubetra Mustapha**, Professeur  
à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université  
de Sétif d'avoir accepté de présider le jury.*

*Je remercie **Mr Laouar Houcine**, Professeur à la faculté des  
Sciences de la Nature et de la Vie à l'université de Sétif d'avoir  
accepté de juger ce modeste travail et participer au jury.*

*Je remercie **Mr Zerroug Mohamed Mihoub**, Maître de conférences  
à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université  
de Sétif, d'avoir accepté d'être parmi les membres du jury de ce  
mémoire.*

*Je remercie toute personne ayant contribué de près ou de loin à  
la réalisation de ce travail.*

*Un grand merci à tous*

# Sommaire

Résumés	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction .....	1

## Partie bibliographique

### Chapitre I

#### Propriétés biologiques de *Rhamnus alaternus* L.

1. Propriétés botaniques .....	2
1.1. Généralités .....	2
1.2. Classification.....	2
1.3. Caractéristiques morphologiques .....	2
1.4. Nomenclature .....	5
1.5. Ecologie et répartition géographique.....	5
2. Usage traditionnel .....	5
3. Propriétés biochimiques .....	5

### Chapitre II

#### Les polyphénols

1. Les composés phénoliques .....	7
1.1. Généralités .....	7
1.2. Biosynthèse des composés phénoliques .....	7
1.3. Principales classes des polyphénols .....	8
2. Activités biologiques.....	14
2.1. Activité antioxydante.....	14
2.2. Activité antimicrobienne .....	17

## **Partie Expérimentale**

### **Chapitre III**

#### **MATERIEL ET METHODES**

1. Matériel.....	20
1.1. Matériel végétal.....	20
1.2. Appareils et produits chimiques.....	20
1.3. Les souches microbiennes utilisées.....	20
2. Méthodes d'analyses.....	21
2.1. Préparation des extraits.....	21
1.2. Analyse chimique.....	25
1.3. Activité antioxydante.....	27
1.4. Activité antimicrobienne.....	29

### **Chapitre VI**

#### **Résultats et discussion**

1. Résultats et discussion.....	31
1.1. Rendements des extractions.....	31
1.2. Composition chimique.....	31
1.3. L'activité antioxydante et antiradicalaire.....	37
1.4. L'activité antimicrobienne.....	46
Conclusion.....	58
Références bibliographiques.....	59
Annexes.....	67

## ملخص

تنتهي شجيرة *Rhamnus alaternus* الى عائلة *Rhamnaceae* وهي نبتة طبية واسعة الإستعمال في الطب التقليدي في الجزائر. قدر مردود الإستخلاص بالنقع في الميثانول للجزء الهوائي (EMTF) والإستخلاص بإستعمال جهاز Soxhlet للجزء الجذري (EMR) ب 11 % و 10 % على التوالي. وكان مردود المستخلص المائي بالنسبة للجزء الهوائي (EATF) والجذري (EAR) عن طريق الغليان 6 % و 8 % (ك/ك) لكلا الجزئين على الترتيب. قدرت عديدات الفينول الكلية في هذه المستخلصات بإستعمال متفاعل Folin-Ciocalteu حيث وجد 36 و 7 ملغ مكافئ حمض الكافيك/غ مادة طازجة بالنسبة للجزء الهوائي (EATF) و (EMTF) على الترتيب, كما وجد 7 و 19 ملغ مكافئ حمض الكافيك/غ مادة طازجة بالنسبة للجزء الجذري (EMR) و (EAR) على التوالي، في حين وجدت الفلافونويدات الكلية والمقدرة بطريقة  $AlCl_3$  18، 14، 6 و 5 ملغ مكافئ الكرسيتين/غ مادة طازجة لكل من EATF, EAR, EMTF, EMR على الترتيب وقدر محتوى الفلافونولات والفلافونات ب 7، 6، 2 و 2 ملغ مكافئ الكرسيتين/غ مادة طازجة بالنسبة لنفس المستخلصات على الترتيب. ينحصر النشاط المضاد للأكسدة المقدر بطريقة البتاكروتين/حمض اللينولييك ما بين 72 و 82 % وهو قريب من نشاط الشاهد BHT 95 % عند تركيز 2 ملغ/مل. كانت قيم التراكيز المثبطة لـ 50 % ( $CI_{50}$ ) من الجذر الحر 2,2-diphenyl- 1-picrylhydrazyl (DPPH) والمعبرة عن النشاط المضاد لهذا الأخير 37 و 52 بالنسبة ل BHT و EMR على التوالي و 66 بالنسبة لكل من EATF و EAR و 71 ميكروغرام/مل بالنسبة ل EMTF. أبدى اختبار النشاط المضاد للجراثيم على 11 سلالة بكتيرية غرام + وغرام - و 3 سلالات فطرية بإستعمال طريقة انتشار الأقراص تأثيرا مثبتا على خمس سلالات بكتيرية من طرف مستخلص واحد (EMR). كانت (CMI) التراكيز الدنيا المثبطة 6,25 ملغ/مل على : *E. coli*، *S. aureus*، *K. pneumoniae*، *E. faecalis* و 0.2 ملغ/مل على *P. aeruginosa*.

## كلمات مفتاحية

متعدد الفينول، *Rhamnus alaternus*، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للجراثيم.

## Abstract

*Rhamnus alaternus* L. a shrub which belongs to the *Rhamnaceae* family. It's a medicinal plant largely used in Algerian traditional medicine. The aerial parts of the plant (stems and leaves) were subjected to maceration in methanol (EMTF), whereas the roots were extracted with methanol (EMR) using a Soxhlet apparatus. The decoction has been conducted both on the aerial parts (EATF) and roots (EAR) using distilled water. The yields were 11 %, 10 %, 6 % and 8 % (w/w) for EMTF, EMR, EATF and EAR respectively. Total phenolic contents were determined using Folin-Ciocalteu reagent and found to be 36 (EATF), 19 (EAR), 7 (EMTF) and 7 (EMR) mg caffeic acid equivalent/ g of fresh weight. Flavonoids were evaluated by AlCl<sub>3</sub> method and shown to be 18 (EATF), 14 (EAR), 6 (EMTF) and 5 (EMR) mg quercetin equivalent/ g of fresh weight. The flavones and flavonols were estimated to be 7 (EATF), 6 (EAR), 2 (EMTF) and 2 (EMR) mg quercetin equivalent/ g of fresh weight. Antioxidant activity was evaluated using  $\beta$ -carotene/linoleic acid system, it ranged between 72 and 82 % for all extracts and seems to be closed to that of BHT 95 % when used at 2 mg/ml. Free radical scavenging effects were evaluated using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH $\cdot$ ), The 50 percent inhibitory concentration for DPPH $\cdot$  (IC<sub>50</sub>) were 37 (BHT), 52 (EMR), 66 (EATF), 66 (EAR) and 71  $\mu$ g/ml (EMTF). The antimicrobial sensitivity of the extracts towards eleven bacterial strains (Gram+ and Gram-) and three fungi strains was assessed using to the disc diffusion agar test; only one extract (EMR) has developed an inhibitory effect against five bacteria tested namely *E.coli*, *S.aureus*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* and *P.aeruginosa*. The minimal Inhibitory Concentrations (MICs) was 0,2 mg/ml for *P.aeruginosa* and 6,25 mg/ml for the remaining bacteria.

**Key word:** phenolic content, *Rhamnus alaternus* L., antimicrobial activity, antioxidant activity.

## Résumé

*Rhamnus alaternus* L. est un arbuste qui appartient à la famille des *Rhamnaceae*. C'est une plante médicinale largement utilisée en médecine traditionnelle en Algérie. La partie aérienne de la plante (tiges et feuilles) a été soumise à une macération dans le méthanol (EMTF), alors que l'extrait méthanolique des racines (EMR) est obtenu par extraction au Soxhlet, la décoction est réalisée sur la partie aérienne (EATF) et les racines (EAR) dans l'eau distillée. Les rendements étaient de 11 %, 10 %, 6 % et 8 % (m/m) pour EMTF, EMR, EATF et EAR respectivement. La teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de 36 (EATF), 19 (EAR), 7 (EMTF) et 7 (EMR) mg équivalent d'acide caféique/ g de matière fraîche. Les flavonoïdes ont été évalués par la méthode utilisant les chlorures d'aluminium  $AlCl_3$ , la teneur est estimée à 18 (EATF), 14 (EAR), 6 (EMTF), 5 (EMR) mg équivalent quercétine/ g de matière fraîche. Le dosage des flavones et flavonols a révélé des teneurs de 7 (EATF), 6 (EAR), 2 (EMTF) et 2 (EMR) mg équivalent quercétine/ g de matière fraîche. L'activité antioxydante a été réalisée par la méthode de décoloration du  $\beta$ -carotène / acide linoléique en utilisant des concentrations de 2 mg/ml pour les quatre extraits et varie entre 72 et 82 % alors que celle du témoin positif BHT est de 95 %. Quant au test anti radicalaire évalué en utilisant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), les concentrations inhibitrices à 50 % ( $CI_{50}$ ) sont estimées à 37 (BHT), 52 (EMR), 66 (EATF), 66 (EAR) et 71  $\mu$ g/ml (EMTF). L'activité antimicrobienne a été déterminée sur onze souches bactériennes (Gram+ et Gram-) et trois champignons selon la méthode de diffusion de disque, un seul extrait (EMR) a manifesté un effet inhibiteur sur 5 souches bactériennes. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour *E.coli*, *S.aureus*, *K. pneumoniae* et *E. faecalis* est de 6,25 mg/ml et 0,2 mg/ml pour *P.aeruginosa*.

**Mots clés:** Polyphénols, *Rhamnus alaternus* L., activité antimicrobiennes, activité antioxydante.

## Liste des abréviations

**AAR** : Activité antioxydante relative.

**Abs** : Absorption.

**ATCC** : American type culture collection = Collection américaine des cultures type.

**BHT** : Butylhydroxytoluène.

**CI<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice 50 %.

**CMB** : Concentration minimale bactéricide.

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice.

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde.

**DO** : Densité optique.

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

**EAC** : Equivalent en acide caféique.

**EAG** : Equivalent en acide gallique.

**EAR** : Extrait aqueux des racines.

**EATF** : Extrait aqueux tiges et feuilles.

**EMR** : Extrait méthanolique des racines.

**EMTF** : Extrait méthanolique tige et feuille.

**EQ** : Equivalent en quercétine.

**m/m** : Masse par masse.

**MF** : Matière fraîche.

**R<sup>2</sup>** : Coefficient de corrélation.

**ROS** : Reactive oxygen species = Espèces réactives de l'oxygène.

**UV** : Ultraviolet.

## Liste des figures

Figure 1 : <i>Rhamnus alaternus</i> .....	3
Figure 2 : Fleures, nectar, fruits et pollen de <i>R. alaternus</i> .....	4
Figure 3 : Structures chimiques de quelques flavonoïdes de <i>R. alaternus</i> .....	6
Figure 4 : Principaux acides hydroxycinnamiques .....	9
Figure 5 : Principaux acides hydroxybenzoïques .....	9
Figure 6 : Principaux types de coumarines .....	9
Figure 7 : Structure chimique de base des flavonoïdes.....	10
Figure 8 : les systèmes de défense contre les radicaux libres .....	16
Figure 9 : Protocole de préparation de l'extrait aqueux .....	22
Figure 10 : Protocole de préparation de l'extrait EMTF par macération .....	23
Figure 11 : Système d'extraction au Soxhlet .....	24
Figure 12 : Comparaison des rendements des quatre extraits de <i>R. alaternus</i> .....	32
Figure 13 : Courbe d'étalonnage d'acide caféique pour le dosage des polyphénols totaux.....	33
Figure 14 : Teneurs en polyphénols des quatre extraits.....	33
Figure 15 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.....	35
Figure 16 : Teneurs en flavonoïdes totaux des quatre extraits .....	35
Figure 17 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavones et flavonoles .	36
Figure 18 : Teneurs en flavones et flavonols des quatre extraits.....	36
Figure 19 : Comparaison des diamètres des halos de rétention de couleur.....	39
Figure 20 : Cinétique de blanchissement du $\beta$ - carotène à 470 nm.....	41
Figure 21 : Activité antioxydante relative des extraits, BHT et contrôle négatif après 48 h ...	41
Figure 22 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration du BHT .....	43
Figure 23 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de EMR .....	43
Figure 24 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de EATF.....	44
Figure 25 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de EAR.....	44
Figure 26 : : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de EMTF ...	45
Figure 27 : Activité anti-radicalaire des extraits de <i>R. alaternus</i> et le BHT .....	45
Figure 28 : Effet du DMSO sur les bactéries et les champignons étudiés .....	47
Figure 29 : Effet des antibiotiques sur les bactéries étudiées.....	52

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification scientifique de <i>R. alaternus</i> .....	2
Tableau 2 : Résultats du test visuel de $\beta$ -carotène .....	37
Tableau 3 : Diamètre de zone d'inhibition en mm en présence de quelques antibiotiques .....	51
Tableau 4 : Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec <i>E. coli</i> .....	56
Tableau 5 : Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec <i>P. aeruginosa</i> .....	56
Tableau 6 : Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec <i>S. aureus</i> . .....	56
Tableau 7 : Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec <i>E. faecalis</i> .....	57
Tableau 8 : Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec <i>K. pneumoniae</i> .....	57
Tableau 9 : Les CMI exprimées pour EMR sur les souches testées en mg/ml .....	57
Tableau 10 : Effet des quatre extraits de <i>R. alaternus</i> sur les champignons étudiés .....	57

# **INTRODUCTION**

## Introduction

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (Maurice, 1997).

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives. Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes (Bahorun et *al.*, 1996).

Les polyphénols sont en effet doués de multiples vertus thérapeutiques, ils jouent un rôle très important, principalement, dans la lutte contre les cancers, les maladies cardiovasculaires et la peroxydation lipidique. Expliquant de ce fait leur grande utilisation dans la fabrication des médicaments. Ils interviennent aussi dans la protection des plantes contre les différentes attaques microbiennes (surtout fongiques) risquant de causer la perte d'une grande quantité de végétation (Bruneton, 1999).

Cependant, l'évaluation des propriétés phytopharmaceutiques, antioxydante et antimicrobienne demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connue dans la médecine traditionnelle. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs (Teixeira da Silva, 2004).

Le genre *Rhamnus* (*Rhamnaceae*) inclut des espèces végétales médicinales bien connue possédants diverses propriétés biologiques (Mai et *al.*, 2001). Les propriétés thérapeutiques de l'espèce *Rhamnus alaternus* L. ont été mises en évidence *in vitro*, elles sont dues à des composés actifs tels que les polyphénols (Ammar et *al.*, 2008).

Quoique certains auteurs de pays méditerranéens ont entrepris des études limitées sur cette plante (Ben Ammar et *al.*, 2007; Ben Ammar et *al.*, 2008; Djeridane et *al.*, 2007), surtout sur la composition de ses huiles essentielles, en Algérie, du moins à notre connaissance cette espèce végétale n'a pas fait l'objet d'études antérieures.

L'objectif de notre étude est d'estimer la teneur de cette espèce végétale en ces composés actifs essentiels, les polyphénols obtenus dans les différentes parties de la plante et d'en évaluer leur pouvoir biologique.

PARTIE  
BIBLIOGRAPHIQUE

# Chapitre I

## Propriétés biologiques de *Rhamnus alaternus* L.

## 1. Propriétés botaniques

### 1.1. Généralités

*Rhamnus alaternus* L. est une espèce végétale qui appartient à la famille des *Rhamnaceae*, les plantes de cette famille sont utilisées en médecine traditionnelle et en préparation culinaire, c'est une famille cosmopolite d'arbres, arbustes et herbacées qui contient environ 50 genres et 900 espèces (Richardson et al., 2000). En Algérie, 9 espèces végétales appartenant à 3 genres sont répertoriées dans diverses régions et classées selon leurs caractéristiques morphologiques (Quezel et Santa, 1963).

### 1.2. Classification

La classification des plantes de la famille des *Rhamnaceae* est la suivante (Tab. 1) (MobileReference, 2008).

**Tableau 1 :** Classification scientifique de *R. alaternus*

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Rhamnales
Famille	<i>Rhamnaceae</i>
Genre	<i>Reynosia</i>
Sous genre	<i>Rhamnus</i>
Espèce	<i>Rhmanus alaternus</i>
Sous espèce	<i>R. alaternus eu-alaternus</i> Maire (Quezel et Santa, 1963)

### 1.3. Caractéristiques morphologiques

*Rhamnus alaternus* L. est un Arbuste toujours vert, parfois très grand, à feuilles luisantes, ovoïdes ou lancéolées, sont alternes, lisses, pétiolées (3-6 cent, sur 2-3), à bords cartilagineux et dentées, Elles restent sur l'arbre pendant deux années environ, coriaces, à nervure médiane épaisse, trinervées à la base; stipules linéaires, caduques; grappes axillaires plus longues que le pétiole, multiflores; fleurs dioïque verdâtres, disposées en grappes denses, tétra-pentamères, pétales nuls, très petites; baie ou fruit petite c'est est une drupe à 2 ou 3 sillons extérieurs, rouge puis noire, à 4 noyaux , partout, broussailles, haies (Battandier et al., 1888). La tige est dressée et rameuse ; les rameaux sont alternes, non épineux (Fig. 1 et 2) (Chancerel, 1920).

La croissance de *R. alaternus* est lente, sa longévité considérable. Son bois est à fibre courte et cassante, très lourd, très homogène, d'un grain fin, blanc jaunâtre à l'état d'aubier, brun clair ou foncé à l'état parfait comme le chêne. Il prend beaucoup de retrait et exhale, quand on le travail, une odeur désagréable (Mathieu, 1860).



**Figure 1 :** *Rhamnus alaternus* L. (Penzig, 1902).



**Figure 2** : Fleures, nectar, fruits et pollen de *R. alaternus* (Aronne et Wilcock, 1995).

**a** : Fleure male, **b** : Fleure femelle, **c** : vue des grains de pollen, **d** : vue d'un nectar avec les stomates modifiés, **e** : vue des tubes de pollen dans le canal du pistil après la décoloration avec du bleu d'aniline, **f** : fruits rouges et noirs montrant le changement d'agrandissement et de couleur des fruits pendant la maturation, Barres : a et b = 1 mm, c et d = 10  $\mu$ m, f = 1 cm.

## 1.4. Nomenclature

En arabe : Am'lile'ce, M'lila, Soitfaïr, Oud El-khir ou bien Safir. En Kabyl : Mélilés (Bhourri et *al.*, 2012; Debeaux, 1984). En anglais : Buckthorn. En Français : Nerprun, En Allemand : Kreülzdorn. En Espagnol : Aladierna, Cosco Unia, Sanguino de Andalucia. En Italien : Alaterno, Legno Puzzo (Gubb, 1913).

## 1.5. Ecologie et répartition géographique

Cet arbrisseau est caractéristique de la zone littorale et, uni aux lentisques, à l'arbousier, au myrte et à d'autres plantes à feuilles persistantes, il joue un rôle important dans la composition des maquis qui couvrent une bonne partie du littoral et des îles de la Méditerranée. En France, il se trouve encore dans l'Isère, l'Ardèche, l'Aveyron, le Lot, la Vienne, le Maine-et-Loire et en Bretagne (Penzig, 1902). *R. alaternus* habite les coteaux secs et calcaires du Sud de la France, de la Corse, de l'Algérie, du Nord de la Tunisie (Ben Ammar et *al.*, 2008; Chancerel, 1920).

## 2. Usage traditionnel

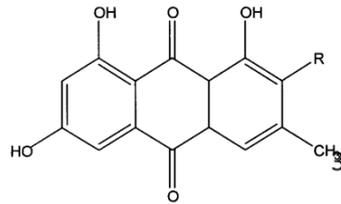
En médecine traditionnelle *R. alaternus* a été employé en tant que digestif, diurétique, laxatif, hypotensif et pour le traitement des complications hépatiques et dermatologiques (Bhourri et *al.*, 2012). Les baies de *R. alaternus* ont une action purgative, d'une saveur âpre, employés en médecine vétérinaire (Gubb, 1913). Les feuilles en infusion constituent des gargarismes astringents (Chancerel, 1920). A cause de son feuillage persistant, touffu et sombre, *R. alatenms* est souvent cultivé dans les parcs, comme plante ornementale, pour former des passifs ou des haies compactes; il fait un très joli effet, surtout lorsqu'il est chargé de ses fruits qui sont des baies globuleuses, luisantes et rouges. Son bois, d'un grain fin et compact, peut servir à des travaux de menuiserie (Penzig, 1902), c'est un petit arbrisseau charmant, très recherché pour la décoration des jardins et des bosquets. Il fleurit vers la fin du printemps (Bergeret et *al.*, 1909).

## 3. Propriétés biochimiques

L'étude phytochimique sur les extraits de la partie aérienne et les racines de *R. alaternus* a révélé La présence de diverses quantités d'antraquinones, de coumarines, de tannins et en particulier des flavonoïdes (Ben Ammar et *al.*, 2008).

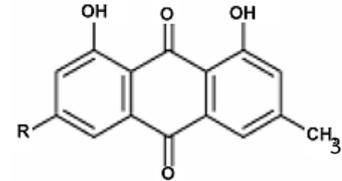
Généralement, les espèces du genre *Rhamnus* contiennent des anthraquinones telles que l'émodine ou chrysophanol (Wei et *al.*, 1992), leurs formes réduites ou leurs glycosides (Abegaz et Peter, 1995), tandis que d'autres contiennent des flavonoïdes (Marzouk et *al.*, 1999). Trois flavonoïdes tri-glycosidiques ont été isolés à partir des feuilles de *R. alaternus*, le

Kaempferol 3-O-β-isorhamminoside, rhamnocitrin 3-O-β-isorhamminoside et le rhamnetin-3-O-β-isorhamminoside, en revanche, trois flavonoïdes aglycones ont été identifiés : l'apigénine, le kaempferol et la quercétine (Ammar *et al.*, 2009). Dans une autre étude quatre anthraquinones aglycones ont été isolées (Fig. 3) à partir de la partie aérienne de la plante : l'émodyne était l'aglycone le plus abondant, il a été trouvé dans toutes les parties examinées de la plante, en même temps, c'est la seule aglycone détectée dans les graines et dans le péricarpe mûr, le Chrysophanol existe abondamment dans les parties les plus jeunes de la plante mais totalement absent dans les feuilles entièrement mûres. Alaternin atteint sa concentration maximale dans l'écorce. Le quatrième anthraquinone, le Physcion a été trouvé dans toutes les parties de la plante à l'exception des graines et du péricarpe mûr (Abou-chaar et Shamlian, 1980).



R = H Emodine

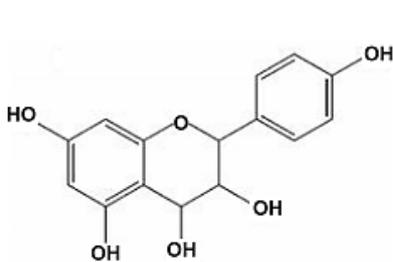
R = OH Alaternine (Bortolomeazzi *et al.*, 2007)



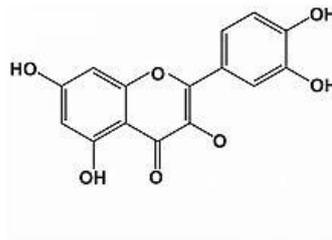
R = OCH<sub>3</sub> Physcion

R = OH Emodine

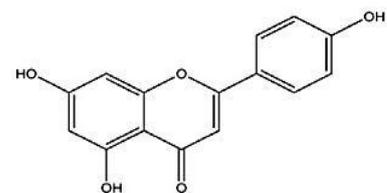
R = H Chrysophanol (Jain et Patil, 2010)



Kaempferol (Jain et Patil, 2010)



Quercétine (Jain et Patil, 2010)



Apigénine (Kawasaki *et al.*, 2010)

**Figure 3 :** Structures chimiques de quelques flavonoïdes de *R. alaternus*.

# Chapitre II

## LES POLYPHENOLS

## 1. Les composés phénoliques

### 1.1. Généralités

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement.

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (Urquiaga et Leighton, 2000).

Les composés phénoliques peuvent constituer des signaux de reconnaissance entre les plantes, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel, D'un point de vue thérapeutique, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales (Macheix et *al.*, 2005).

### 1.2. Biosynthèse des composés phénoliques

#### 1.2.1. La voie de Shikimate

C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde (Yao et *al.*, 1995).

#### 1.2.2. La voie des phénylpropanoïdes

La voie de phénylpropanoïde commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose.

#### 1.2.3. La voie de biosynthèse des flavonoïdes

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, possèdent le même élément structural de base, L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation, catalysée par la chalcone synthase, d'une unité phényle propanoïde avec trois

unités malonyl-CoA. Cette chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la synthèse des divers flavonoïdes (Bruneton, 1999).

### **1.3. Principales classes des polyphénols**

#### **1.3.1. Les acides phénoliques simples**

##### *1.3.1.1. Acides hydroxycinnamiques*

Dérivent de l'acide cinnamique et ont une structure générale de base de type (C6-C3). Existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent une réactivité chimique importante de ces molécules (Fig. 4).

##### *1.3.1.2. Acides hydroxybenzoïques*

Sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure générale de base de type (C6-C1). Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides. Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans la figure (5).

##### *1.3.1.3. Coumarines*

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique (Fig. 6).

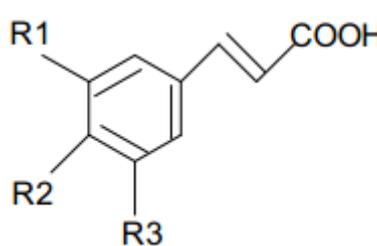
	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>Acides phénoliques</b>
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

Figure 4 : Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

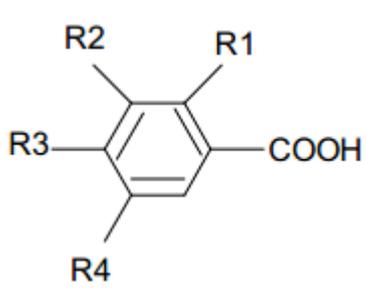
	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>Acides phénoliques</b>
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

Figure 5 : Principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

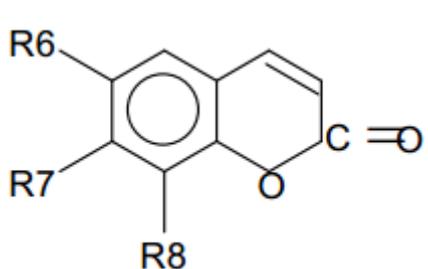
	<b>R6</b>	<b>R7</b>	<b>R8</b>	<b>Acides phénoliques</b>
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescutol
	OCH3	OH	H	Scopolétole
	OCH3	OH	OH	Fraxétole
	H	OH	OH	Daphnétole

Figure 6 : Principaux types de coumarines (Macheix et al., 2005).

### 1.1.1. Les flavonoïdes

#### 1.1.1.1. Généralités

Le nom flavonoïde proviendrait du terme *flavedo*, désignant la couche externe des écorces d'orange (Piquemal, 2008), cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du *flavus* ; (*flavus* = jaune) (Male\_Éev et Kunti\_ç, 2007).

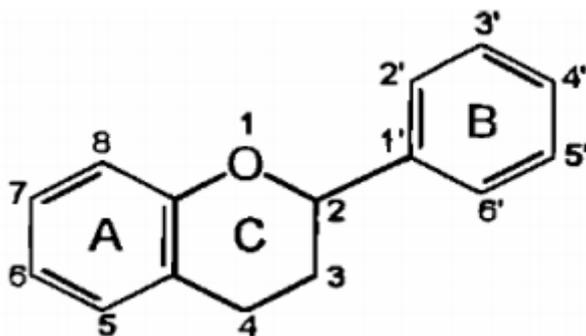
Les flavonoïdes ont été désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes (Nijveldt et *al.*, 2001).

Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "french paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées, Près de 4000 flavonoïdes ont été décrits (Ghedira, 2005).

#### 1.1.1.2. Structure chimique et classification

La structure de base des flavonoïdes est le noyau du flavone (2-phenyl-benzo- $\gamma$ -pyrane) mais de point de vue classification, le groupe des flavonoïdes peut être divisé en plusieurs catégories. Cette division dépend de l'hydroxylation du noyau du flavonoïde aussi bien que du sucre lié.

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, et de ce fait, possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement phenyl-2 chromane. (Fig. 7) Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation de noyau pyranique central (Krishna et *al.*, 2001).



**Figure 7** : Structure chimique de base des flavonoïdes (Krishna et *al.*, 2001).

### 1.1.1.3. Localisation et distribution des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal. On signale environ 2% de la proportion du carbone photosynthétique global incorporé dans la biosynthèse flavonique. Ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs. De plus, leur localisation au sein de la plante est caractéristique. En effet, les flavonoïdes sont omniprésents dans les organes aériens jeunes où ils sont localisés dans les tissus superficiels (Remy et *al.*, 1996).

Au niveau cellulaire, on a observé que les flavonoïdes, sous forme d'hétérosides, sont dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux. Lorsque les flavonoïdes sont présents dans la cuticule foliaire, il s'agit presque toujours de génines libres dont la lipophilie est accrue par la méthylation partielle ou totale des groupes hydroxyles (Bruneton, 1993).

En définitive, les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal. Ils sont largement abondants dans les légumes feuillés (salade, choux, épinards, etc.), ainsi que dans les téguments externes des fruits. On les trouve principalement dans les agrumes : citrons, orange, pamplemousses et dans une moindre mesure : abricots, cerises, mûres, raisins, papayes, tomates et sarrasin. On en trouve également en quantité importante dans nombreuses plantes médicinales et très spécifiquement dans les herbes aromatiques comme le thym, le persil, le romarin et le céleri (Bronner et Beecher, 1995).

### 1.1.1.4. Biodisponibilité des flavonoïdes

Les effets des flavonoïdes sur la santé ne dépendent pas seulement de leurs niveaux de consommation mais aussi de leur biodisponibilité. Peu d'études systématiques ont été menées sur la pharmacocinétique des flavonoïdes chez l'homme. Toutefois, d'après des expériences menées sur des flavonoïdes provenant de l'alimentation, il apparaît que seuls les flavonoïdes sous forme de génines (ou aglycones) sont susceptibles d'être absorbés. L'hydrolyse des liaisons hétérosidiques (reliant la génine à la chaîne sucrée) n'intervient que dans le côlon où les micro-organismes dégradent simultanément les flavonoïdes d'origine alimentaire. Le foie est largement impliqué dans le métabolisme des flavonoïdes absorbés, Une meilleure connaissance de la biodisponibilité des flavonoïdes est indispensable pour expliquer leurs effets protecteurs sur la santé (Walle, 2004).

### 1.1.1.5. Quelques propriétés des flavonoïdes

Les flavonoïdes protègent les plantes contre les radiations UV, elles sont également impliquées dans les processus de défense de la plante contre les infections bactériennes et virales. Agissent comme des pigments ou des co-pigments. Peuvent moduler la distribution d'auxine, comme elles fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire. Agis sur la régulation de l'élongation des tiges et interviennent dans la maturité des fruits. Sont à l'origine des goûts amers et astringents afin de repousser les animaux herbivores (Subramanian et *al.*, 2007).

## 1.1.2. Les tannins

### 1.1.2.1. Généralités

Les tannins sont des composés phénoliques très abondants chez les angiospermes, les gymnospermes (tannins condensés) et les dicotylédones (tannins hydrolysables). Ces composés ont la capacité de se combiner et de précipiter les protéines. Ces combinaisons varient d'une protéine à une autre selon les degrés d'affinités (Harborne, 1997).

Le terme tannin vient de la source de tannins utilisée pour le tannage des peaux d'animaux en cuir. Dans ce processus, les molécules de tannins se lient aux protéines par des liaisons résistantes aux attaques fongiques et bactériennes. Le poids moléculaire des tannins varie entre 500 et 2000 K Da (3000 pour les structures les plus complexes) (Hagerman et Butler, 1981).

Dans notre alimentation, l'astringence est la qualité organoleptique qui indique la présence des tannins. Elle a un rôle important dans le choix des aliments (corrélation inverse entre les espèces végétales choisies et leur teneur en tannins) (Larwence et *al.*, 1984).

### 1.1.2.2. Types et structures

Selon la structure, on a deux types de tannins : les tannins hydrolysables et les tannins condensés, dits aussi : proanthocyanidines.

#### 1.1.2.2.1. Les tannins hydrolysables

Sont formés par liaison de plusieurs acides galliques à un carbohydrate (généralement le glucose). On parle de gallotannins. Aussi des unités galloyles peuvent être ajoutées par liaisons esters, généralement en position C<sub>3</sub> de l'acide gallique. Et les unités d'acide gallique voisines s'accouplent formant les esters d'acide hexahydroxydiphénique, dits : ellagitannins.

Ces deux groupes, les gallotannins et les ellagitannins sont appelés tannins hydrolysables. Comme leur nom l'indique, ces composés peuvent être dégradés en fragments simples (acides phénols et sucres).

L'acide gallique provient de la  $\beta$ -oxydation des composés C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, comme l'acide coumarique ou les acides oxygénés correspondants. Mais, l'acide shikimique est considéré comme le meilleur précurseur (Seigler, 1998).

#### 1.1.2.2.2. Les tannins condensés

Ce sont des proanthocyanidines, composés phénoliques hétérogènes : dimères, oligomères ou polymères du flavanes, flavan-3-ols, 5-flavanols, 5-deoxy-3-flavanols et flavan-3,4-diols (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Les deux groupes majeurs des proanthocyanidines sont les procyanidines et les prodelphinidines. Les monomères constitutifs des procyanidines sont la catéchine et l'épicatéchine qui peuvent être substituées par l'acide gallique ou des sucres, généralement en position 3 ou plus rarement en position 7. Ces monomères de prodelphinidines sont la gallocatéchine et l'épigallocatéchine, mais on distingue également des monomères de quercétine et de myricétine (Andersen et Markham, 2006).

En s'hydrolysant, les tannins condensés ne donnent pas de composés simples comme le glucose ou les acides phénols comme c'est le cas pour les tannins hydrolysables, mais plutôt des anthocyanidines (Andersen et Markham, 2006).

#### 1.1.2.3. Propriétés pharmacologiques des tannins

Plusieurs observations, chez les humains comme chez les animaux de laboratoires suggèrent que les tannins exhibent un large spectre de propriétés pharmaceutiques, thérapeutiques et chimioprotectrices dues à leur propriété antiradicalaire (Tohge et al., 2005).

En effet, les tannins protègent contre les toxicités induites par différents agents (hydrogène peroxyde, acétaminophène, extraits contenus dans la fumée du tabac...), contre l'hypercholestérolémie et les changements de la formule sanguine (ALT, BUN et CK). Ils jouent aussi un rôle dans la prévention contre les deux formes de mort cellulaire connues, apoptose et nécrose, diminuant ainsi les dommages causés dans l'ADN lors de ces deux dernières. L'action cytoprotectrice des proanthocyanidines est supérieure à celle des vitamines C, B et bêta-carotène (Ray et al., 2000).

## 2. Activités biologiques

### 2.1. Activité antioxydante

De nos jours, Il existe un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire (Guinebert et *al.*, 2005).

#### 2.1.1. Définition d'un radical libre

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se réappairer, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique (Dacosta, 2003).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux libres primaires, qui dérivent directement de l'oxygène. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires (radical peroxyde ROO<sup>•</sup>, radical alkoxyde RO<sup>•</sup>), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Novelli, 1997).

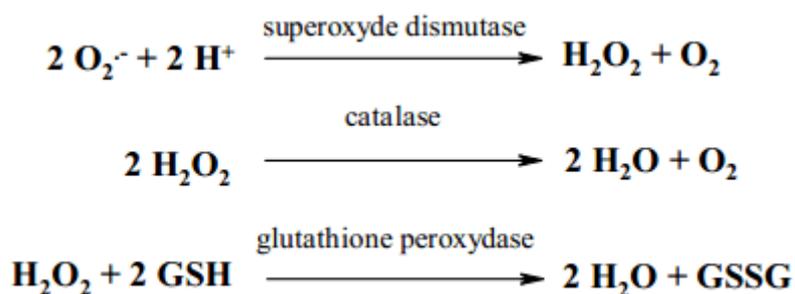
L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (ROS). Cette appellation n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, radical hydroxyl OH<sup>•</sup>, monoxyde d'azote NO<sup>•</sup>, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singulet <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxydinitrite ONOO<sup>-</sup> (Favier, 2003).

### 2.1.2. Les antioxydants

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS. Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (Favier, 2003).

#### 2.1.2.1. Les antioxydants primaires

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces. Cette ligne de défense est constituée de superoxyde dismutase (SOD), de catalase et de peroxydase (glutathion et ascorbate) (Favier, 2006). Ces enzymes antioxydantes permettent l'élimination des radicaux libres primaires, selon les réactions suivantes :

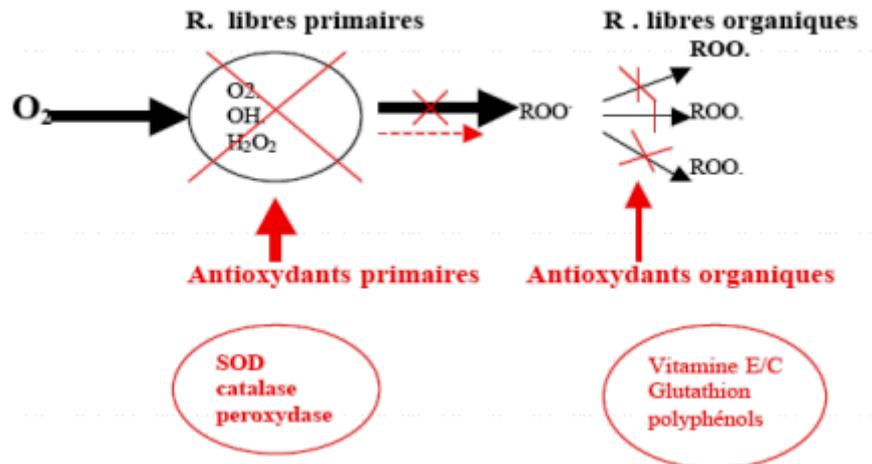


De ce fait elles préviennent la formation de radicaux libres organiques à partir des lipides membranaires notamment et contribuent donc à la protection des membranes de la peroxydation lipidique (Dacosta, 2003).

#### 2.1.2.2. Les antioxydants secondaires

Ce sont des molécules exogènes. Contrairement aux enzymes antioxydantes, une molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée par d'autres systèmes (Fig. 8) (Dacosta, 2003).

Plusieurs substances pouvant agir en tant qu'antioxydants in vivo ont été proposés. Elles incluent : la vitamine E, l'acide ascorbique, le  $\beta$ -carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques, ...etc. (Kohen et Nyska, 2002)



**Figure 8 :** les systèmes de défense contre les radicaux libres (Kohen et Nyska, 2002).

### 2.1.3. Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydant

Les ROS ont des rôles physiologiques très importants en agissant, à faibles concentrations, sur la régulation des réponses biologiques, la transduction du signal et autres voies de signalisation (Favier, 2003).

Dans l'ensemble de nos tissus sains, les défenses antioxydantes sont capables de faire face et détruire les radicaux produits en excès. On dit que la balance Oxydants /Antioxydants est en équilibre. Mais dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution, ...) ou d'une diminution des capacités antioxydantes (insuffisance d'apports des micronutriments antioxydants, inactivation enzymatiques) un déséquilibre entre la production des radicaux libres et le système de défense est à l'origine d'un état redox altéré de la cellule appelé stress oxydatif (Sohal et *al.*, 2002).

Pour enrayer le stress oxydant, il faut donc aider la cellule et l'organisme par l'apport d'antioxydants secondaires (vitamine C, E, caroténoïdes, polyphénols) (Kohen et Nyska, 2002).

### 2.1.4. Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (Favier, 2006).

## 2.2. Activité antimicrobienne

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux. Pour résister à ces micro-organismes de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut schématiquement en distinguer 3 groupes : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise (Kaufmann, 1997).

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (Billing et Sherman, 1998).

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhesines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

### 2.2.1. Les principales substances antimicrobiennes

#### 2.2.1.1. Les antibiotiques

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques (Bergogne-Berezin et Dellamonica, 1995).

#### 2.2.1.2. Les composés phénoliques

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobienne des polyphénols. A l'heure actuelle, cet effet est certain et démontré par de nombreuses recherches expérimentales. Les études du pouvoir inhibiteur des flavonoïdes sur la croissance bactérienne ont démontré que de nombreux composés flavoniques (apigénine, kaempférol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif (*Escherichia coli*) et Gram positif (*Staphylococcus aureus*) (Ulanowska et al., 2007).

Des flavonoïdes, une flavone et une flavanone, respectivement isolés des fruits de *Terminalia bellerica* et de l'arbuste *Eysenhardtia texana* ont été montré comme possédant

l'activité contre le microbe pathogène opportuniste *Candida albicans* (Wächter et al., 1999). Deux autres flavones isolés de la plante *Artemisia giraldi* ont été rapportés exhiber une activité contre l'espèce *Aspergillus flavus* une espèce de mycète qui cause la maladie envahissante chez les patients immunosuppresseurs (Valsaraj et al., 1997).

## 2.2.2. Micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiennes

### 2.2.2.1. *Escherichia coli*

C'est une bactérie à Gram négatif, commensal du tube digestif de l'homme et de l'animal, (Kaper et al., 2004), de forme non sporulée, de type aérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm, *E. coli* représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës d'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été, diarrhée infantile et les intoxications alimentaires (Percival, 2004).

### 2.2.2.2. *Staphylococcus aureus*

Ce sont des cocci Gram positif avec un diamètre de 0,5 à 1,5 µm, de forme non sporulée, qui tendent à se grouper en paires, petites chaînes, elles sont habituellement non capsulée, ou possédant des capsules limitées, elles sont anaérobies facultatives. *Staphylococcus aureus* représente l'agent commun des infections postopératoires de blessures, endocardite aiguë, intoxication alimentaire (Dworkin et Falkow, 2006).

### 2.2.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Ce sont des bacilles Gram négatif, de forme non sporulée, elles sont aérobies, mobiles grâce à la présence de 1 à 2 flagelles, ce type de bactérie synthétise de types principaux de pigments pyocyanine : bleue phénazine, pyoverdine: jaune vert, il s'agit de bactéries résistantes pour plusieurs antibiotiques (Percival, 2004). *Pseudomonas aeruginosa* est responsable de 16% des cas de pneumonie nosocomiale, 12% des infections urinaires, 8 % des infections suites aux blessures chirurgicales (Van Delden et Iglewski, 1998).

### 2.2.2.4. *Candida albicans*

Actuellement, le genre *Candida* comprend 81 espèces de champignons levuriformes. *Candida albicans* est la plus souvent à l'origine de la plupart des manifestations pathologiques chez l'homme. On la rencontre habituellement, à l'état saprophytique, dans le tube digestif de l'homme et, par contiguïté, elle peut être retrouvée au niveau de la muqueuse vulvo- vaginal, (ou de la bouche). Mais on ne retrouve qu'exceptionnellement *Candida albicans* au niveau de la peau. Cette espèce est responsable de plus de 80 % des infections

connues sous le terme de candidose, comme les infections superficielles cutanées, infections superficielles muco- cutanées (Delorme et Robert, 1997).

#### 2.2.2.5. *Aspergillus sp*

*Aspergillus sp.* sont les espèces fongiques les plus communes qui sont capables de produire des mycotoxines dans les produits alimentaires. Les mycotoxines sont connues pour être une cause puissante capable de produire un cancer hépatique chez les animaux et les humains. La présence et la croissance des champignons peuvent entraîner la détérioration et la réduction de la qualité et la quantité des aliments (Rasooli et Abyaneh, 2004).

Dans différentes parties du monde, il y a une inquiétude croissante au sujet de la contamination des aliments, l'exposition environnementale et professionnelle aux spores fongiques de différentes espèces, en particulier à l'aflatoxine produit par ces espèces fongiques comme le cas d'*A. flavus* et *A. niger* (Takahashi et *al.*, 2004); qui sont des *ascomycète* filamenteux qui ont une distribution ubiquitaire dans l'environnement. Ils sont connus par ses implications dans les infections opportunistes humaines. Le mode de la transmission principal aux humains est par l'inhalation des conidies (Desai et Ghosh, 2003). En plus de l'inhalation, une voie secondaire de transmission a été rapportée soit par contact avec la peau ou à travers une blessure (Krishnan et *al.*, 2009).

**PARTIE**  
**EXPERIMENTALE**

# Chapitre III

## MATERIEL ET METHODES

## 1. Matériel

### 1.1. Matériel végétal

*Rhamnus alaternus* L. a été collectée au mois d'octobre 2010 dans la région de Bougaa située au nord de la wilaya de Sétif, l'identification botanique de l'espèce a été réalisée au niveau du département d'écologie et de biologie et physiologie végétale, Université Ferhat Abbas, Sétif. Un échantillon de référence est conservé au niveau du laboratoire.

### 1.2. Appareils et produits chimiques

#### Appareillage

- Balance de précision (Kern).
- Oscilateur (Prolabo).
- Rotavapeur (Büchi).
- Spectrophotomètre (type Spectronic 20 Genysis TM).

#### Réactifs

- Acide caféique (Sigma).
- Réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich).
- Acide linoléique (Merck).
- BHT (Sigma).
- $\beta$  - carotene (Sigma).
- DPPH (Sigma).
- Quercetine (Sigma).
- Tween 40 (Sigma).

### 1.3. Les souches microbiennes utilisées

#### 1.3.1. Les bactéries

Les souches utilisées sont des souches de référence de l'American type culture collection (ATCC), gracieusement fournies par le laboratoire de microbiologie des centres hospitalo-universitaires (CHU) de Sétif et Tlemcen puis conservées à 4 °C dans des tubes à essais contenant de la gélose inclinée.

##### 1.3.1.1. Les bactéries à Gram –

*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et *Proteus mirabilis* ATCC 35659.

### 1.3.1.2. Les Bactéries à Gram +

*Lysteria monocytogenes* ATCC 15313, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

### 1.3.2. Les champignons

La levure *Candida albicans* et les moisissures *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* sont respectivement obtenues du laboratoire de microbiologie CHU Sétif et du laboratoire de microbiologie appliquée université Ferhat Abbas Sétif.

## 2. Méthodes d'analyses

### 2.1. Préparation des extraits

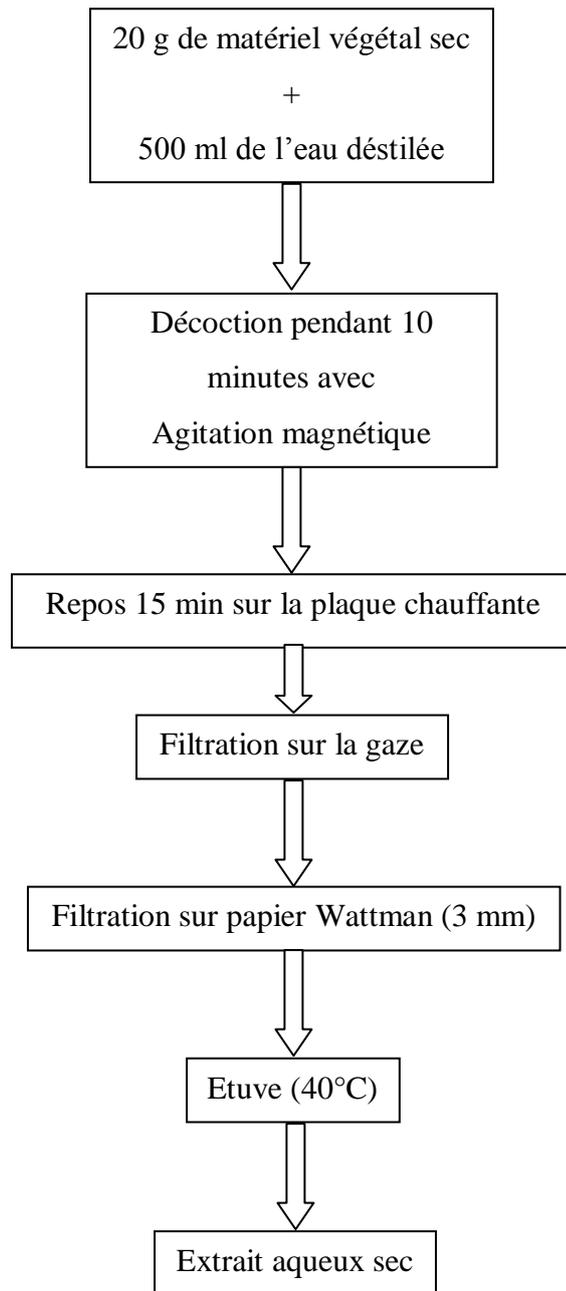
#### 2.1.1. Extrait aqueux

L'extrait aqueux de *R. alaternus* a été obtenu par décoction de 20 g de broyat de la partie aérienne de la plante (tiges et feuilles) ou de racines dans 500 ml d'eau distillée pendant 10 min sous agitation magnétique. La solution est laissée reposer sur la plaque chauffante pendant 15 minutes, le mélange est d'abord filtré sur une gaze et ensuite sur papier Whatman (n°3). Des aliquotes du filtrat sont placées dans une étuve à 40 °C pendant 24 h pour sécher. L'extrait sec est conservé au réfrigérateur (Fig. 9) (Belhattab et al., 2004; Ben Ammar et al., 2007).

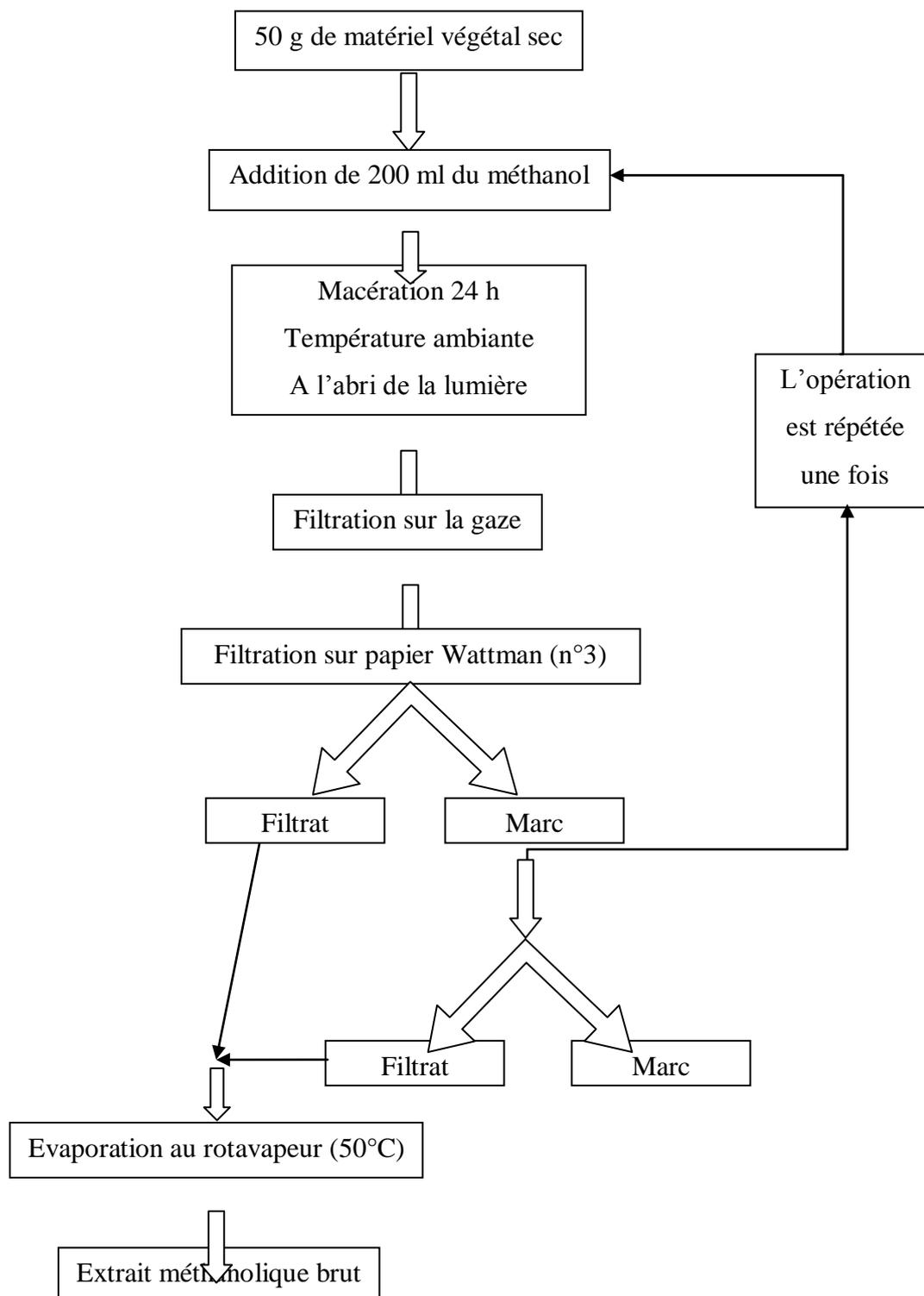
#### 1.1.1. Extrait méthanolique

##### 1.1.1.1. Extrait méthanolique de la partie aérienne

L'extrait méthanolique de la partie aérienne de *R. alaternus* a été préparé à partir de 50 g de broyat des tiges et des feuilles, qui ont été mis à macérer dans 200 ml de méthanol à la température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 24 heures, avec un maximum d'agitation. Ensuite le mélange est filtré sur la gaze et une deuxième fois sur papier Whatman (n°3). L'opération est répétée une seconde fois sur le marc. Les filtrats obtenus sont additionnés et évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif "BÜCHI" à une température de 40 - 50 °C. L'extrait sec est conservé au réfrigérateur (Fig. 10) (Belhattab et al., 2004; Ben Ammar et al., 2008).



**Figure 9 :** Protocole de préparation de l'extrait aqueux (Belhattab et *al.*, 2004).



**Figure 10** : Protocole de préparation de l'extrait méthanolique de la partie aérienne par macération (Belhattab et *al.*, 2004).

### 1.1.1.2. Extrait méthanolique des racines

L'extrait méthanolique des racines de *R. alaternus* a été préparé à l'aide d'un Soxhlet à partir de 50 g de racines broyées, Le matériel végétal broyé est placé dans une cartouche qui sera exposée au solvant d'extraction mené à une température d'évaporation (40 °C). Après environ 6 cycles d'extraction, la cartouche est retirée et le solvant chargé d'extrait de la plante est récupéré pour être concentré à sec sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif "BÜCHI". l'extrait est conservé au réfrigérateur jusqu'à son utilisation (Fig. 11) (Belhattab et *al.*, 2004; Bruneton, 1999).



**Figure 11** : Système d'extraction au Soxhlet.

## 1.2. Analyse chimique

### 1.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et *al.*, 1999).

#### 1.2.1.1. Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et phosphomolibdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ), (Ribéreau-Gayon et *al.*, 1972). Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 760 nm.

#### 1.2.1.2. Mode opératoire

Mettre 20  $\mu$ l de chaque extrait de *R. alaternus* dans des tubes à essais ; ajouter 1.58 ml d'eau distillée et 100  $\mu$ l de réactif de Folin-Ciocalteu dilué dans  $H_2O$  distillée (v/v) dans chaque tube; agiter vigoureusement puis laisser agir 6 min avant d'ajouter 300  $\mu$ l de carbonate de sodium à 7.5%.

Après 2 heures d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible (Spectronic 20 Genysis TM) à 760 nm.

Effectuer la même opération pour l'acide caféique à différentes concentrations en introduisant 20  $\mu$ l de ces dernières dans une série de tubes et ajout des autres réactifs.

Le blanc est représenté par l'éthanol additionné du Folin-Ciocalteu, de l'eau distillée et de carbonate de sodium.

Toutes les mesures sont réalisées en triplicata.

Les concentrations des polyphénols totaux contenus dans les extraits de *R. alaternus* sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide caféique comme standard.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent en acide caféique/ g de matière fraîche.

### 1.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les extraits de *R. alaternus* est réalisée par la méthode de Bajorun et *al.* (1996).

#### 1.2.2.1. Principe

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer

et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (Ribéreau-Gayon et *al.*, 1972).

#### 1.2.2.2. Mode opératoire

Mettre 1 ml d'extrait de *R. alaternus* dans un tube à essai ; Ajouter 1 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 2 % ; laisser incuber 15 min à température ambiante.

Lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible (Spectronic 20 Genysis TM) à 430 nm.

Effectuer la même opération pour la quercétine à différentes concentrations en introduisant 1 ml de ces dernières dans une série de tubes et ajout de 1 ml d'AlCl<sub>3</sub> à 2%.

Le blanc est représenté par l'éthanol additionné à l'AlCl<sub>3</sub>, toutes les opérations sont réalisées en triplicata.

Les concentrations des flavonoïdes contenus dans les extraits de *R. alaternus* sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard, les résultats sont exprimés en mg équivalent en quercétine/ g de matière fraîche.

### 1.2.3. Dosage des flavones et flavonols

La méthode utilisée pour l'estimation de taux de flavonols est celle décrite par (Kosalec et *al.*, 2004).

#### 1.2.3.1. Mode opératoire

Mettre 0.50 ml d'extrait de *R. alaternus* dans un tube à essai ; ajouter 1.5 ml d'éthanol, 0.1 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 10 % puis 0.1 ml d'acétate de sodium et 2.8 ml d'eau, laisser incuber 30 min à température ambiante.

Lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible (Spectronic 20 Genysis TM) à 415 nm.

Toutes les opérations sont réalisées en triplicata.

La concentration des flavones et flavonols contenus dans les extraits de *R. alaternus* est calculée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent en quercétine/ g de matière fraîche.

### 1.3. Activité antioxydante

#### 1.3.1. Test qualitatif au $\beta$ -carotène

##### 1.3.1.1. Principe

Ce test permet de mettre en évidence le pouvoir antioxydant des extraits de *R. alaternus*. En effet, l'acide linoléique oxydé en radical peroxy agit sur le  $\beta$ -carotène de couleur orange qui devient incolore. La présence d'antioxydant, extrait de plante par exemple inhibe cette décoloration dans le milieu gélosé (Graven et al., 1992).

##### 1.3.1.2. Mode opératoire

Préparer le milieu gélosé, dans un bécher, en dissolvant 0,75 % (m/v) d'agar dans l'eau distillée ; chauffer en agitant sur une plaque chauffante. Laisser refroidir jusqu'à environ 50°C, y transvaser 7,5 ml de solution acétonique de  $\beta$ -carotène (1 mg/ ml) et 1,5 ml de solution éthanolique d'acide linoléique (5  $\mu$ l/ ml d'éthanol) ; couler dans des boîtes Pétri ; laisser solidifier puis creuser des puits et y verser 30  $\mu$ l de chaque extrait (1mg/ml) de *R. alaternus*. Laisser incubé 3 à 4 h à 45°C (Belhattab, 2007).

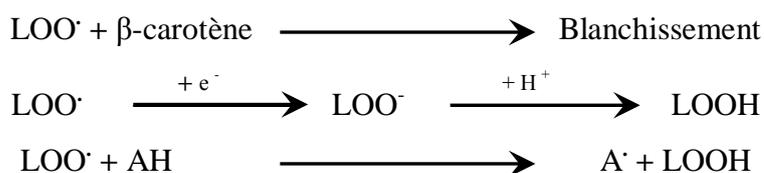
Dans des boîtes témoins les extraits sont remplacés par la quercétine et le BHT (témoins positifs), l'éthanol (témoins négatifs).

Une zone de rétention de la couleur orange autour des puits indique l'activité antioxydante des extraits.

#### 1.3.2. Test de blanchissement du $\beta$ – carotène

##### 1.3.2.1. Principe

L'activité antioxydante des quatre extraits de *R. alaternus* est mesurée selon la méthode de (Tepe et al., 2006), L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder le  $\beta$ -carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie par spectrométrie à 470 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du  $\beta$ -carotène. Dans ce test la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative de  $\beta$ -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique (Tepe et al., 2006).



### 1.3.2.2. Mode opératoire

Dissoudre 2 mg de  $\beta$ -carotène dans 1 ml de chloroforme. La solution obtenue est introduite dans un ballon contenant 2 mg d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Après évaporation du chloroforme, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés avec agitation vigoureuse. De cette nouvelle solution 2.5 ml sont transférés dans des tubes auxquels sont additionnés 350  $\mu$ l de chaque extrait ou de BHT (2 mg/l).

Un tube contenant 2.5 ml d'émulsion et 350  $\mu$ l d'éthanol servira de témoin négatif.

L'absorbance est immédiatement mesurée à 470 nm, D'autres lectures sont faites à différents intervalles de temps (2h, 4h, 6h, 12h, et 48h) (Tepe et *al.*, 2006), Toutes les mesures sont réalisées en triplicata.

L'activité anti-oxydante relative après 48 heures est calculée selon la relation suivante :

$$\text{AAR} = (\text{Abs Échantillon} / \text{Abs BHT}) \times 100$$

Où :

- AAR : activité anti-oxydante relative.
- Abs Échantillon : absorbance de l'échantillon après 48 heures.
- Abs BHT : absorbance du BHT après 48 heures.

### 1.3.3. Test au DPPH

#### 1.3.3.1. Principe

Le test au 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle (DPPH $\cdot$ ) est réalisé par la méthode décrite par (Ammar et *al.*, 2009) qui permet de mesurer le pouvoir réducteur par le calcul de la CI<sub>50</sub> des substances antioxydantes contenues dans un extrait. Le DPPH est un radical libre de couleur violette qui devient jaune quand il est réduit par un donneur de proton H $^+$ .



Où AH est un composé capable de céder un H $^+$  au radical DPPH.

#### 1.3.3.2. Mode opératoire

Une solution éthanolique de 0,06 mM de DPPH $\cdot$  est mélangée avec différentes concentrations des extraits de *R. alaternus* (1, 3, 10, 30, 100  $\mu$ g/ml), Mettre 1ml de chaque dilution de ces extraits dans un tube à essai, ajouter 1ml de solution éthanolique de DPPH, puis laisser incuber 30 min à l'abri de la lumière à température ambiante. Lire l'absorbance à 517 nm contre un blanc qui contient de l'éthanol pur.

Répéter les mêmes opérations, en remplaçant l'extrait de *R. alaternus* par le BHT (control positif) et l'éthanol pur (control négatif).

Toutes les opérations sont réalisées en triplicata.

L'évaluation de l'activité anti-oxydante en utilisant la méthode DPPH est exprimée en pourcentage selon la relation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{Abs Control} - \text{Abs Extrait})}{\text{Abs Extrait}}$$

Le pourcentage d'inhibition est exprimé ensuite par la valeur de la  $CI_{50}$ , sachant que l' $IC_{50}$  est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH.

## 1.4. Activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion de disque où les disques sont imbibés de 10  $\mu$ l de chaque extrait (Sokmen *et al.*, 2004).

### 1.4.1. Activité antibactérienne

#### 1.4.1.1. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture approprié à cette étude est le milieu Muller-Hinton préparé comme suit :

Dissoudre 38 g de la gélose Muller-Hinton (Annexe I) dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis auto-claver pendant 15 minutes à 121°C et finalement couler le milieu dans les boîtes de Pétri.

#### 1.4.1.2. Stérilisation du matériel

L'eau distillée, le milieu de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

#### 1.4.1.3. Préparation des dilutions d'extraits de *R. alaternus*

Les extraits de *R. alaternus* ont été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives au demi, sachant que la concentration de la solution mère de chaque extrait est de 200 mg/ml.

#### 1.4.1.4. Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes sontensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. Décharger l'anse dans 10 ml d'eau distillée stérile, La suspension bactérienne est bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland (annexe 05) ou à une DO de 0.08 à 0.10 à 625 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

#### 1.4.1.5. *Ensemencement et dépôt des disques*

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées.

L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche. Les disques imprégnés d'extraits sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile.

De même les antibiogrammes réalisés avec des disques contenant des antibiotiques (témoin positif) appropriés prêts à l'emploi ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des extraits testés et les disques Wattman imprégnés de DMSO (témoin négatif).

Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C.

#### 1.4.1.6. *Lecture des antibiogrammes*

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques.

#### 1.4.1.7. *Détermination des CMI et CMB*

Pour les concentrations minimales inhibitrices (CMI), il s'agit de déterminer les plus petites concentrations auxquelles les extraits présentent encore une activité antibactérienne visible à l'œil nu. Des dilutions successives au demi ont permis de préparer une gamme de dilution allant de 200 à 0,095 mg/ml pour les extraits, en effet de chaque dilution on prélève 10 µl et on la met dans les disques qui sont déjà dans les boîtes de Pétri. Après détermination de la CMI, pour la détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB) un prélèvement à l'anse est réalisé autour chacun des disques ne présentant aucune culture visible. Chaque prélèvement est déposé en strie sur gélose Mueller-Hinton. La boîte ensemencée est incubée 24 heures à 37°C.

### **1.4.2. Activité antifongique**

Les mêmes opérations sont effectuées avec les souches des champignons, mais dans ce cas le milieu de culture utilisé est le milieu Sabouraud (Annexe I). Les champignons sont activés pendant 7 jours dans des boîtes de Pétrie à une température de 28°C avant le test, après incubation l'inoculum des champignons est préparé et l'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri coulés qui contiennent du Sabouraud.

La lecture des antibiogrammes est faite après 72 heures d'incubation à 28°C.

# Chapitre VI

## RESULTATS ET DISCUSSION

## 1. Résultats et discussion

### 1.1. Rendements des extractions

#### 1.1.1. La macération

L'opération de l'extraction par macération de la partie aérienne EMTF (tiges et feuilles) de *R. alaternus* dans le méthanol a permis d'obtenir un résidu sec d'extrait brute avec un rendement de 11 % (m/m).

#### 1.1.2. La décoction

Les rendements des extraits respectifs de la partie aérienne EATF et des racines EAR après décoction ont été estimés à 6 % et 8 % (m/m).

#### 1.1.3. Extraction au Soxhlet

Le rendement de l'extrait méthanolique des racines EMR obtenu par Soxhlet a été estimé à 10 % (Fig. 12) (m/m).

Les rendements des extraits méthanoliques (10 et 11 %) sont supérieurs par rapport aux extraits aqueux (6 et 8 %), La différence de rendement entre les extraits est due aux techniques d'extraction utilisées, qui sont totalement différentes et à la composition chimique qui diffère d'un extrait à l'autre.

Dans une étude réalisée par Ben ammar et *al.* (2008) sur la même espèce originaire de Tunisie, des résultats similaires ont été trouvés. En effet la macération des feuilles dans le méthanol suivi par le butanol saturée en eau a donné un rendement de 9 % (m/m).

### 1.2. Composition chimique

#### 1.2.1. Teneur en polyphénols totaux

La détermination de la teneur en polyphénols totaux des différents extraits a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. La courbe montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations. Les quantités des polyphénols correspondantes de chaque extrait ont été rapportées en équivalent gramme d'acide caféique et déterminé par l'équation de type :  $y = 0,0031 x - 0,0898$  sachant que  $R^2 = 0,98$  (Fig. 13).

Les teneurs en polyphénols totaux (Fig. 14) des extraits méthanoliques EMTF et EMR sont 7 mg EAC/g de matière fraîche, relativement faibles par rapport aux extraits aqueux 19 et 36 mg EAC/g de matière fraîche pour EAR et EATF respectivement. Il paraît clairement que l'eau chaude est le solvant qui permet d'avoir un rendement en polyphénols totaux plus élevé

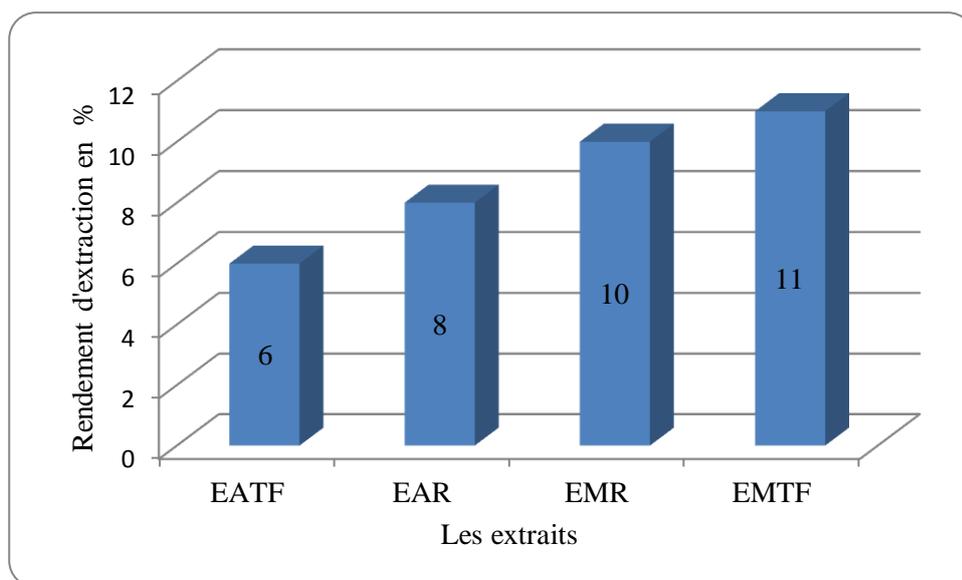
par rapport au méthanol, ce qui peut être expliqué par la lyse des cellules dans l'eau chaude et la libération d'un maximum de molécules poly-phénoliques.

Djeridane et *al.* (2007) ont trouvé une valeur assez proche de notre résultat avec une teneur en polyphénols de 6 mg EAG/ g de matière fraîche pour un extraits éthanolique de la partie aérienne de la même variété du nord de Laghouat.

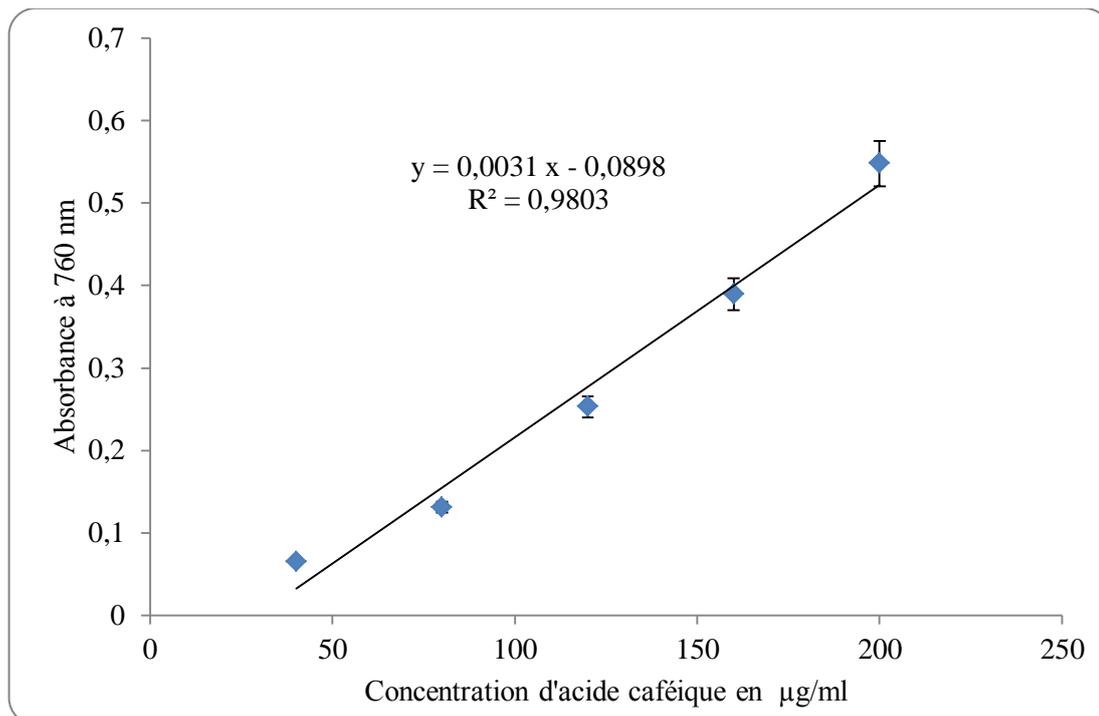
Nos résultats ressemblent à ceux trouvés par Ben ammar et *al.* (2008) sur la même espèce végétale. En effet, ils ont déterminé 7 mg EAG/ g de matière fraîche pour un extraits méthanoliques suivie par une extraction dans le butanol saturé en eau des écorces des racines, mais inférieure à une teneur de 13 mg EAG/ g d'un extrait méthanolique suivi aussi par une extraction dans le butanol saturé en eau des feuilles.

La faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines etc. (Gmez-Caravaca et *al.*, 2006; Vuorela, 2005).

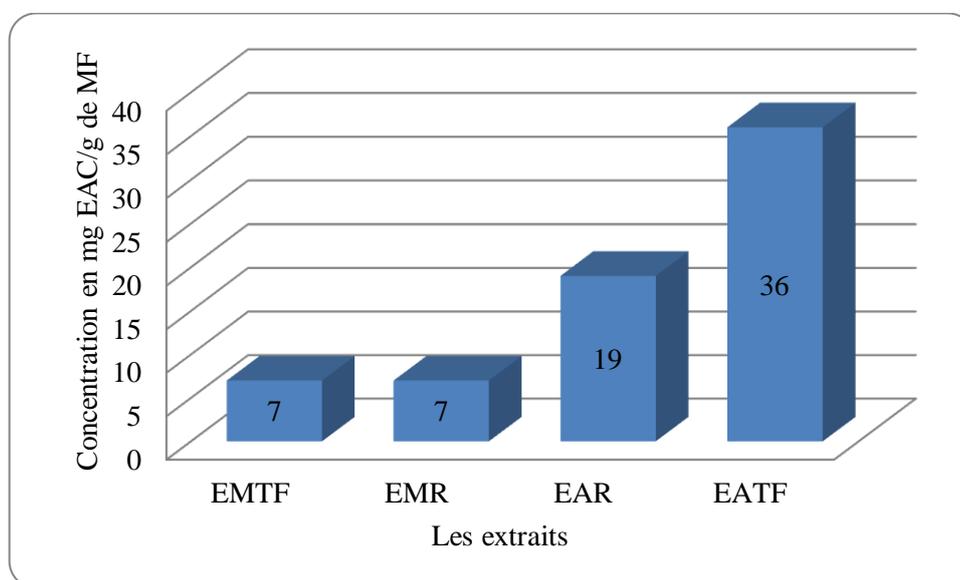
Le solvant d'extraction élu des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique (Djeridane et *al.*, 2007). Le dosage par ce réactif donne donc une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. Il n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé (Tawaha et *al.*, 2007).



**Figure 12 :** Comparaison des rendements des quatre extraits de *R. alaternus*.



**Figure 13 :** Courbe d'étalonnage d'acide caféique pour le dosage des polyphénols totaux.



**Figure 14 :** Teneurs en polyphénols des quatre extraits de *R. alaternus*.

### 1.2.2. Teneur en flavonoïdes

#### 1.2.2.1. Teneur en flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) et l'étalon été la quercétine (Fig. 15). La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière fraîche (mg EQ/g de MF). Les taux des flavonoïdes des quatre extraits ont été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage qui suit une équation de type :  $y = 0,0344 x + 0,0181$  sachant que  $R^2 = 0,9992$ .

Les concentrations des flavonoïdes (Fig. 16) sont relativement importants dans les extraits dans leur majorité, les teneurs en flavonoïdes sont de 18 mg EQ /g de matière fraîche dans l'extrait EATF suivie de celles de L'extraits EAR et EMTF avec 14 et 6 mg EQ /g de matière fraîche respectivement et enfin celle d'extrait EMR avec 5 mg EQ/g de matière fraîche.

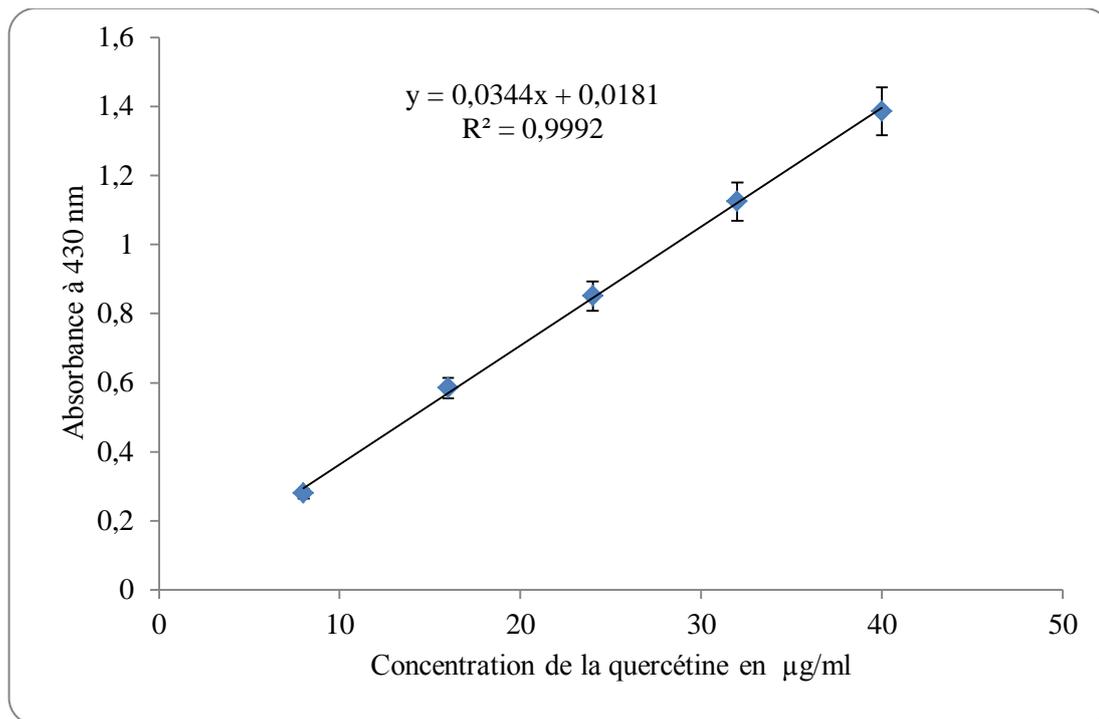
Ces résultats obtenus sont nettement supérieurs au résultat trouvé par Djeridane et *al.* (2007) qui est de 1 mg EQ/ g de MF pour un extrait éthanolique de la même variété de la région de Laghouat. De même, ils sont nettement supérieure aux résultats trouvés par Ben ammar et *al.* (2007) qui sont respectivement 28 et 21 mg EQ/100g de matière fraîche pour les extraits méthanolique et aqueux des feuilles de la même espèce de la région de la Tunisie. Mais légèrement inférieurs aux résultats trouvés par Ben ammar et al (2008) soit des teneurs de 15 et 20 mg EQ/g de matière fraîche pour des extraits méthanoliques des écorces des racines et des feuilles respectivement.

#### 1.2.2.2. Teneurs en flavones et flavonols

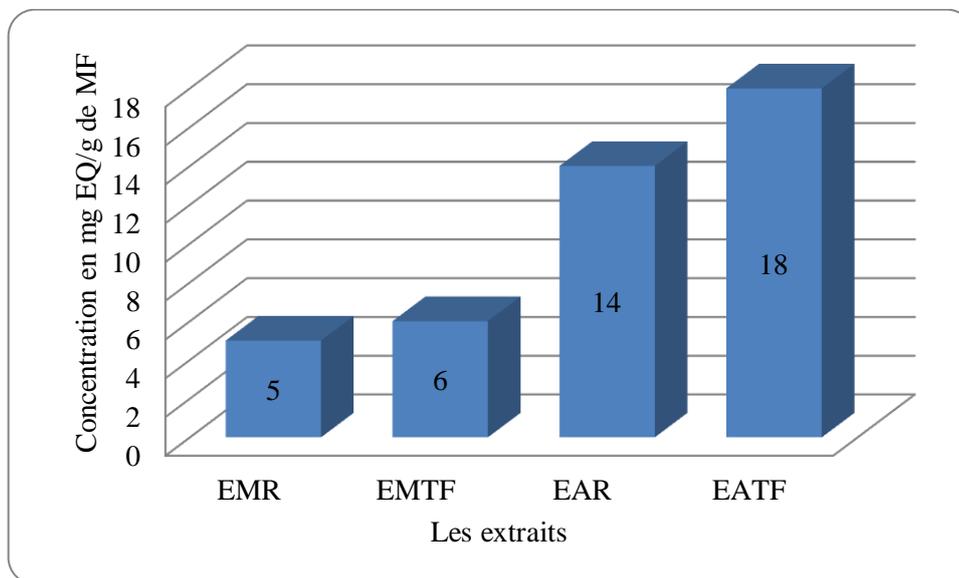
La quercétine a été utilisée comme étalon à différentes concentrations, La teneur en flavones et flavonols est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait). Le taux des flavones et flavonols des quatre extraits ont été obtenus à partir d'une courbe d'étalonnage (Fig. 17) qui suit une équation de type :  $y = 0,0344 x + 0,0181$  sachant que  $R^2 = 0,9992$ .

Les teneurs en flavones et flavonols (Fig. 18) des extraits aqueux EATF et EAR sont supérieurs comparés aux extraits méthanoliques EMTF et EMR 7 mg EQ/g et 6 mg EQ/g contre 2 mg EQ/g de matière fraîche respectivement.

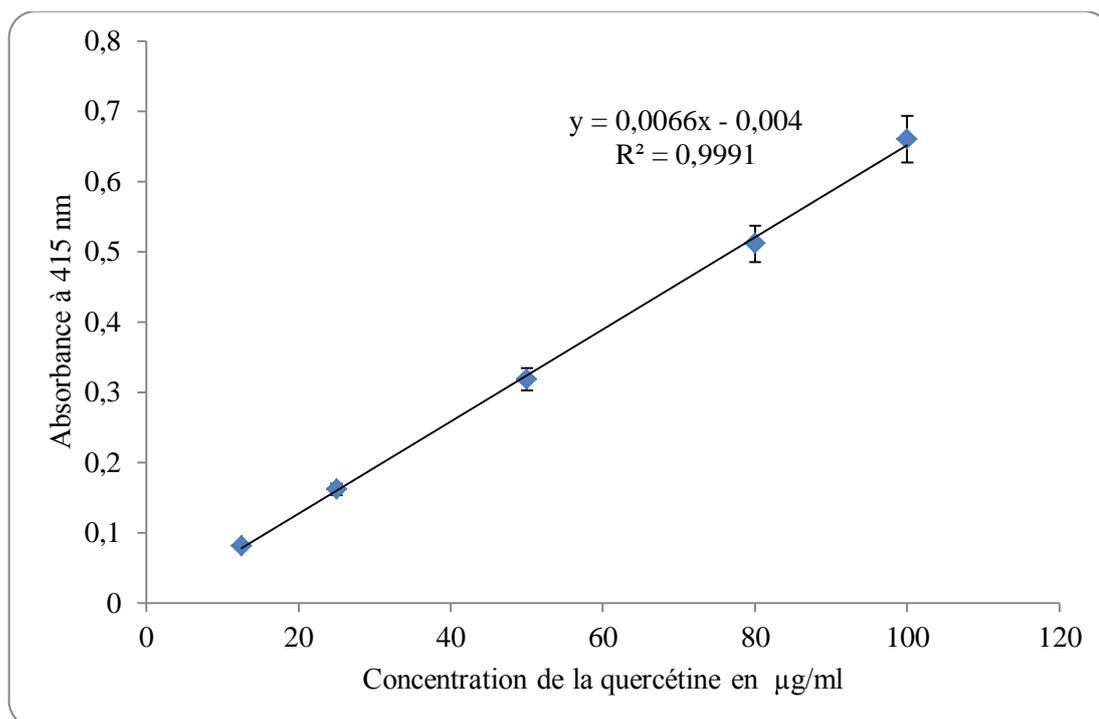
A notre connaissance, Aucun résultat sur le dosage des flavones et flavonols n'a été rapporté par d'autres auteurs sur *Rhamnus alaternus* pour pouvoir comparer nos résultats.



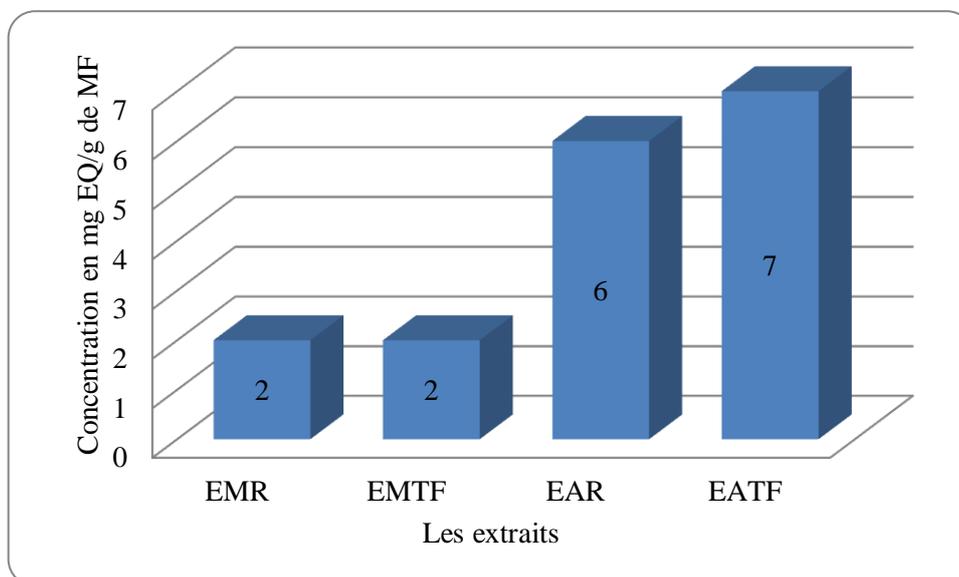
**Figure 15 :** Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.



**Figure 16 :** Teneurs en flavonoïdes totaux des quatre extraits de *R. alaternus*.



**Figure 17 :** Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavones et flavonoles.



**Figure 18 :** Teneurs en flavones et flavonols des quatre extraits de *R. alaternus*.

### 1.3. L'activité antioxydante et antiradicalaire

#### 1.3.1. Mise en évidence de l'activité antioxydante par la méthode du $\beta$ - carotène

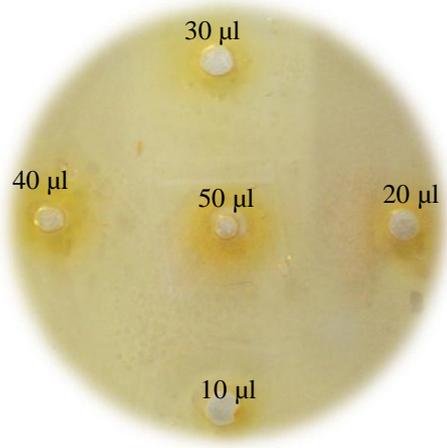
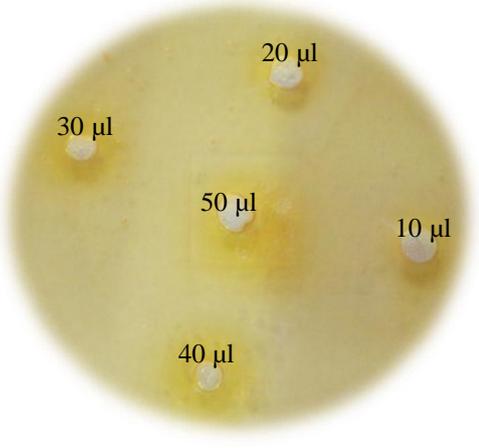
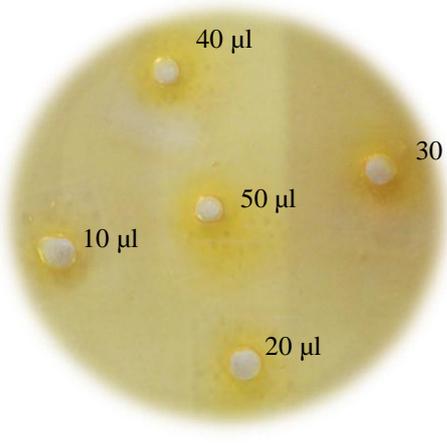
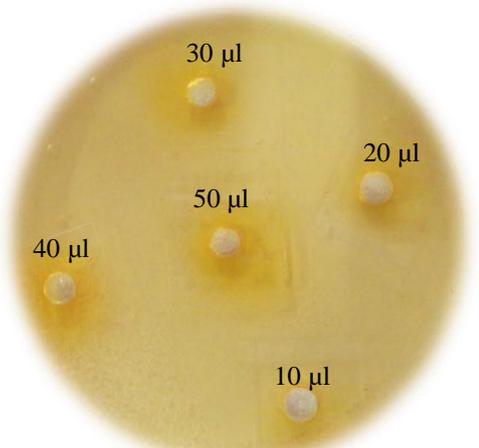
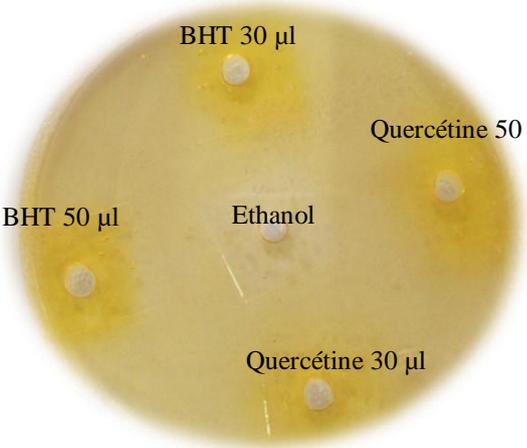
Le test de décoloration du  $\beta$  - carotène, nous a permis de percevoir des halos de couleur orange autour des puits contenant les extraits de *R. alaternus* et les comparer au BHT et la quercétine comme témoin positif, Sachant que la concentration de chaque extrait et témoins positifs est de 1 mg/ml (Tab. 2). Dans chaque boîte cinq puits ont été réalisées à différentes concentrations d'extraits et témoins (10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 30  $\mu$ l, 40  $\mu$ l et 50  $\mu$ l).

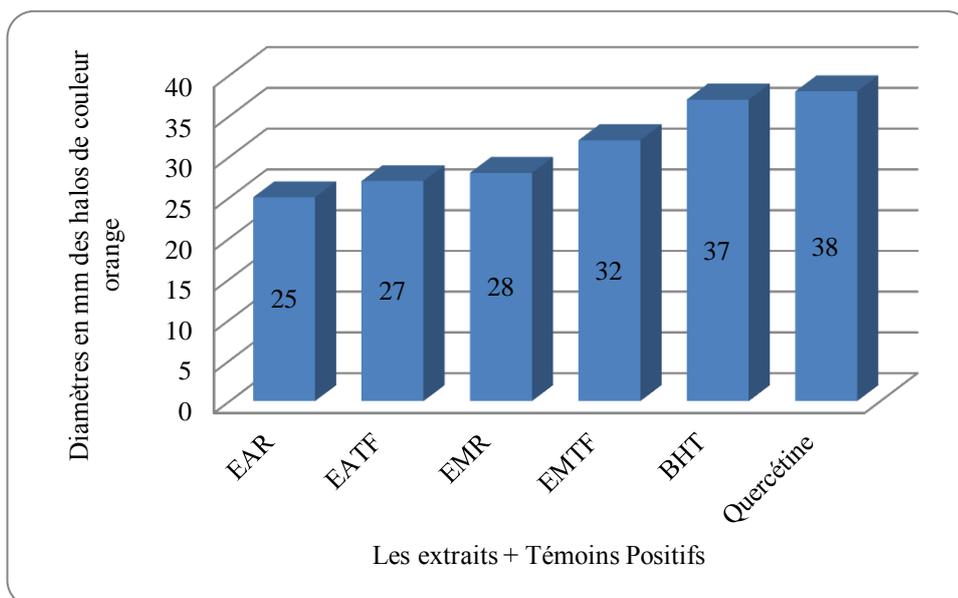
Le diamètre des halos de rétention de la couleur orange est proportionnel au volume déposé. Cependant, il diffère d'un extrait à un autre. Pour un volume d'extrait de 50  $\mu$ l déposé, l'extrait aqueux des racines montre le plus petit diamètre (25 mm) soit le plus faible pouvoir antioxydant alors que l'extrait méthanolique de tiges et feuilles a manifesté le plus fort effet avec un diamètre de (32 mm) (Fig. 19), les valeurs trouvées restent légèrement inférieures à celles obtenus avec des antioxydants standard tels que la quercétine (38 mm) et le BHT (37 mm) en l'occurrence.

Sharififar et *al.* (2009) ont étudié l'activité antioxydante de l'extraits méthanolique de *Teucrium polium*, et ont trouvé un diamètre d'halos de rétention de couleur de 26 mm, Nos valeurs trouvés pour les extraits méthanoliques sont supérieurs à cette valeur.

Ces résultats montrent que les extraits méthanoliques et aqueux de *R. alaternus* possèdent un potentiel antioxydant important dû aux polyphénols notamment les flavonoïdes qui stabilisent le radical peroxyde par donation d'hydrogène.

**Tableau 2 :** Résultats du test visuel de  $\beta$ -carotène des quatre extraits plus les contrôles + et - .

	
<p>EAR</p>	<p>EATF</p>
	
<p>EMR</p>	<p>EMTF</p>
	
<p>Quercétine et BHT</p>	



**Figure 19 :** Comparaison des diamètres des halos de rétention de couleur dans le cas du dépôt de 50  $\mu$ l des extraits de *R. alaternus* et des témoins positifs (Quercétine et BHT).

### 1.3.2. Test de blanchissement du $\beta$ - carotène (the bleaching test)

La technique de décoloration du  $\beta$ -carotène/ acide linoléique permet d'évaluer l'activité antioxydante des quatre extraits par inhibition de la peroxydation des lipides en suivant l'absorbance dans le temps, Les absorbances des milieux réactionnels en absence des extraits diminuent rapidement dans le temps, alors que l'ajout des extraits ou du BHT ralentit ce déclin.

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes suite à l'abstraction des atomes d'hydrogène à partir de groupements méthylènes de l'acide linoléique. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le  $\beta$ - carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophotométriquement à 470 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de L'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du  $\beta$ - carotène. La cinétique de blanchissement du  $\beta$ - carotène en absence et en présence des extraits de *R. alaternus* et d'antioxydant standards (BHT) a été suivie (Fig. 20).

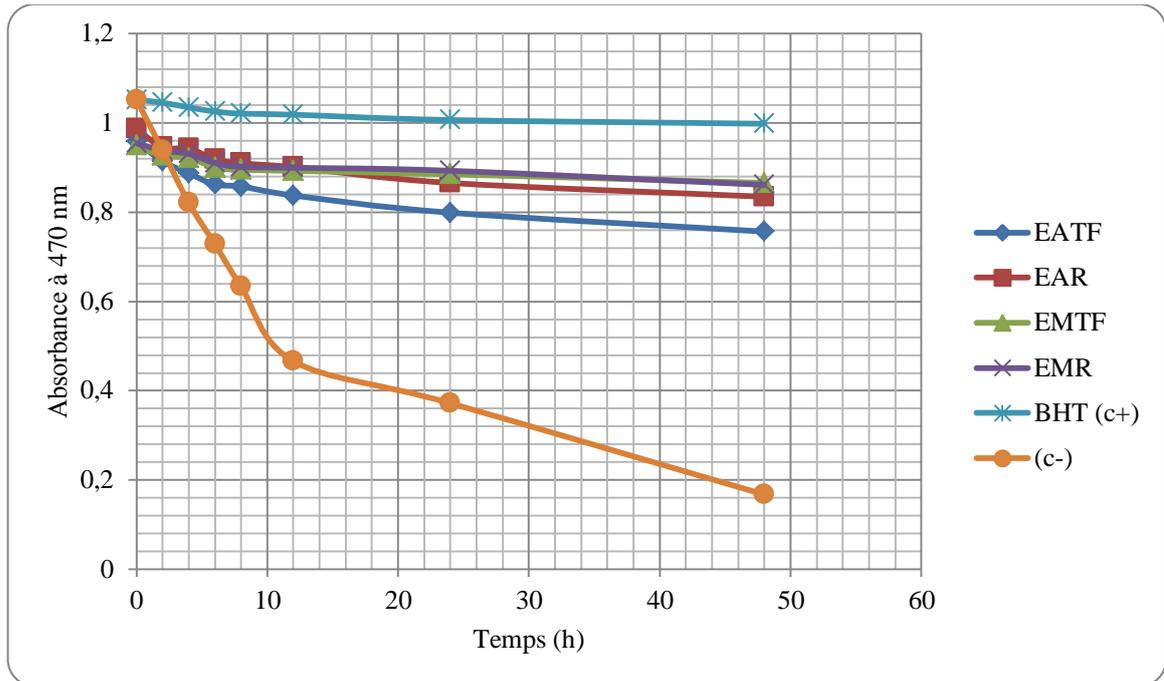
Le BHT à une concentration de 2mg/ml montre une courbe sous forme d'un plateau ce qui signifie que le pouvoir antioxydant est très efficace. Il est suivi de façon moins importante par l'extrait EMR, EMTF, EAR et EATF dans l'ordre. En absence d'antioxydant (BHT ou extrait) le déclin est très remarqué. Nos résultats montrent que les extraits les plus riches en polyphénols, par conséquent les plus polaires (les extraits aqueux EAR et EATF) montrent

l'activité antioxydante la plus faible par rapport aux extraits relativement pauvres en polyphénols, qui présentent une faible polarité (les extraits méthanoliques EMTF et EMR).

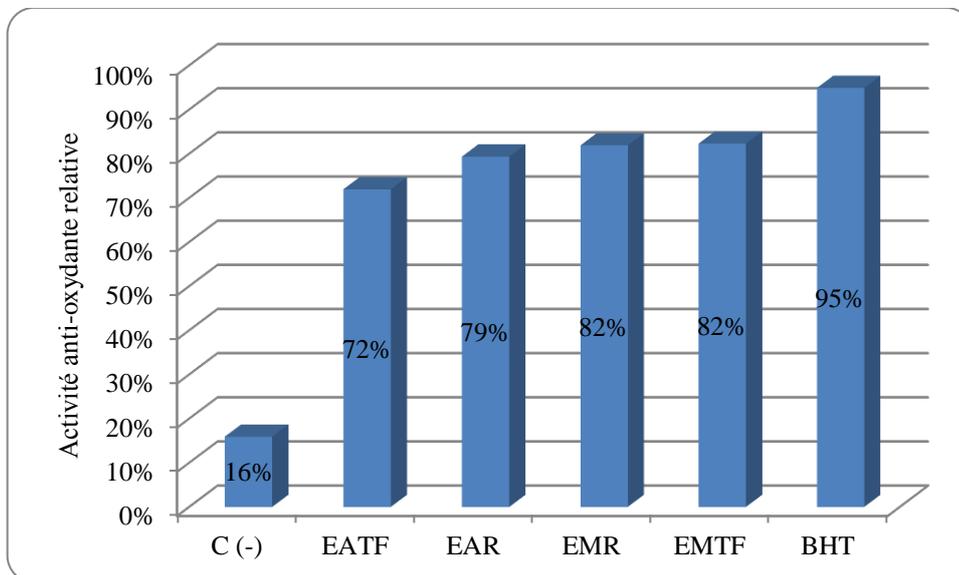
Nos résultats sont similaires aux résultats d'une étude réalisée par Yang *et al.* (2007) sur des extraits du rhizome du lotus ou l'extrait méthanolique est plus riche en polyphénols, 20.1mg équivalent en catechine/100g de matière fraîche mais ne montre qu'une faible activité antioxydante comparé aux extraits éther de pétrole et dichlorométhane dont la composition chimique est moins riche en composés phénoliques (2.2 et 2.4 mg équivalent en catechine/100g de matière fraîche respectivement).

Ceci peut être expliqué par un phénomène énoncé comme " paradoxe polaire " comme il est décrit par Frankel *et al.* (1994). Étant donné que le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène est similaire à un système d'émulsion des lipides dans l'eau, Frankel et Meyer (2000) ont proposé que les antioxydants apolaires exposent des propriétés antioxydantes plus importantes car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi de prévenir la formation de radicaux lipidiques et l'oxydation du  $\beta$ -carotène. Alors que les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont ainsi moins efficaces dans la protection des lipides.

Selon Haddadi (2005) plusieurs facteurs semblent moduler les résultats d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique à savoir la nature liposoluble ou hydrosoluble des antioxydants et leur concentration.



**Figure 20 :** Cinétique de blanchissement du  $\beta$ - carotène à 470 nm en absence et en présence des extraits de *R. alaternus* et du BHT.



**Figure 21 :** Activité anti-oxydante relative des extraits de *R. alaternus* (EATF, EAR, EMTF et EMR) , BHT et le contrôle négatif C (-) après 48 h.

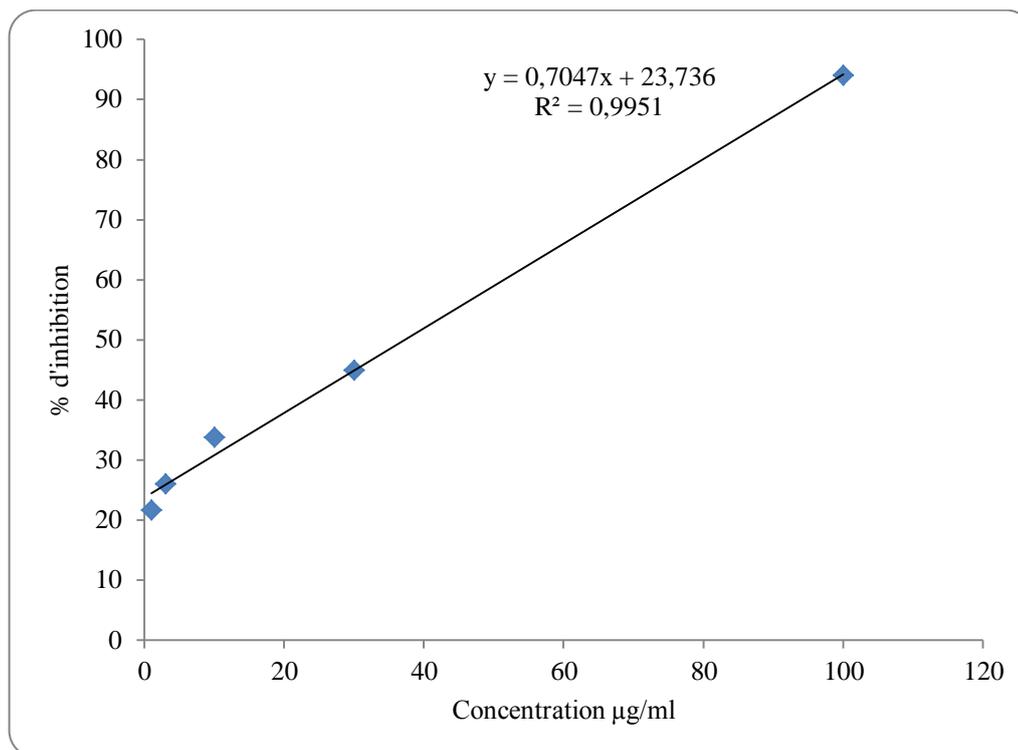
### 1.3.3. Test anti-radicalaire (Test DPPH)

L'activité anti radicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH-H est formée (Bortolomeazzi et *al.*, 2007). L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration des différents extraits utilisés et du témoin BHT (antioxydant de référence) (1, 3, 10, 30, 100 µg/ml).

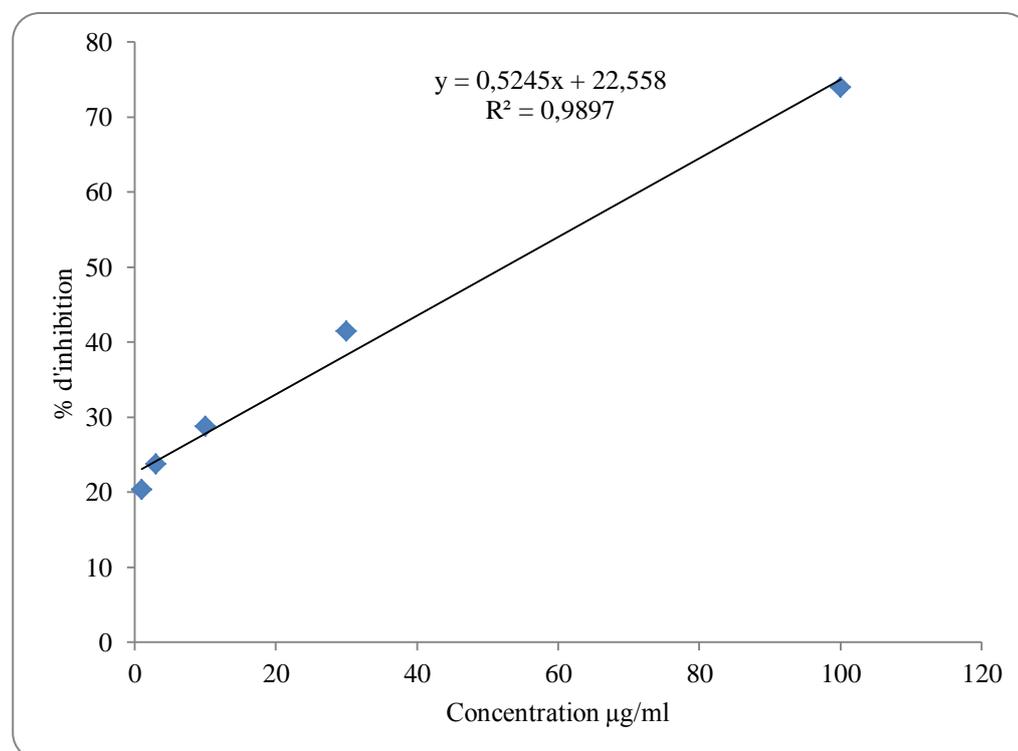
L'activité antioxydante des extraits est exprimée en  $CI_{50}$ , ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats (Abdulmajed et *al.*, 2005; Ahmad et *al.*, 2012; Ranga et *al.*, 2009), il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH<sup>•</sup> (couleur). Ces  $CI_{50}$  sont déterminées à partir des graphes (Fig 22, 23, 24, 25 et 26) dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait brut et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage. Elle est de 71 pour l'extrait EMTF et 66 µg/ml pour les deux extraits aqueux EATF et EAR, alors qu'avec l'extrait EMR la valeur est 52 µg/ml assez proche de celle du BHT qui est de 37 µg/ml.

Tous les extraits ont un pouvoir anti-radicalaire envers le DPPH<sup>•</sup> (Fig. 27), plus la valeur de l' $IC_{50}$  est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant.

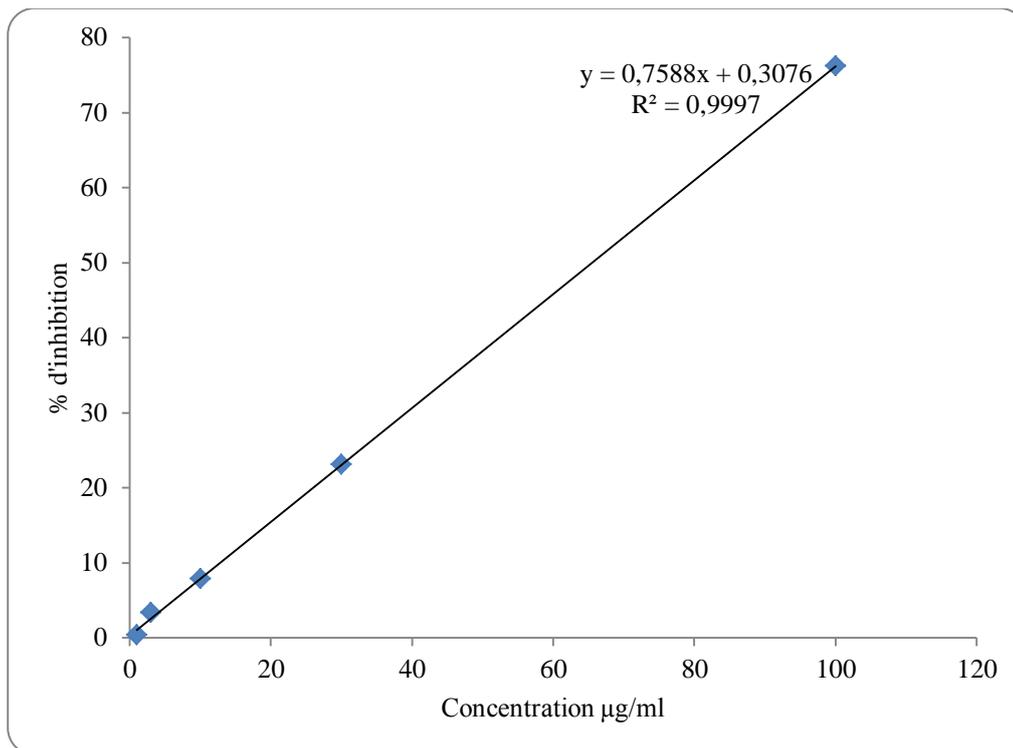
Une étude menée par Ben ammar et *al.* (2008) sur la même espèce de plante de la Tunisie a montré des  $IC_{50}$  de 7 et 19 µg/ml des écorces des racines et des feuilles respectivement, lorsque l'extraction a été menée par le méthanol suivie par une extraction dans le butanol saturé en eau. Cette valeur est nettement inférieure à celle trouvée avec nos extraits.



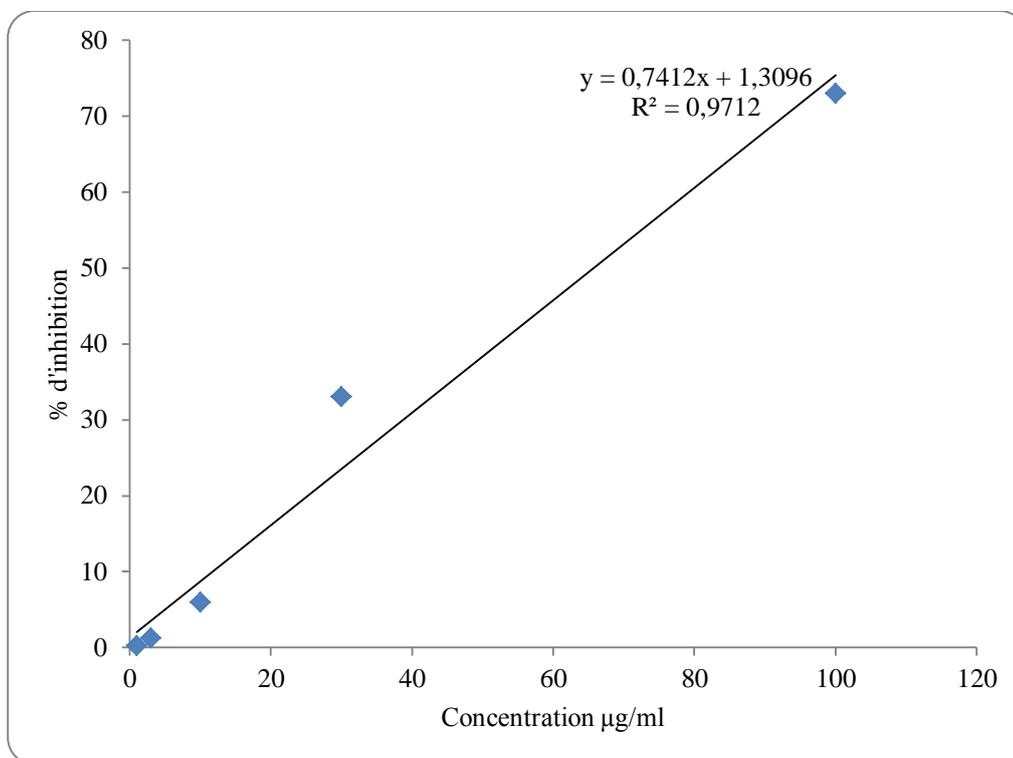
**Figure 22 :** Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration du BHT.



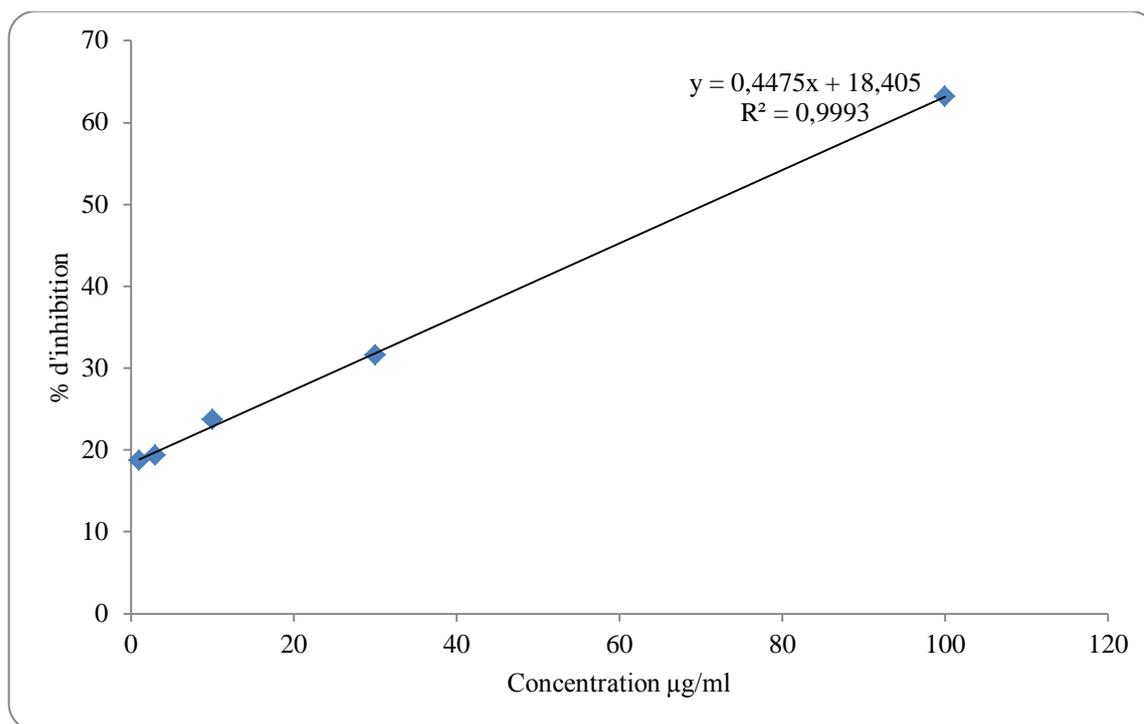
**Figure 23 :** Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait EMR.



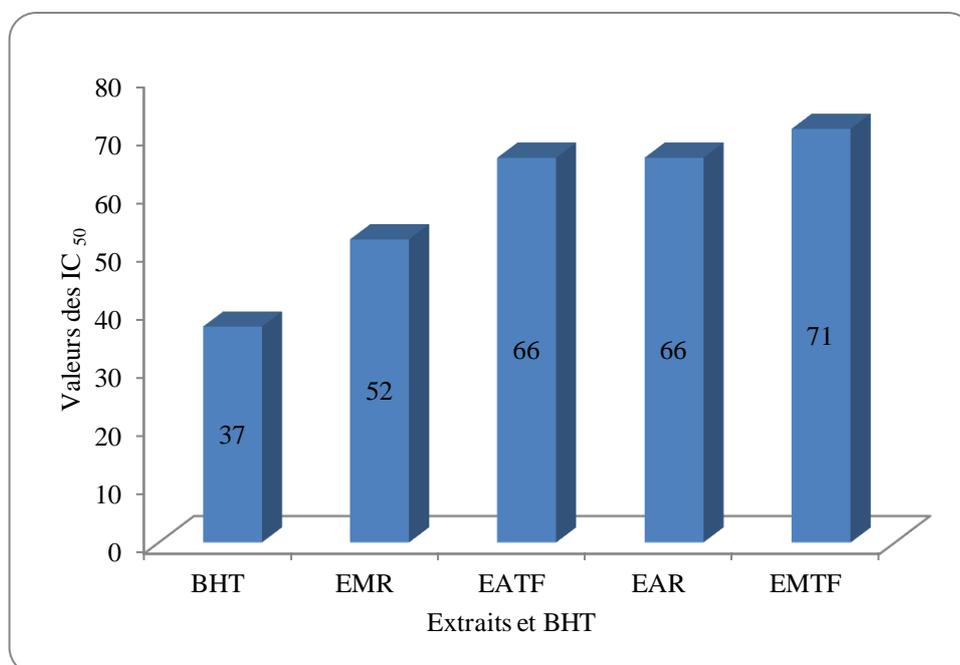
**Figure 24 :** Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait EATF.



**Figure 25 :** Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait EAR.



**Figure 26 :** Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait EMTF.



**Figure 27 :** Activité anti-radicalaire des extraits de *R. alaternus* et le BHT.

## 1.4. L'activité antimicrobienne

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antimicrobien des extraits isolés de *R. alaternus* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosés solides, Mueller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les champignons.

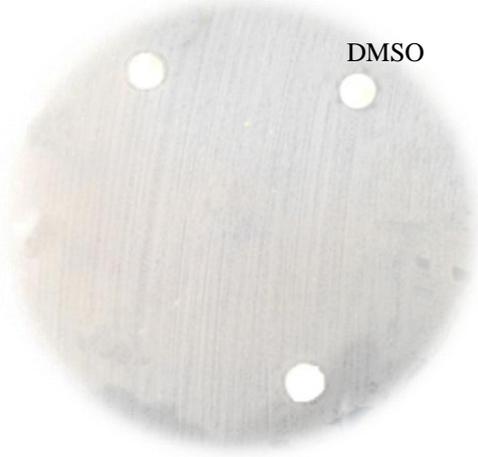
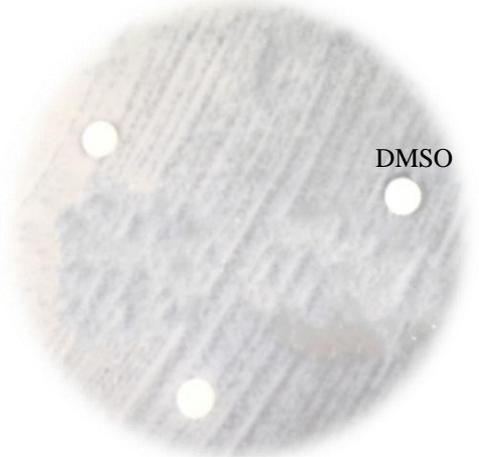
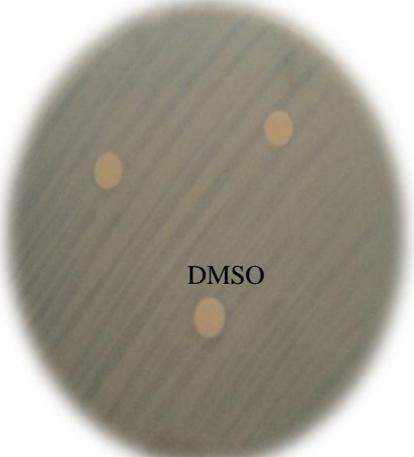
L'activité antimicrobienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de quatorze (14) germes pathogènes d'origine hospitalière dont onze (11) bactéries Gram + et Gram - et trois (3) champignons à savoir deux moisissures et une levure.

### 1.4.1. Résultats du test préliminaire

Si les extraits doivent être soumis aux essais biologiques, la toxicité du solvant peut également être critique car même en traces, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique. L'attention devrait également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et les corps dissous pendant que le solvant peut réagir avec certains composés pour produire des complexes ou pour causer la décomposition, la déshydratation, ou l'isomérisation de ces composés (Fig. 28) (Yrjöen, 2004).

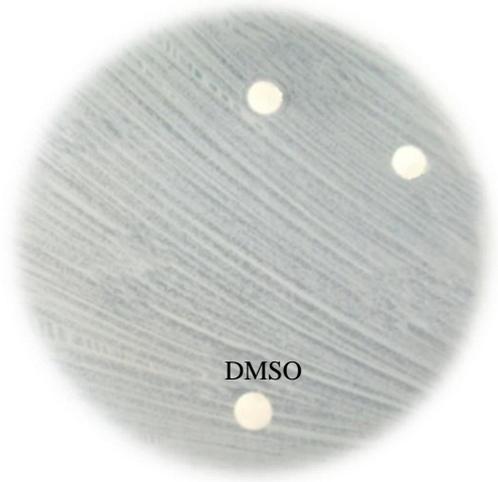
Pour cela le DMSO a été testé comme solvant, les résultats montrent que le solvant est approprié et ne présente aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes.

**Figure 28** : Effet du DMSO sur les bactéries et les champignons étudiés.

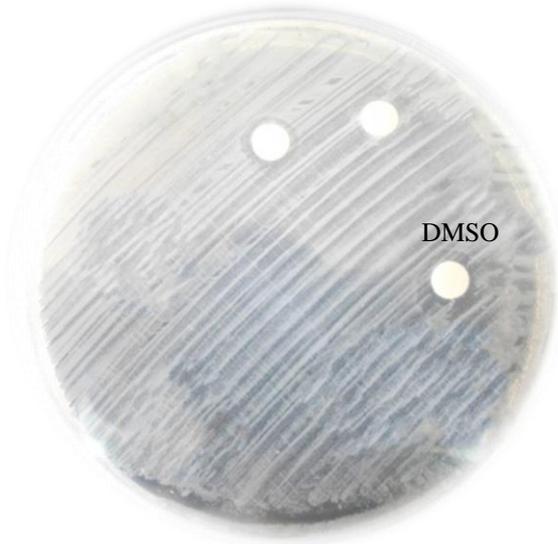
 <p>DMSO</p>	 <p>DMSO</p>
<p><i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606</p>	<p><i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876</p>
 <p>DMSO</p>	 <p>DMSO</p>
<p><i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090</p>	<p><i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452</p>



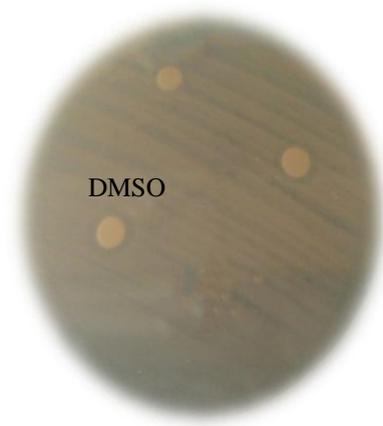
*Escherichia coli* ATCC 25922



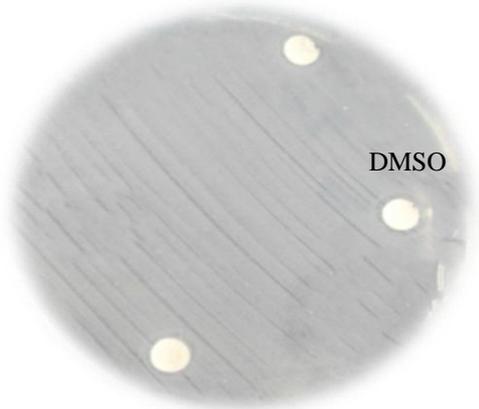
*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603



*Listeria monocytogenes* ATCC 15313



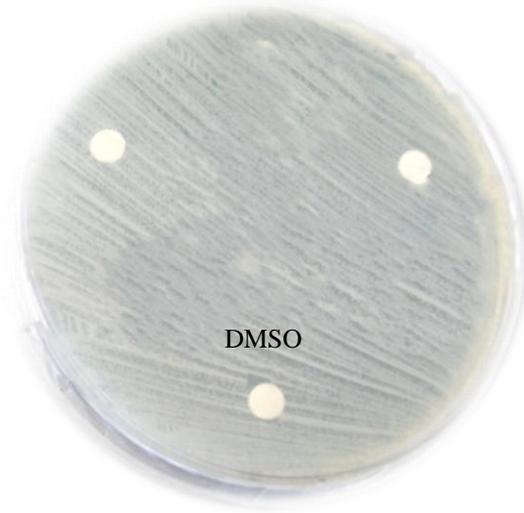
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



*Salmonella typhimurium* ATCC 13311



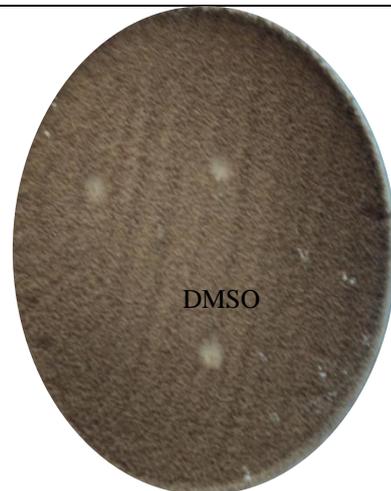
*Staphylococcus aureus* ATCC 25923



*Proteus mirabilis* ATCC 35659



*Aspergillus flavus*



*Aspergillus niger*



*Candida albicans*

### 1.4.2. Les antibiogrammes

Les souches de bactéries à Gram + et à Gram - (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) ont montré des sensibilités différentes aux antibiotiques standards testés : amoxicilline + Ac. clavulanique (AMC), norfloxacine (NO), imipénème (IPM), céfotaxime (CTX), céfoxitine (FOX), acide nalidixique (NA), ciprofloxacine (CIP), fosfomycine (FOS), gentamicine (G), colistine (CS), ticarcilline (TIC), aztréonam (ATM), pipéracilline (PIP), erythromycine (E), chloramphénicol (C), rifampicine (RA), vancomycine (VA), pristinamycine (PT), acide fusidique (FA), kanamycine (K), benzylpénicilline (P), oxacilline (OX). En plus des bactéries suscitées, la gentamicine a été testée contre le reste des bactéries (Tab. 3).

La bactérie *E.coli* est sensible à ciprofloxacine, imipénème et céfoxitine avec des diamètres de zones d'inhibition de 42, 36 et 32 mm respectivement, alors qu'elle est plus ou moins résistante à la gentamicine, fosfomycine et colistine avec un diamètre de 24 mm.

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie à Gram -, elle est relativement résistante à certains antibiotiques tels que G, NA et CS (diamètres des zones d'inhibition de 14, 14 et 12 mm respectivement) alors qu'elle a montré une certaine sensibilité vis-à-vis de IPM, CIP et FOS (diamètres des zones d'inhibition de 29, 30 et 34 mm respectivement).

*Staphylococcus aureus* est une bactérie à Gram +, elle est plus ou moins sensible aux différents antibiotiques la CIP (38 mm), FOX, NA (34 mm) et la G (26 mm).

*Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter baumannii* et *Listeria monocytogenes* et *Klebsiella pneumoniae* ont montré une sensibilité décroissante à l'antibiotique gentamicine 30, 18, 15, 13, 11 et 9 mm, alors que la gentamicine n'a donné aucun effet sur *Proteus mirabilis* (Fig. 29).

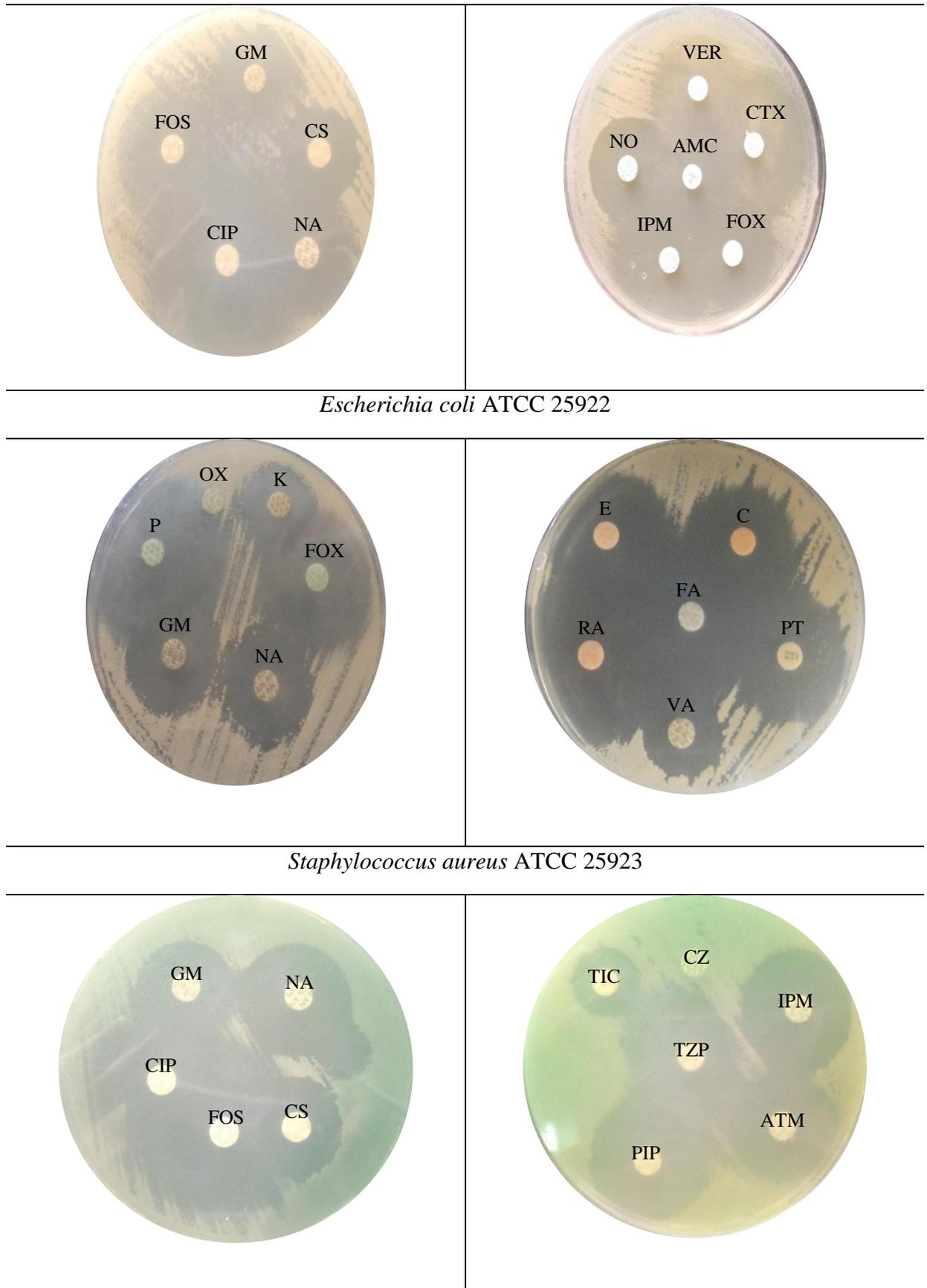
**Tableau 3** : Diamètre de zone d'inhibition en mm en présence de quelques antibiotiques.

<b>Antibiotiques</b> <b>Souches</b>	<b>G</b>	<b>IPM</b>	<b>FOX</b>	<b>NA</b>	<b>CIP</b>	<b>FOS</b>	<b>CS</b>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	24	36	32	24	42	24	24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	14	29	ND	14	30	34	12
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	26	ND	34	34	38	ND	ND

<b>Souches</b> <b>Antibiotiques</b>	<i>Acinetobacter baumanir</i> ATCC 19606	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452
<b>G</b>	11	18	13	30

<b>Souches</b> <b>Antibiotiques</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>Lysteria monocytogenes</i> ATCC 15313	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311
<b>G</b>	9	11	0	15

Figure 29 : Effet des antibiotiques sur les bactéries étudiées.

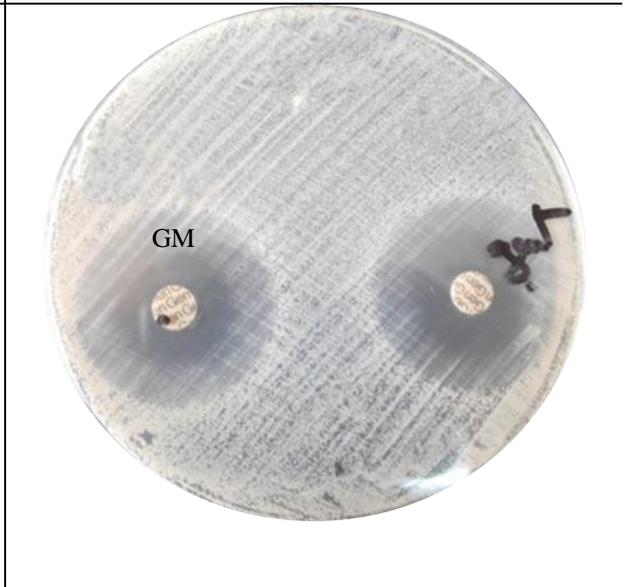
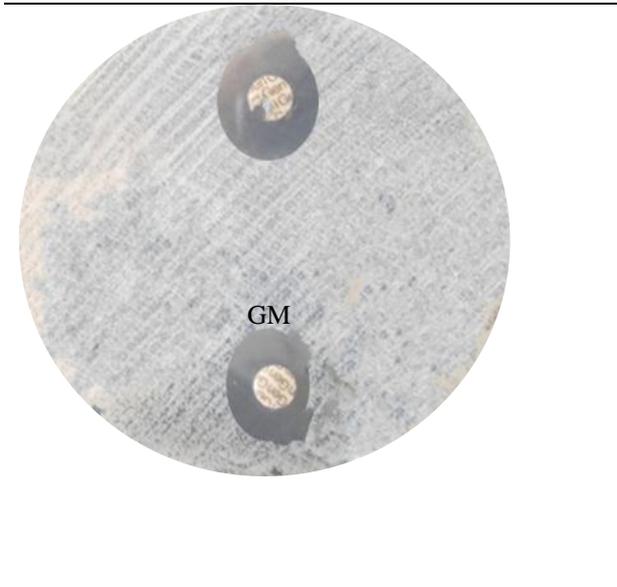


*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



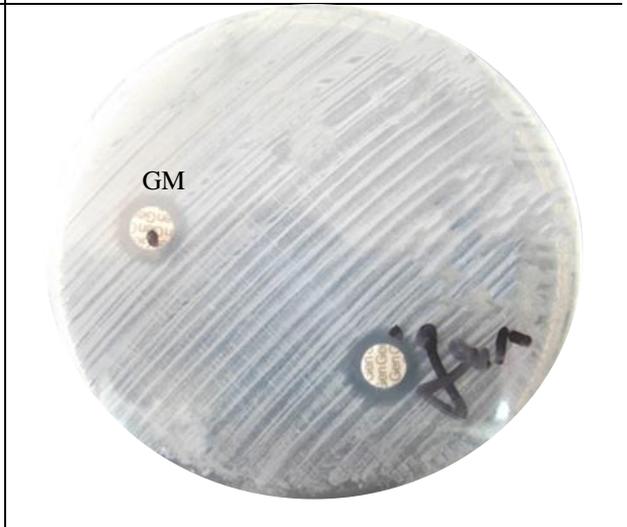
*Acinetobacter baumanir* ATCC 19606

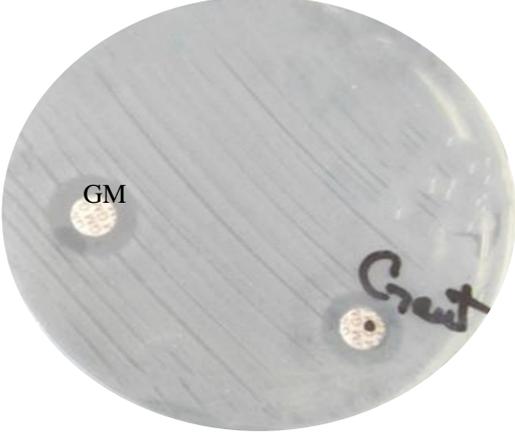
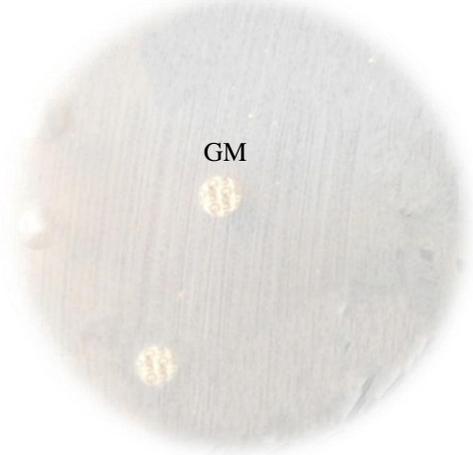
*Bacillus cereus* ATCC 10876



*Citrobacter freundii* ATCC 8090

*Enterococcus faecalis* ATCC 49452



<p><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603</p>	<p><i>Lysteria monocytogenes</i> ATCC 15313</p>
	
<p><i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311</p>	<p><i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659</p>

### 1.4.3. Sensibilité aux extraits bruts :

Les effets inhibiteurs de la croissance des germes sont manifestés par un seul extrait EMR à partir d'une concentration mère de 200 mg/ml, sur 5 bactéries *E.coli*, *S.aureus*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* et *P.aeruginosa*. Les diamètres d'inhibition sont en fonction de la dose déposée sur le disque.

*E. faecalis* est la souche la plus sensible, à 200 mg/ml le diamètre d'inhibition est de 21 mm, suivie de *S.aureus* avec un diamètre de 19 mm, puis *P.aeruginosa*, *E.coli* et *K. pneumoniae* avec les diamètres d'inhibition de 14, 13 et 10 mm respectivement.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) (Annexe II) exprimées par EMR sur les souches testées ont été de 6,25 mg/ml pour *E.coli*, *S.aureus*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* et 0,2 mg/ml pour *P.aeruginosa*.

Ben ammar et al. (2008) ont trouvés des valeurs de CMI d'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* tunisienne supérieurs à 6 mg/ml avec les souches de *E.coli*, *S.aureus* et *E. faecalis*.

Cowan (1999) a rapporté que les différentes classes de poly phénols essentiellement les tanins et les flavonoïdes peuvent augmenter la toxicité des extraits envers les microorganismes. Cette toxicité est fonction du site et du nombre de groupements hydroxyles présents sur le composé phénolique. En outre, il est évident que l'augmentation de l'hydroxylation conduit à une augmentation de la toxicité. L'effet antimicrobien de ces phénols peut être expliqué par l'inhibition de la croissance bactérienne suite à leur adsorption sur les membranes cellulaires, l'interaction avec les enzymes et les effecteurs ou la privation en substrats et ions métalliques (Dhaouadi et al., 2010).

L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée (synergie) de différents composés (Essawi et Srour, 2000). Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique, l'altération des fonctions de la membrane cytoplasmique, la séquestration de substrats nécessaires à la croissance microbienne et l'inhibition du métabolisme énergétique microbien (Jungkind, 1995).

Il a été rapporté que l'activité antimicrobienne chez d'autres plantes est dû à la présence d'anthraquinones (Comini et al., 2011; Doughari et al., 2012).

L'effet bactéricide (Annexe II) le plus important manifesté par EMR est sur les trois bactéries *E. coli*, *S. aureus* et *L. monocytogenes* avec une CMB de 12,5 mg/ml, puis sur *P.*

*aeruginosa* avec une CMB de 25 mg/ml. Et le plus faible est sur la bactérie *K. pneumoniae* avec une CMB de 100 mg/ml.

**Tableau 5 :** Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec *Escherichia coli*.

Extrait	Concentration en mg/ml	Diamètre d'inhibition
EMR	200	13
	100	10
	50	9
	25	8,5
	12,5	7,5
	6,25	7

**Tableau 6 :** Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec *Pseudomonas aeruginosa*.

Extrait	Concentration en mg/ml	Diamètre d'inhibition
EMR	200	14
	100	13
	50	11
	25	9,5
	12,5	8,5
	6,25	8
	3,125	7,5
	1,5625	7,5
	0,78125	7
	0,390625	7
	0,1953125	7
	0,09596929	-

**Tableau 7 :** Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec *Staphylococcus aureus*.

Extrait	Concentration en mg/ml	Diamètre d'inhibition
EMR	200	19
	100	17
	50	14
	25	11
	12,5	7,5
	6,25	7

**Tableau 8** : Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec *Enterococcus faecalis*.

Extrait	Concentration en mg/ml	Diamètre d'inhibition
EMR	200	21
	100	19
	50	16,5
	25	14
	12,5	12,5
	6,25	7

**Tableau 9** : Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec *Klebsiella pneumoniae*.

Extrait	Concentration en mg/ml	Diamètre d'inhibition
EMR	200	10
	100	9
	50	8,5
	25	7
	12,5	7
	6,25	6,5

**Tableau 10** : Concentrations minimales inhibitrices exprimées pour EMR sur les souches testées en mg/ml.

Souches Extraits	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313
EMR	CMI = 6,25 CMB = 12,5	CMI = 0,195 CMB = 25	CMI = 6,25 CMB = 12,5	CMI = 6,25 CMB = 100	CMI = 6,25 CMB = 12,5

# **CONCLUSION**

## Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Une étude des propriétés antioxydante et antimicrobienne a concerné une plante appartient à la famille des Rhamnacées, employée en Algérie gras à ses propriétés thérapeutiques.

Quantitativement, l'évaluation du contenu des polyphénols totaux en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu révèle la présence des quantités moyennement importantes en polyphénols. De même nous avons dosé les flavonoïdes par la méthode d' $\text{AlCl}_3$  qui nous mène à conclure que cette plante contient une quantité considérable de flavonoïdes. Il ressort de ces analyses que *R. alaternus* est riche en flavonoïdes de types flavones et flavonols.

Le potentiel antiradicalaire des extraits a été déterminé par la méthode de DPPH dont les résultats montrent que ces extraits possèdent une bonne activité, donc cette plante contient des molécules qui sont considérées comme des agents antioxydants de première classe et peuvent être employées pour des applications thérapeutiques, sachant que les antioxydants contribuent de manière très efficace à la prévention des maladies telles que le cancer, et les maladies cardiovasculaires. Au cours de cette étude nous avons réalisé également un test antimicrobienne vis-à-vis 11 bactéries et 3 champignons pathogènes, les résultats microbiologiques ont montré que les extraits de *R. alaternus* ont une action faible sur les champignons et les espèces bactériennes testées.

Sachant que notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches, de cet effet, et comme perspectives on propose de :

- ✓ Faire une étude biochimique sur les fruits de *Rhamnus alaternus*.
- ✓ Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.
- ✓ Développer des médicaments antiradicalaires à base de plantes, doués d'une activité antioxydante.

REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

## Références bibliographiques

1. Abdulmajed K., McGuigan C. and Heard C. M. Topical delivery of retinyl ascorbate: 4. Comparative anti-oxidant activity towards DPPH. *Free Radic. Res.* 2005; 39: 491-498.
2. Abegaz B. M. and Peter M. G. Emodin and emodinanthrone rhamnoside acetates from fruits of *Rhamnus prinoides*. *Phytochem.* 1995; 39: 1411-1414.
3. Abou-chaar C. I. and Shamlan S. N. A Chromatographic Study of the Anthraquinones of *Rhamnus alaternus* L. I. Extraction, Isolation and Identification of the Aglycones. *Pharm. Biol.* 1980; 18: 49-55.
4. Ahmad N., Fazal H., Abbasi B. H., Anwar S. and Basir A. DPPH free radical scavenging activity and phenotypic difference in hepatoprotective plant (*Silybum marianum* L.). *Toxicol. Ind. Health.* 2012.
5. Ammar R. B., Bhourri W., Sghaier M. B., Boubaker J., Skandrani I., Neffati A., Bouhlel I., Kilani S., Mariotte A. M., Chekir-Ghedira L., Dijoux-Franca M. G. D. and Ghedira K. Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) : A structure-activity relationship study. *Food Chem.* 2009; 116: 258-264.
6. Ammar R. B., Sghaier M. B., Boubaker J., Bhourri W., Naffeti A., Skandrani I., Bouhlel I., Kilani S., Ghedira K. and Chekir-Ghedira L. Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B1-, nifuroxazide-, and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus* L. *Chem.-Biol. Inter.* 2008; 174: 1-10.
7. Andersen YM and Markham KR. Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications. Ed. CRC, Taylor & Francis, Boca Raton, FL, 2006, p. 553-616.
8. Aronne G. and Wilcock C. C. Reproductive Lability in Pre-Dispersal Biology of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae). *Protoplasma* 1995; 187: 49-59.
9. Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J. C. and Pinkas M. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arznei. Forschung.* 1996; 46: 1086-1089.
10. Battandier JA, Debray FG, Flagey C, Petit P and Trabut L. Flore de l'Algérie. Ed. A. Jourdan, Alger, 1888, p. 189-190.
11. Belhatab R. Composition chimique et activité antioxydante, antifongique et anti aflatoxino-gène d'extraits de *Origanum glandulosum* Desf. et *Marrubium vulgare* L (famille des Lamiaceae). *Thèse de doctorat d'état Dépt Biologie, UFA Setif* 2007.
12. Belhatab R., Larous L., Kalantzakis G., Bouskou D. and Exarchou V. Antifungal properties of *Origanum glandulosum* Desf. extracts. *Food, Agricul. & Envir.* 2004; 2: 63-69.

13. Ben Ammar R., Kilani S., Bouhlel I., Ezzi L., Skandrani I., Boubaker J., Ben Sghaier M., Naffeti A., Mahmoud A., Chekir-Ghedira L. and Ghedira K. Antiproliferative, Antioxidant, and Antimutagenic Activities of Flavonoid-Enriched Extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L.: Combination with the Phytochemical Composition. *Drug. Chem. Toxicol.* 2008; 31: 61-80.
14. Ben Ammar R., Kilani S., Bouhlel I., Skandrani I., Naffeti A., Boubaker J., Ben Sghaier M., Bhouri W., Mahmoud A., Chekir-Ghedira L. and Ghedira K. Antibacterial and cytotoxic activities of extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* (*Rhamnaceae*). *Ann. Microbiol.* 2007; 57: 453-460.
15. Bergeret JP, Bergeret E and Bergeret G. Flore des Basses-Pyrénées. Ed. Imprimerie-stéréotype Garet, Pau, 1909, p. 230-231.
16. Bergogne-Berezin E and Dellamonica P. Antibiothérapie en pratique clinique. Ed. Masson, Paris, 1995, p. 486.
17. Bhouri W., Boubaker J., Kilani S., Ghedira K. and Chekir-Ghedira L. Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (*Rhamnaceae*): Kaempferol 3-O-B-isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O-B-isorhamninoside. *S. Afr. J. Bot.* 2012; 80: 57-62.
18. Billing J. and Sherman P. W. Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot. *Q. Rev. Biol.* 1998; 73: 3-49.
19. Bortolomeazzi R., Sebastianutto N., Toniolo R. and Pizzariello A. Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food Chem.* 2007; 100: 1481-1489.
20. Bronner W. E. and Beecher G. R. Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. *J. Chromatog. A* 1995; 705: 247-256.
21. Bruneton J. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Ed. Tec & Doc - Lavoisier, Paris, 1993.
22. Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. mdicales internationales Editions Technique & Documentation, Cachan, [S.I.], 1999, p. 647-673.
23. Chancerel L. Flore forestière du globe. Ed. Gauthier-Villars, Paris : 1920, p. 561-562.
24. Comini L. R., N\_\_\_\_ez Montoya S. C., P\_Éez P. L., Arg\_\_ello G. A., Albesa I. and Cabrera J. L. Antibacterial activity of anthraquinone derivatives from *Heterophyllaea pustulata* (*Rubiaceae*). *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 2011; 102: 108-114.
25. Cowan M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12: 564-582.
26. Dacosta Y. Les phytonutriments bioactifs : 669 réféérences bibliographiques. Ed. Yves Dacosta, Paris, 2003, p. 317.

27. Debeaux JO. Flore de la Kabylie du Djurdjura, ou, Catalogue méthodique et raisonné de toutes les plantes vasculaires et spontanées observées jusq'à ce jour dans cette contrée. Ed. P. Klincksieck, Paris : 1984, p. 81-82.
28. Delorme J and Robert A. Mycologie médicale. Ed. Centre collégial de développement de matériel didactique, [Mont-Royal Québec], 1997, p. 184.
29. Desai M. R. and Ghosh S. Occupational exposure to airborne fungi among rice mill workers with special reference to aflatoxin producing *A. flavus* strains. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2003; 10: 159-162.
30. Dhaouadi K., Raboudi F., Estevan C., Barrajo\_\_n E., Vilanova E., Hamdaoui M. and Fattouch S. Cell Viability Effects and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tunisian Date Syrup (Rub El Tamer) Polyphenolic Extracts. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 59: 402-406.
31. Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgards J. F. and Stocker P. Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol.* 2007; 224: 801-809.
32. Doughari J. H., Ndakidemi P. A., Human I. S. and Benade S. Antioxidant, antimicrobial and antiverotoxic potentials of extracts of *Curtisia dentata*. *J Ethnopharmacol* 2012; 141: 1041-1050.
33. Dworkin MM and Falkow S. Proteobacteria : Gamma subclass. Ed. Springer, New York, NY, 2006, p. 1248.
34. Essawi T. and Srour M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 2000; 70: 343-349.
35. Favier A. Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité chimique* 2003; 108-117.
36. Favier A. Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr.* 2006; 64: 390-396.
37. Frankel E. N., Huang S. W., Kanner J. and German J. B. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *J. Agric. Food. Chem.* 1994; 42: 1054-1059.
38. Frankel E. N. and Meyer A. S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* 2000; 80: 1925-1941.
39. Ghedira K. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytother.* 2005; 3: 162-169.
40. Graven E. H., Dean S. G., Svoboda K. P., Mavi S. and Gundidza M. G. Antimicrobial and antioxidative properties of the volatile (essential) oil of *Artemisia afra* Jacq. *Flavour. Fragr. J.* 1992; 7: 121-123.
41. Gubb AS. La flore algérienne, naturelle et acquise. Ed. A. Jourdan, Alger : 1913, p. 16-17.

42. Guinebert E., Durand P., Prost M., Grinand R. and Bernigault R. Mesure de la résistance aux radicaux libres. *Sixièmes Journées de la Recherche Avicole* 2005; 554-558.
43. Gómez-Caravaca A. M., Gómez-Romero M., Arréiz-Román D., Segura-Carretero A. and Fernández-Gutiérrez A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006; 41: 1220-1234.
44. Haddadi H. Détermination de l'activité antioxydante de quelques fruits. *Mémoire de magister Université de Béjaïa* 2005; p. 76.
45. Hagerman A. E. and Butler L. G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 1981; 256: 4494-4497.
46. Harborne J. B. Recent advances in chemical ecology. *Nat Prod Rep* 1997; 14: 83-98.
47. Jain S. and Patil U. K. Phytochemical and pharmacological profile of *Cassia tora* Linn. - An Overview. *Indian J. Nat. Prod. Resour.* 2010; 1: 430-437.
48. Jungkind DL. Antimicrobial resistance : a crisis in health care ; [based on the proceedings of the Eastern Pennsylvania Branch of the American Society of Microbiology Symposium on Antimicrobial Resistance: a Crisis in Health Care - Clinical Laboratory and Epidemiologic Considerations, held November 11-12, 1993, in Philadelphia, Pennsylvania]. Ed. Plenum Press, New York, NY [u.a.], 1995, p. 248.
49. Kaufmann SHE. Host response to intracellular pathogens. Ed. Springer ; R.G. Landes, New York; Austin, 1997, p. 345.
50. Kawasaki I., Jeong M. H., Oh B. K. and Shim Y. H. Apigenin inhibits larval growth of *Caenorhabditis elegans* through DAF-16 activation. *FEBS Letters* 2010; 584: 3587-3591.
51. Kohen R. and Nyska A. Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol. Path.* 2002; 30: 620-650.
52. Kosalec I., Bakmaz M., Pepeljnjak S. and Vladimir-Knezevic S. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta. Pharm.* 2004; 54: 65-72.
53. Krishna D., Chaluvadi M., Raj N. and Sripal R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.* 2001; 33: 2-16.
54. Krishnan S., Manavathu E. K. and Chandrasekar P. H. *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. *Mycoses* 2009; 52: 206-222.

55. LARWENCE A., HAMMOUDA F., SALAH A., ABADA S. and OUCHA\_\_ N. Ñ. Valeur alimentaire des marcs de raisin. III. - Rôle des tanins condensés dans la faible valeur nutritive des marcs de raisin chez le mouton : effet d'une addition de polyéthylène glycol 4000. *Ann. Zootech.* 1984; 33: 533-543.
56. Macheix JJ, Fleuriet A and Jay-Allemand C. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 2005, p. 4-5.
57. Mai L. P., Gu\_Ñritte F. Ī., Dumontet V., Tri M. V., Hill B., Thoison O., Gu\_Ñnard D. and S\_Ñvenet T. Cytotoxicity of Rhamnosylanthraquinones and Rhamnosylanthrones from *Rhamnus nepalensis*. *J. Nat. Prod.* 2001; 64: 1162-1168.
58. Male\_Éév D. É. and Kunti\_ç V. Investigation of metal--flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal--flavonoid complexing reactions. *J. Serb. Chem. Soc.* 2007; 72: 921-939.
59. Marzouk M. S., El-Toumy S. A. A., Merfort I. and Nawwar M. A. M. Polyphenolic metabolites of *Rhamnus disperma*. *Phytochem.* 1999; 52: 943-946.
60. Mathieu A. Flore forestière; description et histoire des végétaux ligneux qui croissent spontanément en France et des essences importantes de l'Algérie. Suivies d'une méthode analytique pour en déterminer les principales espèces. Ed. Ancienne maison Grimblot et cie, N. Grosjean, successeur, Nancy, 1860, p. 52-53.
61. Maurice N. L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle. Ed. Lavoisier, Paris, 1997, p. 12-14.
62. MobileReference. The Illustrated Encyclopedia of Trees and Shrubs: An Essential Guide To Trees and Shrubs of the World. Ed. MobileReference, 2008, p. 5205.
63. Nijveldt R. J., van Nood E., van Hoorn D. E., Boelens P. G., van Norren K. and van Leeuwen P. A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American J. Clinic. Nutr.* 2001; 74: 418-425.
64. Novelli G. P. Role of free radicals in septic shock. *J. Physiol. Pharmacol.* 1997; 48: 517-527.
65. Penzig O. Flore colorée de poche du littoral méditerranéen. Ed. P. Klincksieck, Paris, 1902, p. 27-28.
66. Percival SL. Microbiology of waterborne diseases. Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston, 2004, p. 480.
67. Quezel P and Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. Centre nationale de la recherche scientifique, Paris, 1963, p. 617-620.
68. Ranga R. R., Tiwari A. K., Prabhakar R. P., Suresh B. K., Ali A. Z., Madhusudana K. and Madhusudana R. J. New furanoflavanoids, intestinal alpha-glucosidase inhibitory and free-radical

- (DPPH) scavenging, activity from antihyperglycemic root extract of *Derris indica* (Lam.). *Bioorg. Med. Chem.* 2009; 17: 5170-5175.
69. Rasooli I. and Abyaneh M. R. Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food. Control.* 2004; 15: 479-483.
70. Ray S. D., Wong V., Rinkovsky A., Bagchi M., Raje R. R. and Bagchi D. Unique organoprotective properties of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cadmium chloride-induced nephrotoxicity, dimethylnitrosamine (DMN)-induced splenotoxicity and mocap-induced neurotoxicity in mice. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 2000; 107: 105-128.
71. Remsy C., Manach C., Texier O. and Regerat F. Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. *Med. Nutr.* 1996; 32: 17-27.
72. Ribéreau-Gayon J, Peynaud m, Ribéreau-Gayon P and Sudraud P. Sciences et techniques du vin. Tome 1, analyse et controle des vins. Ed. Dunod, Paris, 1972, p. 671.
73. Richardson J. E., Fay M. F., Cronk Q. C. B., Bowman D. and Chase M. W. A phylogenetic analysis of *Rhamnaceae* using rbcL and trnL-F plastid DNA sequences. *Am. J. Boot.* 2000; 87: 1309-1324.
74. Sarni-Manchado P and Cheynier V. Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec & Doc, Paris, 2006, p. 2-10.
75. Seigler DS. Plant secondary metabolism. Ed. Kluwer Academic, Boston, 1998, p. 193-205.
76. Sharififar F., Dehghn-Nudeh G. and Mirtajaldini M. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chem.* 2009; 112: 885-888.
77. Singleton V. L., Orthofer R. and Lamuela-Raventos R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods Enzymol.* 1999; 152-177.
78. Sohal R. S., Mockett R. J. and Orr W. C. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biol. Med.* 2002; 33: 575-586.
79. Sokmen A., Gulluce M., Askin Akpulat H., Daferera D., Tepe B., Polissiou M., Sokmen M. and Sahin F. The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control* 2004; 15: 627-634.
80. Subramanian S., Stacey G. and Yu O. Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends Plant Sci.* 2007; 12: 282-285.
81. Takahashi H., Kamimura H. and Ichinoe M. Distribution of Aflatoxin-Producing *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in Sugarcane Fields in the Southernmost Islands of Japan. *J. Food Prot.* 2004; 67: 90-95.

82. Tawaha K., Alali F. Q., Gharaibeh M., Mohammad M. and El-Elimat T. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.* 2007; 104: 1372-1378.
83. Teixeira da Silva J. A. Mining the essential oils of the *Anthemideae*. *Afr. J. Biotechnol.* 2004; 3: 706-720.
84. Tepe B., Sokmen M., Akpulat H. A. and Sokmen A. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chem.* 2006; 95: 200-204.
85. Tohge T., Matsui K., Ohme-Takagi M., Yamazaki M. and Saito K. Enhanced radical scavenging activity of genetically modified *Arabidopsis* seeds. *Biotechnol. Lett.* 2005; 27: 297-303.
86. Ulanowska K., Majchrzyk A., Moskot M., Jak\_\_bkiewicz-Banecka J. and W\_Âgrzyn G. Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia* 2007; 62: 132-135.
87. Urquiaga I. N. E. S. and Leighton F. E. D. E. Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biol. Res.* 2000; 33: 55-64.
88. Valsaraj R., Pushpangadan P., Smitt U. W., Adsersen A., Christensen S. r. B. g., Sittie A., Nyman U., Nielsen C. and Olsen C. E. New Anti-HIV-1, Antimalarial, and Antifungal Compounds from *Terminalia bellerica*. *J. Nat. Prod.* 1997; 60: 739-742.
89. Van Delden C. and Iglewski B. H. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* 1998; 4: 551-560.
90. Vuorela S. Analysis, isolation and bioactivities of rapeseed phenolics. Ed. University of Helsinki, Helsinki, 2005, p. 76.
91. Wächter G. A., Hoffmann J. J., Furbacher T., Blake M. E. and Timmermann B. N. Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochem.* 1999; 52: 1469-1471.
92. Walle T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biol. Med.* 2004; 36: 829-837.
93. Wei B. L., Lin C. N. and Won S. J. Nakahalene and Cytotoxic principles of Formosan *Rhamnus* Species. *J. Nat. Prod.* 1992; 55: 967-969.
94. Yang D., Wang Q., Ke L., Jiang J. and Ying T. Antioxidant activities of various extracts of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) rhizome. *Asia. Pac. J. Clin. Nutr.* 2007; 16 Suppl 1: 158-163.

95. Yao K., De Luca V. and Brisson N. Creation of a Metabolic Sink for Tryptophan Alters the Phenylpropanoid Pathway and the Susceptibility of Potato to *Phytophthora infestans*. *Plant, Cell*. 1995; 7: 1787-1799.
96. Yrjöen T. Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural Products. *Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki* 2004, p. 76.

# ANNEXES

## **Annexes**

### **Annexe I**

#### **Composition du milieu Mueller-Hinton :**

Extrait de viande de bœuf : 2.0g.

Peptone de caséine : 17.5g.

Amidon de maïs : 1.5g.

Agar : 17.0g.

pH : 7.4.

#### **Composition du milieu Sabouraud :**

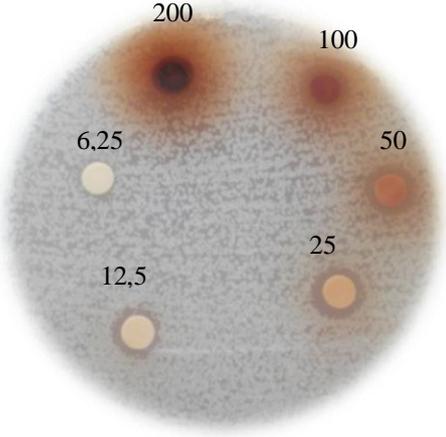
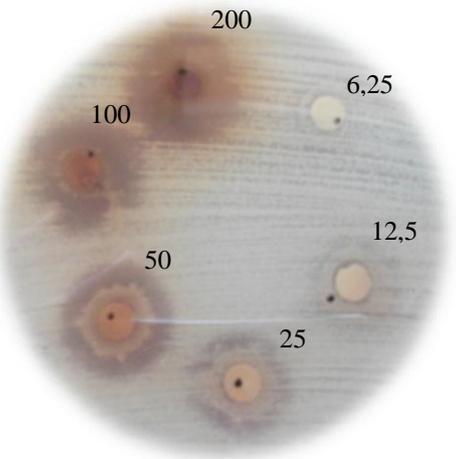
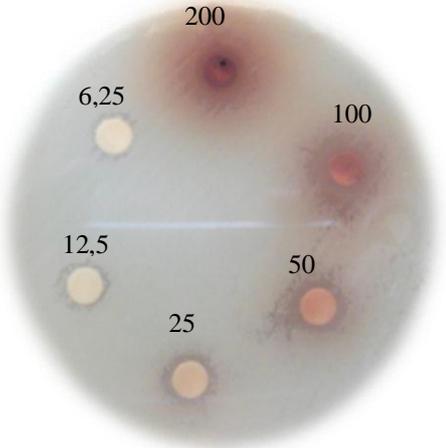
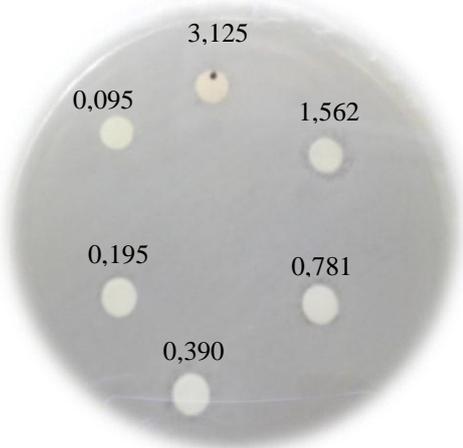
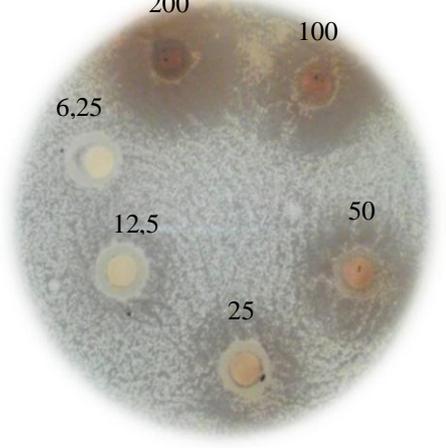
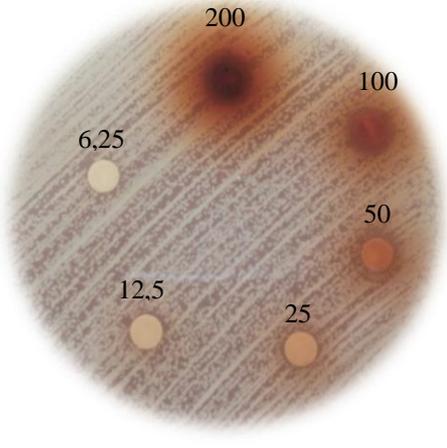
Peptone : 10,0 g.

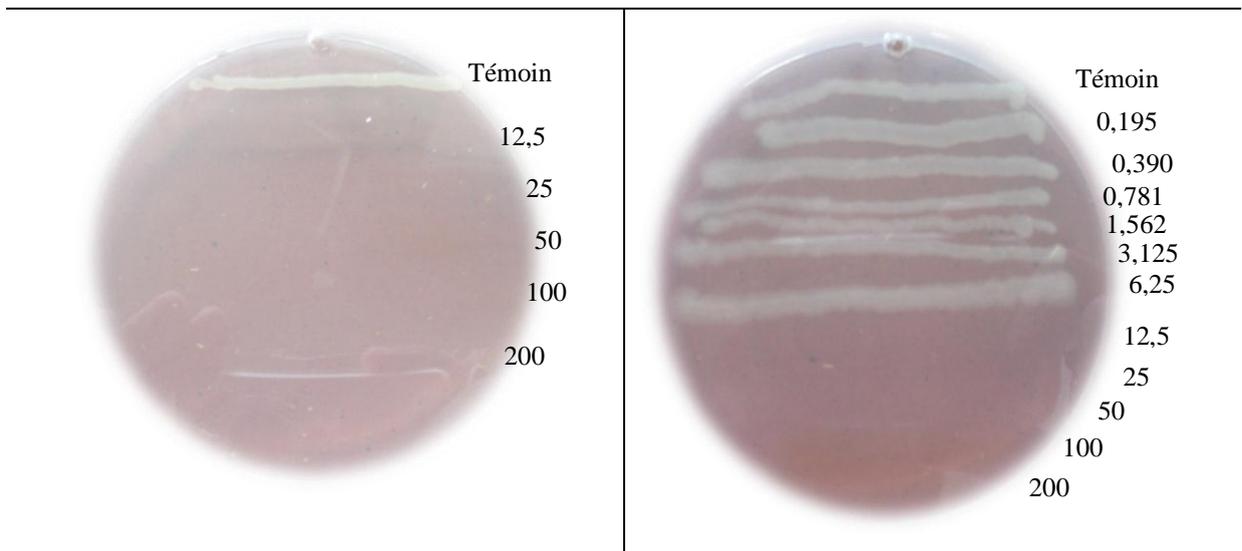
Glucose massé : 20,0 g.

Agar : 15,0 g.

pH = 6,0.

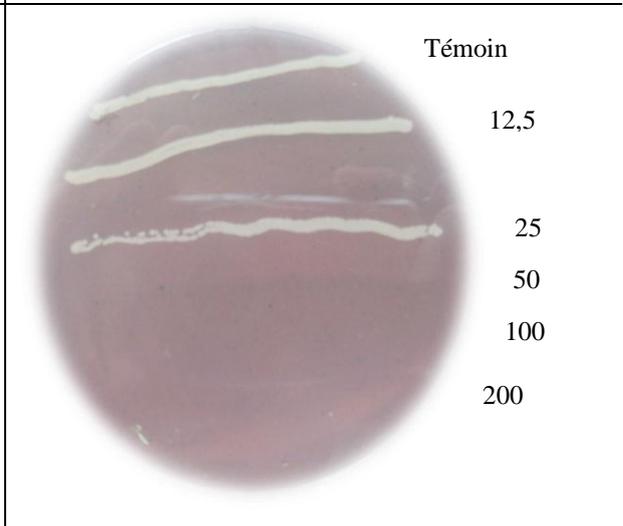
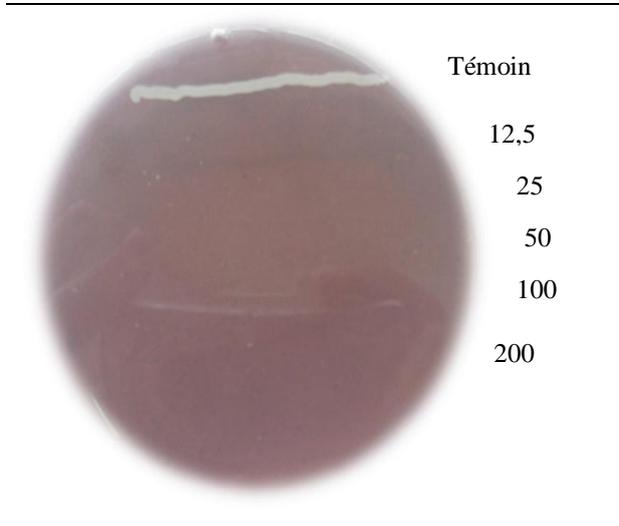
**Annexe II : Détermination du CMI et du CMB sur les bactéries sensible à l'extrait EMR.**

	
<p><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</p>
	
<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</p>	
	
<p><i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452</p>	<p><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603</p>



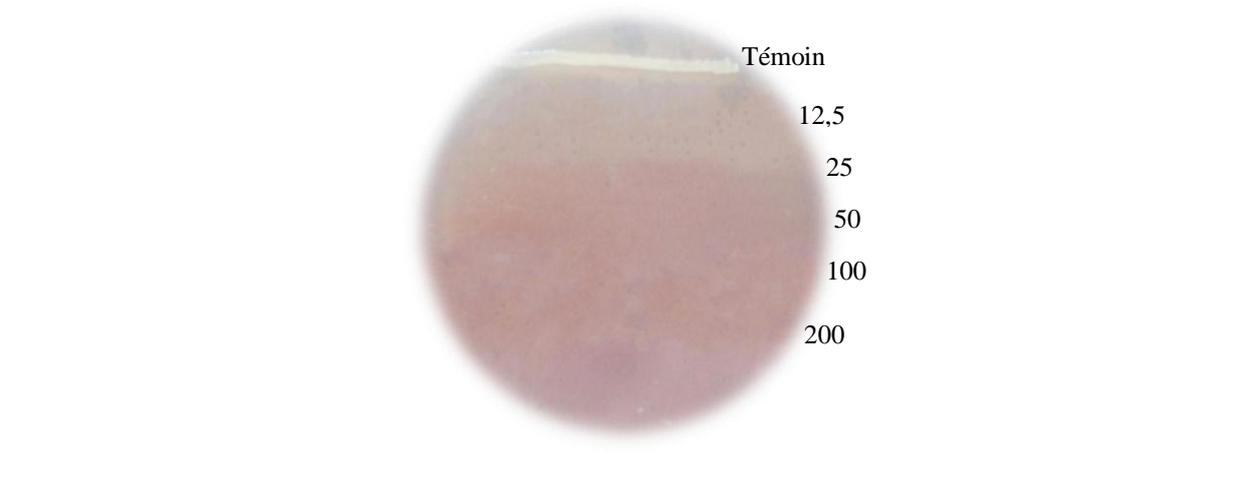
*Escherichia coli* ATCC 25922

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



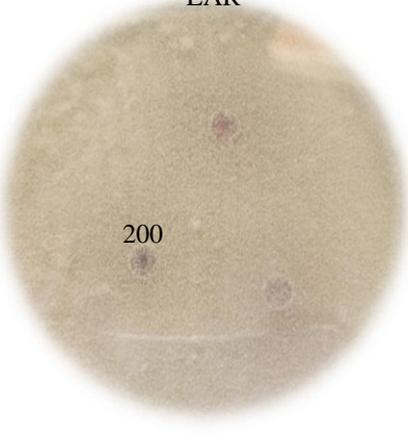
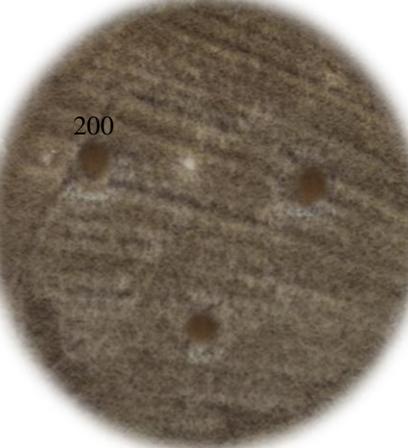
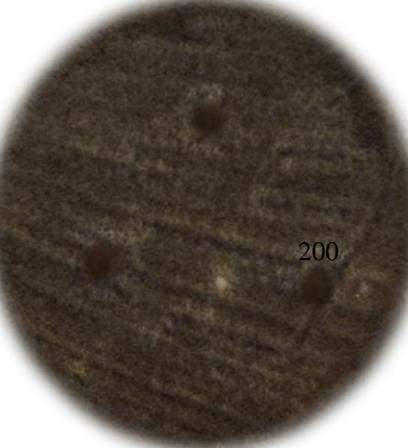
*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

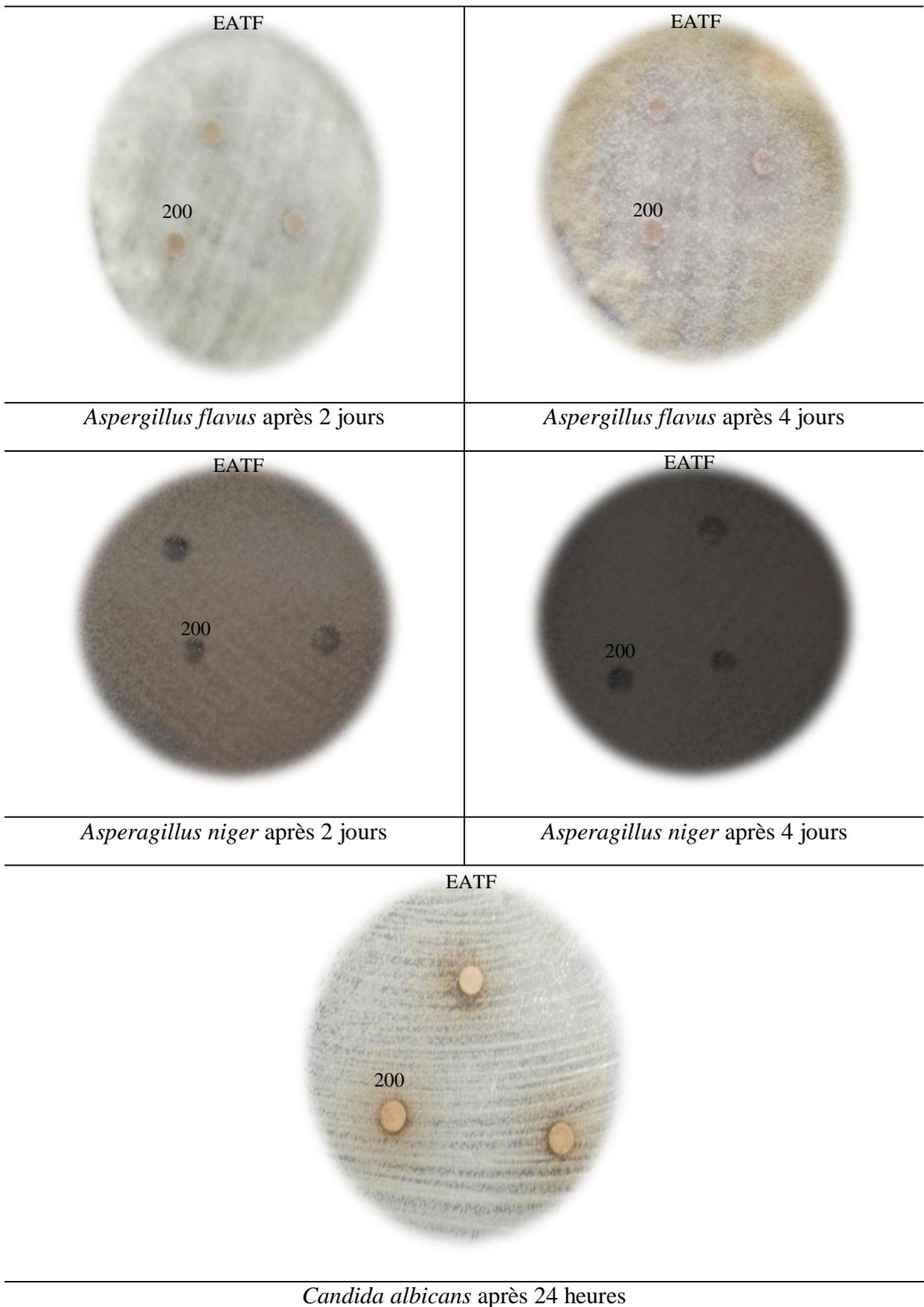
*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603

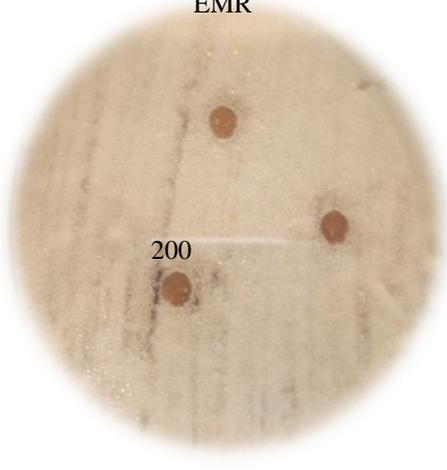
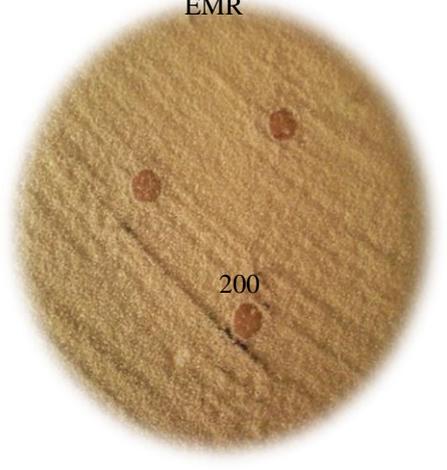
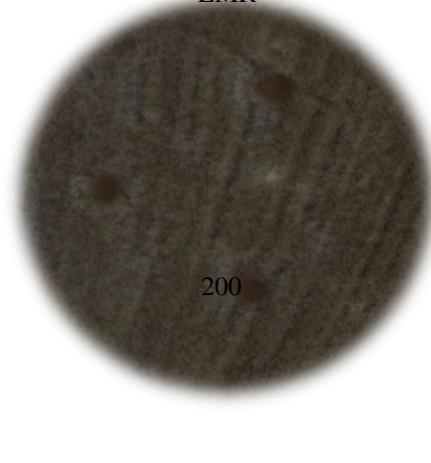
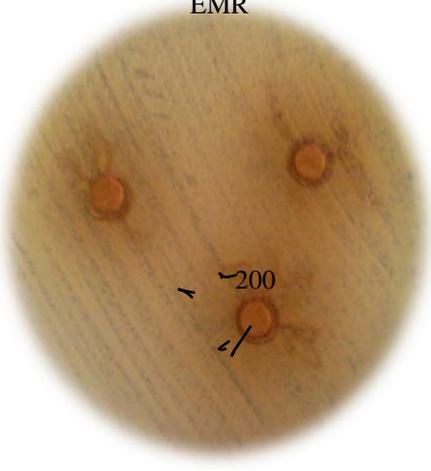


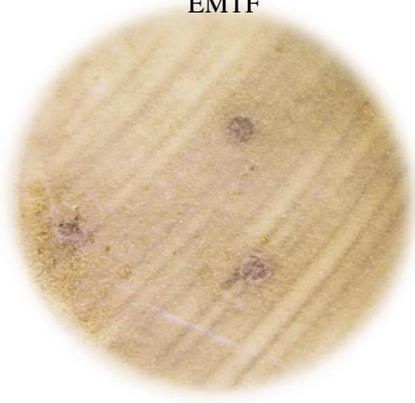
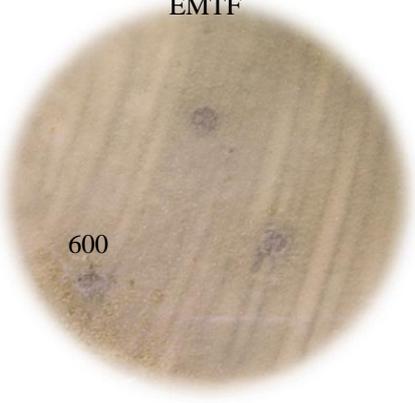
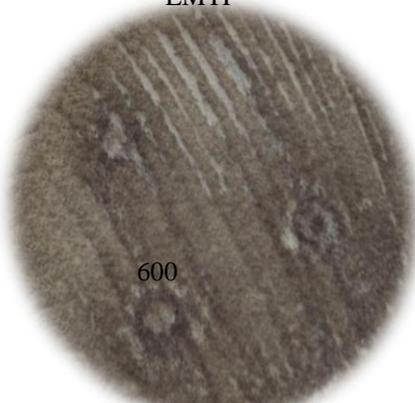
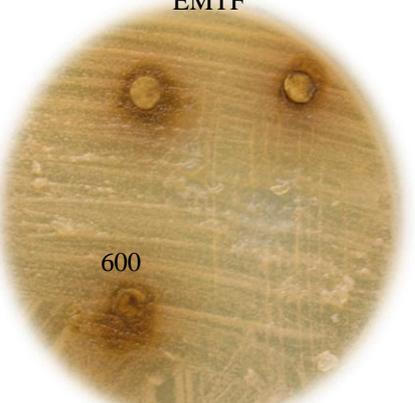
*Enterococcus faecalis* ATCC 49452

**Annexe III :** Effet des quatre extraits de *R. alaternus* sur les champignons étudiés.

<p>EAR</p> 	<p>EAR</p> 
<p><i>Aspergillus flavus</i> après 2 jours</p>	<p><i>Aspergillus flavus</i> après 4 jours</p>
<p>EAR</p> 	<p>EAR</p> 
<p><i>Asperagillus niger</i> après 2 jours</p>	<p><i>Asperagillus niger</i> après 4 jours</p>
<p>EAR</p> 	
<p><i>Candida albicans</i> après 24 heures</p>	



<p>EMR</p> 	<p>EMR</p> 
<p><i>Aspergillus flavus</i> après 2 jours</p>	<p><i>Aspergillus flavus</i> après 4 jours</p>
<p>EMR</p> 	<p>EMR</p> 
<p><i>Aspergillus niger</i> après 2 jours</p>	<p><i>Aspergillus niger</i> après 4 jours</p>
<p>EMR</p> 	
<p><i>Candida albicans</i> après 24 heures</p>	

<p>EMTF</p> 	<p>EMTF</p> <p>600</p> 
<p><i>Aspergillus flavus</i> après 2 jours</p>	<p><i>Aspergillus flavus</i> après 4 jours</p>
<p>EMTF</p> <p>600</p> 	<p>EMTF</p> <p>600</p> 
<p><i>Aspergillus niger</i> après 2 jours</p>	<p><i>Asperagillus niger</i> après 4 jours</p>
<p>EMTF</p> <p>600</p> 	
<p><i>Candida albicans</i> après 24 heures</p>	

تتسمي شجيرة *Rhamnus alaternus* الى عائلة *Rhamnaceae* وهي نبتة طبية واسعة الإستعمال في الطب التقليدي في الجزائر. قدر مردود الإستخلاص بالنقع في الميثانول للجزء الهوائي (EMTF) والإستخلاص بإستعمال جهاز Soxhlet للجزء الجذري (EMR) ب : 11 % و 10 % على التوالي. وكان مردود المستخلص المائي بالنسبة للجزء الهوائي (EATF) والجذري (EAR) عن طريق الغليان ب : 6 % و 8 % (ك/ك) لكلا الجزئين على الترتيب. قدرت عديدات الفينول الكلية في هذه المستخلصات بإستعمال متفاعل Folin-Ciocalteu حيث وجد 218 و 74 بالنسبة للجزء الهوائي (EATF) و (EMTF) على الترتيب، كما وجد 74 و 153 ملغ مكافئ حمض الكافيك/غ مادة طازجة بالنسبة للجزء الجذري (EMR) و (EAR) على التوالي. في حين وجدت الفلافونويدات الكلية والمقدرة بطريقة  $AlCl_3$  كما يلي : 108، 113، 66 و 49 ملغ مكافئ الكرسيتين/غ مادة طازجة لكل من EATF, EAR, EMTF, EMR على الترتيب وقدر محتوى الفلافونولات والفلافونات ب : 44، 48، 18 و 15 ملغ مكافئ الكرسيتين/غ مادة طازجة بالنسبة لنفس المستخلصات على الترتيب. ينحصر النشاط المضاد للأوكسدة المقدر بطريقة البكتاريون/حمض اللينولييك ما بين 76 و 87 % وهو قريب من نشاط الشاهد (BHT) 92 % عند تركيز 2 ملغ/مل. كانت قيم  $CI_{50}$  التراكيز المثبطة ل 50 % من الجذر الحر : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) و المعبرة عن النشاط المضاد لهذا الأخير : (37 : BHT)، (52 : EMR)، (66 : EATF)، (66 : EAR) و (71 ميكروغرام/مل بالنسبة ل : EMTF). أبدى اختبار النشاط المضاد للجراثيم على 11 سلالة بكتيرية غرام + وغرام - و 3 سلالات فطرية بإستعمال طريقة انتشار الأقرص تأثيرا مبطئا على خمس سلالات بكتيرية من طرف مستخلص واحد (EMR). كانت (CMI) التراكيز الدنيا المثبطة 6,25 ملغ/مل على : *E. coli*، *S. aureus*، *K. pneumoniae*، *E. faecalis* و 0,2 ملغ/مل على *P. aeruginosa*.

كلمات مفتاحية : متعدد الفينول، *Rhamnus alaternus* L.، نشاط مضاد للأوكسدة، نشاط مضاد للجراثيم.

## Abstract

*Rhamnus alaternus* L. a shrub which belonging to the *Rhamnaceae* family. It's a medicinal plant largely used in Algerian traditional medicine. The aerial parts of the plant (stems and leaves) were subjected to maceration in methanol (EMTF), whereas the roots were extracted in methanol (EMR) with Soxhlet. The decoction has been conducted both on the aerial parts (EATF) and roots (EAR) using distilled water. The yields were: 11 %, 10 %, 6 % and 8 % (w/w) for EMTF, EMR, EATF and EAR respectively. Total phenolic contents were determined using Folin-Ciocalteu reagent and found to be: 218 (EATF), 153 (EAR), 74 (EMTF) and 74 (EMR) mg EAC/ g of fresh weight. Flavonoids were evaluated by  $AlCl_3$  method and shown to be 108 (EATF), 113 (EAR), 66 (EMTF) and 49 (EMR) mg EQ/ g of fresh weight. The flavones and flavonols were estimated to be: 44 (EATF), 48 (EAR), 18 (EMTF) and 15 (EMR) mg EQ/ g of fresh weight. Antioxidant activity was evaluated using  $\beta$ -carotene/linoleic acid system, it ranged between 76 and 87 % for all extracts and seems to be closed to that of BHT 92 % when used at 2 mg/ml. Free radical scavenging effects were evaluated using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), The 50 percent inhibitory concentration for DPPH ( $IC_{50}$ ) were: 37 (BHT), 52 (EMR), 66 (EATF), 66 (EAR) and 71  $\mu$ g/ml (EMTF). The antimicrobial sensitivity of the extracts towards eleven bacterial strains (Gram+ and Gram-) and three fungus strains was assessed using the disc diffusion agar test; only one extract (EMR) has developed an inhibitory effect against five bacteria tested namely: *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* and *P. aeruginosa*. The minimal Inhibitory Concentrations (MICs) were respectively 6,25 mg/ml and 0,2 mg/ml.

**Key word:** phenolic content, *Rhamnus alaternus* L., antimicrobial activity, antioxidant activity. Résumé

## Résumé

*Rhamnus alaternus* L. est un arbuste qui appartient à la famille des *Rhamnaceae*. C'est une plante médicinale largement utilisée en médecine traditionnelle en Algérie. La partie aérienne de la plante (tiges et feuilles) a soumise à une macération dans le méthanol (EMTF), alors que l'extrait méthanolique des racines (EMR) est obtenu à l'extraction au Soxhlet, la décoction est réalisée à la fois sur les deux parties aérienne (EATF) et racines (EAR) dans l'eau distillée. Les rendements étaient de : 11 %, 10 %, 6 % et 8 % (m/m) pour EMTF, EMR, EATF et EAR respectivement. La teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de 218 (EATF), 153 (EAR), 74 (EMTF) et 74 (EMR) mg EAC/ g de matière fraîche. Les flavonoïdes ont été évalués par la méthode utilisant les chlorures d'aluminium  $AlCl_3$ , la teneur est estimée à 108 (EATF), 113 (EAR), 66 (EMTF), 49 (EMR) mg EQ/ g de matière fraîche. Le dosage des flavones et flavonols a révélé des teneurs de 44 (EATF), 48 (EAR), 18 (EMTF) et 15 (EMR) mg EQ/ g de matière fraîche. L'activité antioxydante a été réalisée par la méthode de décoloration du  $\beta$ -carotène / acide linoléique en utilisant des concentrations de 2 mg/ml pour les quatre extraits et varie entre 76 et 87 % alors que celle du témoin positif BHT est de 92 %. Quant au test anti radicalaire évalué en utilisant le 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle (DPPH), les concentrations inhibitrices à 50 % ( $CI_{50}$ ) sont estimées à 37 (BHT), 52 (EMR), 66 (EATF), 66 (EAR) et 71  $\mu$ g/ml (EMTF). L'activité antimicrobienne a été déterminée sur onze souches bactériennes (Gram+ et Gram-) et trois champignons selon la méthode de diffusion de disque, un seul extrait (EMR) a manifesté un effet inhibiteur sur 5 souches bactériennes. Les concentrations minimal inhibitrices (CMI) pour *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* et *E. faecalis* est de 6,25 mg/ml et 0,2 mg/ml pour *P. aeruginosa*.

**Mots clés:** Polyphénols, *Rhamnus alaternus* L., activité antimicrobiennes, activité antioxydante.