

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**UNIVERSITE BLIDA 1**

**Faculté Des Sciences Technologiques**

Département de Génie Des Procédés



**MEMOIRE DE MASTER PROFESSIONNEL**

En Génie Des Procédés

Spécialité : Pharmacie Industrielle

**Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des  
polyphénols et des flavonoïdes issues de plante médicinale**  
***Rétama Raetam***

Par

**CHEKALAINÉ Chahira et MERAÏKI Naima**

Devant le jury :

DJALLEB	Professeur	Université de Blida	Président
BOUCHERIT	Maître de conférences A	Université de Blida	Examineur
BOURAYOU	Maître de conférences A	Université de Blida	Examinatrice
H. LARIBI	Maître de conférences A	Université de Blida	Promotrice
Z.BENMAAMAR	Maître de conférences A	Université de Blida	Co-promoteur

Promotion 2016/17

## RESUME

Notre travail consiste à étudier les composés phénoliques et les flavonoïdes en évaluant leurs activités antioxydantes et antibactériennes, puis les utilisés dans l'élaboration d'une pommade à base des extraits naturels actifs, dans le cadre de notre recherche, on a choisi la plante médicinale *Rétama raetam* de région de Mostaganem, d'où nous avons comparé entre une première plante qui était séché et conservé pendant trois ans, et une deuxième plante récemment récolté, afin d'évaluer leurs capacité à conserver ses activités. De plus nous avons choisi *Cytisus triflorus* de région de Blida.

La première partie de l'étude consiste à extraire les polyphénols et les flavonoïdes à partir des fleurs et tiges de rétame et les feuilles de *Cytisus triflorus* avec le méthanol et l'acétone dilués, puis avec des solvants organiques, l'acétate d'éthyle et n-butanol. Nous avons quantifié les polyphénols totaux et les flavonoïdes avec le réactif Folin-ciocalteu et le trichlorure d'aluminium respectivement. Les résultats montrent la richesse des extraits en ces composés, d'où on a marqué que la quantité en polyphénols l'extrait d'acétate des feuilles de *Cytisus triflorus* est de 687,26 µg. EqAG /mg d'extrait et de 221,083 µg. EqC /mg d'extrait en flavonoïdes. Pour les extraits de Rétame on a marqué que les teneurs des deux plantes sont très proche, avec 304,08 et 309,96 µg. EqAG /mgE respectivement, ceci confirme leurs capacité à être conservés et de garder leurs propriétés.

La deuxième partie consiste à évaluer l'activité antioxydante des extraits avec deux techniques ; la réduction de fer et le piégeage de radical libre DPPH•, les résultats ont confirmé la corrélation entre les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes avec le pouvoir antioxydant, avec ( $R^2= 0,6409$ ) et ( $R^2=0,734-0,86$ ) respectivement par réduction de fer, et avec ( $R^2=0,3721$ ) et ( $R^2=0,6359-0,9418$ ) par piégeage de radical libre DPPH•. L'extrait d'acétate des feuilles de *cytisque triflorus* a marqué un pouvoir antioxydant fort d'où  $IC_{50} = 0,022$  mg/ml par rapport à l'acide ascorbique avec  $IC_{50} = 0,032$  mg/ml, et un fort piégeage de radical libre DPPH• avec  $EC_{50}= 0.05$  mg/ml par rapport à l'acide ascorbique  $EC_{50}=0.062$  mg/ml. Suivi par les extraits de rétama avec un pouvoir considérable, avec des  $IC_{50}= 0.068$  et  $0.1$  mg/ml et des  $EC_{50}=0.470$  et  $1$  mg/ml. Une corrélation entre les deux méthodes montre la participation de 92.45% des antioxydants surtout les flavonoïdes.

La troisième partie de notre étude concernant l'activité antibactérienne et antifongique des extraits des plantes étudiés *Retama raetam* et *Cytisus triflorus*, nous avons marqués que tous les extraits possèdent une activité moyenne, et ceci est confirmé par les résultats obtenus par la méthode de diffusion sur milieu gélosé d'où nous concluons que l'extrait de *Cytisus triflorus* possède une activité meilleur par rapport aux extraits de la rétame et de contrôle positive.

Enfin, nous avons élaboré une pommade cicatrisante et antifongique à base des extraits naturels, avec une concentration de 1% et un pH de 5,56 et un écoulement rhéofluidifiant.

**Mots clés :** polyphenols ; flavonoides ; *Retama raetam* ; *Cytisus triflorus* ; anti-oxydant ; antibacterienne.

## ملخص

يشمل هذا العمل دراسة المواد الفينولية و الفلافونويد بتقييم نشاطاتها المضادة للأكسدة و المضادة للبكتيريا ثم استغلال مستخلصاتها الغنية بهذه المواد في صياغة و اعداد مرهم بمستخلصات طبيعية فعالة و قد تم في هذا الاطار اختيار النبتة الطبية *Rétama raetam* او الرتم من مدينة مستغانم و المقارنة بين نبتة اولى تم تجفيفها وحفظها لمدة ثلاثة اعوام و ثانية حديثة القطف لتقييم قدرة هذه المواد في الحفاظ على نشاطاتها. بالإضافة لشجرة النحل من البليدة *Cytisus triflorus*

يهتم الجزء الاول من دراستنا باستخلاص العناصر الفينولية و الفلافونويدات لأزهار و اغصان نبتة الرتم واوراق شجرة النحل بإذابتها في الميثانول و الاسيتون المميئين على التوالي ومن ثم في المذيبات العضوية خلات الايثيل و 1- بوتانول . وقد تم تقييم كمية الفينولات الكلية و الفلافونويد عن طريق كاشف Folin ciocalteu واختبار ثلاثي كلوريد الالمنيوم على التوالي و التي كشفت ثراء النبتتين بهذه المواد حيث سجلت وجود كمية معتبرة في مستخلص الخلات لأوراق *Cytisus triflorus* 687,26 ملغ EAG \ Eغ وتراوحت كمية الفلافونويد ب 221,083 ملغ EC \ E كما سجلت مستخلصات نبتتي *Rétama raetam* تقارب في النتائج حيث سجلت 304,08 و 309,96 ملغ EAG \ Eغ للأولى و الثانية على التوالي مما يؤكد نشاطها كمواد طبيعية حافظة .

الجزء الثاني تناول تقييم النشاط المضاد للأكسدة لجميع المستخلصات عن طريق تقنينين وهما الاولى ارجاع الحديد و الثانية محاصرة الجذر • DPPH اللتان اكدتا وجود علاقة ايجابية بين القدرة المضادة للأكسدة وكمية متعدد الفينولات و بالأخص الفلافونيد حيث سجلنا (  $R^2=0,6409$  ) و (  $R^2=0,734-0,86$  ) لإرجاع الحديد و (  $R^2=0,3721$  ) و (  $R^2=0,6359-0,9418$  ) محاصرة الجذر • DPPH على التوالي. كما احتوى مستخلص الخلات لأوراق *Cytisus triflorus* على افضل قدرة إرجاعه (  $IC50 = 0,022$  ملغ/مل) مقارنة بحمض الاسكوربيك (  $IC50 = 0,032$  ملغ/مل) وهي قوية المحاصرة لجذور • DPPH (  $EC50 = 0,05$  ملغ/مل) مقارنة بحمض الاسكوربيك (  $EC50 = 0,062$  ملغ/مل) متبوعة بمستخلصات نبتة *Retama raetam* ذات قدرة إرجاعه معتبرة حيث سجلنا  $IC50$  تتراوح بين 0.068 و 0.102 ملغ/مل و بالنسبة لمحاصرة جذور • DPPH قد تراوحت بين 0.470 و 1 ملغ/مل. في النهاية سجلنا علاقة ايجابية بين التقنينين مما يفسر مساهمة اكثر من 92.45% من المواد المضادة للأكسدة في النبتة خصوصا الفلافونويدات.

الجزء الثالث قيمنا فيه النشاط المضاد للبكتيريا اضافة الى المضاد للفطريات و قد اظهرت النتائج حساسية هذه الاخيرة للمستخلصات المدروسة . كما سجلنا فعالية مستخلص شجرة النحل بينما لم يسجل الشاهد اي فعالية ضدها.

في النهاية قمنا بصياغة و اعداد مرهم مضاد للبكتيريا و لاثم للجروح و قد بينت نتائج التحاليل ان المرهم مع تركيز 1% كانت ذات تركيب مستقر و pH في حدود pH البشرة حيث سجلناه يساوي 5.65 و كانت ذو سيلان غير نيوتوني من نوع *rhéofluidifiant*.

**الكلمات المفتاحية:** مضاد البكتيريا , مضاد الاكسدة , مرهم , الفلافونويد, البوليفول, شجرة النحل,- الرتم.

## ABSTRACT

our main work consist of studying phenolic compounds and flavonoids by evaluate their antioxidant and antibacterial activities, then using them in the formulation of an ointment with the active natural extracts of plants. Within the framework of our research, we have chosen the medicinal plant *Retama raetam* or as called white weeping broom of state of Mostaganem, in the aim to compare between two plants, the first one was dried and conserved for three years, and the second one was recently cropped, to evaluate their capacities of conserving their activities. Plus we picked up as well *Cytisus triflorus* from the state of Blida.

The first part of our work consist of extract the total phenol compounds and flavonoids from flowers and stems of of *retama* and from the leaves of *Cytisus triflorus* with diluted methanol and acetone, then with organic solvent ethyl acetate and n-butanol, we have quantified total polyphenol compounds and flavonoids by using Folin ciocalteu reagent and trichlorure aluminium respectively. The results showed that the extracts are rich with these compounds; the content of polyphenols in the phenolic extract of the leaves of *cytistus* was about 687.26  $\mu\text{g}$ . EqGA /mg DM, and about 221,083  $\mu\text{g}$ . EqC /mgDM with flavonoids content. in the other hand, phenolic extracts of *Retama raetam* indicated close contents of the two plants with 304,08 and 309,96  $\mu\text{g}$ . EqAG /mg DM respectively, these results confirm their ability to be conserved and to keep their proprieties.

The second part consist of evaluate the antioxidant activity of the extracts by using two methods; reducing power and DPPH• scavenging activity. The results confirmed a correlation between the total phenolic and flavonoids contents and the antioxidant power, with ( $R^2= 0.6409$ ) and ( $R^2=0,734 -0.86$ ) by reducing power, and ( $R^2=0.3721$ ) and ( $R^2=0.6359-0.9418$ ) by DPPH• scavenging activity. The acetate extract of de *cytistus triflorus* showed a strong reducing power with  $IC_{50} = 0,022$  mg/ml compared with the ascorbic acid  $IC_{50} = 0,032$  mg/ml, and a strong scavenging activity ( $EC_{50}= 0.05$  mg/ml) compared to ascorbic acid  $EC_{50}=0.062$  mg/ml, followed by *retama* extracts which showed a good antioxidant power, with  $IC_{50}$  between 0.068 and 0.1 mg/ml, and  $EC_{50}$  between 0.470 and 1 mg/ml. a correlation was found between the two methods which explains the contribution of more than 20 % of plant antioxidants particularly flavonoids.

The third part consist the antimicrobial activity of extracts of the two plants *Retama raetam* and *Cytisus triflorus*, the results showed a better activity of *Cytisus triflorus* extract then the others extracts of *Retama raetam* and positive control.

Finally, we have made an antimicrobial and cicatrising ointment with these natural extracts, with an dose of 1% and a pH of 5.56 and with a rhéofluidifiant flow.

**Key words:** polyphenols, flavonoids, *Retama raetam*, *Cytisus triflorus*, anti-oxydant, antibacterien.

# *Dédicace*

*Je dédie ce travail :*

*A mes chers parents et beaux-parents qui ont été toujours présents quand il le faut.*

*A mes frères et ma sœur.*

*A toute ma famille.*

*A mon binôme Naima.*

*A tous mes amis.*

*A mon cher mari.*

*A ma fillette **Aïcha**.*

*Chahira*

## *DEDICACE*

*A*

*Mes parents,*

*Mon père Khaldoun*

*Pour vos mains qui ont tant travaillées,*

*Ma mère Hadjer*

*Pour vos leçons qui m'ont tant donné,*

*A ma chère Razika qui m'a soutenu beaucoup*

*Pour vous qui m'avez tant aimé. Que Dieu vous protège.*

*Mes frères: kholaid, Mohammed, Abdelmouine*

*Et à mon petit chérie Abdelrahmene*

*Les membres de ma famille paternelle et maternelle.*

*Mes amies d'enfance, d'étude en particulière Sarra, Nouara Soumaia  
et Imene, sans oublier mon binôme et belle amie Chahira.*

*Aux étudiants de la promotion Pharmacie industrielle.*

*Je dédie ce travail*

*NAIMA*



# Remerciements

*Avant tous, nous tenons à remercier dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage, la force et la volonté d'accomplir ce travail.*

*Nous tenons à remercier notre promotrice M<sup>me</sup> LARJIBI H. pour nous avoir consacré le temps nécessaire à la réalisation de ce travail ainsi pour sa gentillesse, ses encouragements et ses précieux conseils.*

*Et notre Co-promoteur Mr BENMAAMER Z pour son aide et ses conseils.*

*Nous tenons à remercier également :*

*Mr DJELLAB qui nous a fait le plaisir de présider ce jury, qu'il  
Trouve ici notre profond respect.*

*M<sup>me</sup> BOURAYOU pour avoir bien voulu examiner ce travail et être  
membre de jury.*

*Mr BOUCHERIT pour avoir accepté de faire partie des membres du jury.*

*Nous remercions toute l'équipe de laboratoire d'hygiène FERodja qui nous ont accueillie chaleureusement surtout Mr TEFFAHI D. Ainsi que M<sup>me</sup> NEKAB S. Pour ses encouragements ainsi pour sa compréhension dont ils nous ont fait preuve tout au long de la réalisation de notre activité.*

*Mes remerciements vont particulièrement à la doctorante Mme BELHADJI qui nous a aidés avec ses conseils, ainsi pour sa simplicité et sa sympathie.*

*Mes sincères remerciements s'adressent à Nabil, Mourad, Taher et Zahiya les techniciens des laboratoires au département de génie des procédés à l'université de Blida1 qui nous ont aidé pour la réalisation de ce travail, sans oublier nos collègues Mme DJIYER, Melles TIMIZART, SALEM, Sabiha, Cherifa, Rayhana, Louiza, Imene qui nous ont beaucoup aidées.*

*Nous remercions les doctorants Mohamed, Zineb, Assia et surtout M. Nabil pour leurs aides précieuses tout au long de ce mémoire.*

*On tient à exprimer notre gratitude et nos remerciements à Melle CHEKALAINÉ Rabéa qui nous a aidées dans la réalisation de cette étude et son encouragement et ses conseils précieuse.*

*Nous remercions également toute personne ayant aidé de loin ou de près afin de réaliser ce travail.*



## LISTE DES ABREVIATIONS

ABTS : acide 2,2'-azinobis 3-ethylbenzo-triazoline-6-sulphonate

ADN : acide désoxiribonucléique

AE : efficacité antiradicalaire

AlCl<sub>3</sub> : trichlorure d'aluminium.

ATB : antibiotique

C : Carbone.

DMPD : Balayage du radical cation N, N- dimethyl-*p* phenylenediamine

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

E/H : émulsion eau dans huile

EAG : équivalent d'acide gallique

EC : équivalent de catéchine

EC50 (IC50) : concentration inhibitrice à 50 %

ECtAc : la fraction d'acétate d'éthyle des feuilles de *Cytisus Triflorus*

EFAc : l'extrait des fleurs de Rétame à partir d'acétate d'éthyle

ERN : Les espèces réactives azotées

ERO : espèces réactives de l'oxygène

ET1Ac : Fraction des tiges de Rétame plante A d'acétate d'éthyle

ET1Bn : Fraction des tiges de Rétame plante A de n-butanol

ET2Bn : Fraction des tiges de Rétame plante B de n-butanol

FeCl<sub>3</sub> : trichlorure de fer

FRAP : Capacités réductrices ferriques d'antioxydants (*Ferric reducing/antioxidant power*)

H/E : émulsion huile dans l'eau

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peroxyde d'hydrogène

MS : matière sèche

NO• : monoxyde d'azote

O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> : anion superoxyde

OH : groupe hydroxyle

ONOOH : nitroperoxyde

ORAC : Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

PCL : photochimiluminescence

Plante A : Rétame récolté en printemps 2014

Plante B : Rétame récolté en printemps 2017

ROOH : peroxydes organiques

ROO• : radical peroxyde

TEAC : capacité antioxydante équivalente de Trolox (*trolox-equivalent antioxidant capacity*)

TOSC : Capacité du piégeage des oxy-radicaux totaux (*Total Oxyradical Scavenging Capacity*)

UFC : Unité Formant Colonie.

UV : ultraviolet

•O<sub>2</sub> : oxygène singulet

•OH : radical hydroxyle

## LA LISTE DES TABLEAUX

### *Partie bibliographique*

Tableau 2.1 : Quelques Travaux Antérieurs	12
Tableau 4 : les mécanismes de la résistance des bactéries	18

### *Partie expérimentale*

Tableau 1.1 : Les caractéristiques des extraits obtenus	37
Tableau 1.2 : Teneurs en phénols totaux et flavonoïdes totaux des deux plantes	39
Tableau 2.1 : Pouvoir réducteur des extraits des plantes étudiées par réduction de fer	41
Tableau 2.2 : les valeurs des IC50 des extraits étudiés	42
Tableau 2.3 : le pouvoir antioxydant des extraits par DPPH exprimé en (%)	44
Tableau 2.4 : Détermination des concentrations EC50 et l'efficacité anti-radicalaire	45
Tableau 2.5 : Zones d'inhibition (mm) (moyenne±écart type) de la croissance Des souches bactériennes et les champignons	
Tableau 3.1 : les proportions et résultats de la première manipulation	55
Tableau 3.2 : les proportions et résultats de la deuxième manipulation.	56
Tableau 3.3 : les proportions et résultats de la préparation de 100g	57

## LISTE DES FIGURES

### *PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE*

Figure 1.1 : la structure de l'acide benzoïque et l'acide gallique	04
Figure 1.2 : Exemple de quelques acides phénols de la série cinnamique	04
Figure 1.3 : Structure de base d'un flavonoïde	05
Figure 1.4 : Structure du cation flavylum ou 2-phényl-1-benzopyrilium	05
Figure 1.5 : Structure de la (+) – catéchine	05
Figure 1.6 : Structure générale des flavonoïdes	07
Figure 1.7 : Structures des squelettes de base des flavonoïdes	07
Figure 1.8 : Structures des squelettes de base des flavonoïdes	08
Figure 2.1: Rétama raetam (Forssk.) Webb et Berth	11
Figure 2.2 : cytisis triflorus	13
Figure 1.2 : les fleurs séchés de Rétama <i>raetam</i>	21
Figure 2.1 : Extraction par macération des feuilles des <i>Cytisus triflorus</i> .	25
Figure 2.2: montage d'extraction liquide-liquide	25
Figure 2.3 : Evaporation à sec avec le rota-vapeur	25
Figure 2.4 : Protocole d'extraction des phénols totaux et les flavonoïdes	26
Figure 3.1 : Schéma sur la réaction de test FRAP (Ferric reducing antioxidant power)	28
Figure 3.2: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydant	29
Figure 3.1 : schéma simplifié du principe de la méthode de l'aromatogramme	30
Figure 3.1 : les préparations d'extraits	31
Figure 3.2 : les suspensions bactériennes	31
Figure 3.4 : boîtes de pétri contenant le milieu de culture	31
Figure 4.1 : Protocole de la préparation de la pommade	35
Figure 4.1: Rhéomètre Anton Paar Modular Compact Rheometer MCR 302	36

## ***PARTIE EXPERIMENTALE***

Figure 1.1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux	38
Figure 1.2: Courbe d'étalonnage de Quercetine pour Le dosage des flavonoïdes	38
Figure 1.3: Courbe d'étalonnage de la Catéchine pour le dosage des flavonoïdes	39
Figure 2.1 : comparaison entre les IC50 des extraits	42
Figure 2.2 : Corrélation entre la réduction de fer exprimée en valeurs IC50 des extraits et les teneurs en phénols totaux	43
Figure 2.3 : Corrélation entre la réduction de fer exprimée en valeurs IC50 des extraits et les teneurs en flavonoïdes	44
Figure 2.4 : comparaison entre les EC50 (mg/ml) des extraits étudiés	46
Figure 2.5 : Corrélation entre le piégeage de radical libre DPPH exprimée en valeurs EC50 des extraits et les teneurs en phénols totaux	46
Figure 2.6 : Corrélation entre le piégeage de radical libre DPPH exprimée en valeurs EC50 des extraits et les teneurs en flavonoïdes	47
Figure 2.7: Corrélation entre les valeurs des IC50 (mg/ml) et EC50 (mg/ml)	47
Figure 2.8 : photo montrant l'effet de l'extrait aqueux de <i>Ratama raetam</i> et <i>Cytisus triflorus</i> sur les champignons ( <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> - <i>Aspergillus brasiliensis</i> )	48
Figure2.9 : photo montrant l'effet de l'extrait aqueux de <i>Ratama raetam</i> et <i>Cytisus triflorus</i> sur les bactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Bacillus sp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i> )	49
Figure 2.10 : Variation du diamètre des zones d'inhibition de la croissance de souches vis-à-vis des produits testés à différents concentration	51
Figure 3.1 : la pommade 1% après 2 mois	57
Figure 3.2 : la pommade 2% après 2 mois	57
Figure 3.3 : la pommade 3% après 2mois	57
Figure 3.4 : la pommade 5% après 2 mois	
Figure 3.5 et 3.6 : images microscopique de la pommade 1	58
Figure 3.7: Rhéogramme des courbes d'écoulements des pommades préparés	58
Figure 1 : Principaux éléments de l'activité antyoxidante des flavonoïdes	62

## TABLE DES MATIERES

<i>Introduction générale</i>	1
<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
CHAPITRE 1 : LES POLYPHENOLS ET LES FLAVONOIDES	3
1 .Substances actives des plantes	3
1.1. Les métabolites secondaires	3
2. Les polyphénols	4
2.1 Classification des polyphénols	4
2.1.1. Les acides phénols	4
2.1.2. Les Flavonoïdes	5
2.1.3. Les Anthocyanes	5
2.1.4. Les Flavanes	6
2.1.5. Les Tannins	6
2.2. Intérêts thérapeutiques des polyphénols	6
3. Les Flavonoïdes	7
3.1. Classification des flavonoïdes	7
3.2. Les intérêts thérapeutiques des flavonoïdes	8
CHAPITRE 2 : PRESENTATION DE LA PLANTE ETUDIEE RETAMA RAETAM	10
Introduction	10
1. Les Rétames	10
1.1. L'espèce <i>Rétama raetam</i>	10
1.2. Distribution géographique	11
1.3 Description des rétames	11
1.3.1. Morphologie : Description botanique	11
1.4. Utilisation : Les intérêts	12
1.4.1. Intérêts écologique	12
1.4.2. Intérêt pharmacologique	12
1.4.3. Travaux antérieurs	12
2. Présentation de la plante <i>cytissus triflorus</i>	13
2.1.l'espece <i>cytissus triflorus</i>	13
2.2. Distribution géographique.	13
2.3. Description botanique	13
2.4.Intérêts thérapeutiques et l'utilisation traditionnelle de <i>Cytissus triflorus</i>	13
CHAPITRE 03 : L'ACTIVITE ANTIOXIDANTE	14
1. Les radicaux libres	14
1.2. Différents types des radicaux libres	14
1.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)	14
1.2.2. Les espèces réactives azotées (ERN)	14
2. Les conséquences des radicaux libres et le stress oxydant	15
3. L'antioxydant	15

4. Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes in vitro	15
<b>CHAPITRE 4 : L'ANTIBIORESISTANCE</b>	16
1. Définition	16
2. Impact de l'antibiorésistance	17
3. Types de résistance bactérienne	17
3.1. La résistance naturelle	17
3.2. La résistance acquise	17
3.3. Mécanismes de la résistance	17
<b><i>PARTIE EXPERIMENTALE</i></b>	
Diagramme de la démarche expérimentale	19
<b>CHAPITRE 01 MATIERE VEGETALE ET MICROBIENNE</b>	20
1- Matériel végétal	20
2. Matériel microbien	21
3. Milieux de culture	21
4. Contrôles positif	21
<b>CHAPITRE 02 : EXTRACTION ET DOSAGE</b>	22
1. Extraction à partir de <i>Rétama raetam</i>	22
2. Extraction à partir de <i>Cytissus triflorus</i>	23
3. Protocole d'extraction des phénols totaux et les flavonoïdes	25
4. Calcul du rendement	26
5. Dosage des polyphénols totaux	26
6. Dosage des flavonoïdes totaux	26
<b>CHAPITRE 03 : EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE</b>	27
1. Réduction de fer	27
2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil)	28
<b>CHAPITRE 04 : EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE</b>	29
1. Préparation des extraits	29
2. Préparation de l'inoculum bactérien	30
3. Préparation des disques	30
4. Préparation des milieux de culture	30
5. Ensemencement	31
6. Lecture	31
<b>CHAPITRE 5 : FORMULATION D'UNE POMMADE</b>	32
1. la préparation d'une pommade antibactérienne et cicatrisante	32
1.1. Les produits utilisés	32
1.2. Le mode opératoire	33
2. Caractérisations de la pommade	34
2.1. La stabilité de la pommade	34
2.2. Le pH de la pommade	35
2.3. La viscosité	35
2.4. L'homogénéité	35

## ***PARTIE RESULTAT***

CHAPITRE 01 : RENDEMENTS D'EXTRACTION ET DOSGES	36
1. Rendements de l'extraction	36
2. Dosage de polyphénols totaux et flavonoïdes	37
CHAPITRE 2 : EVALUATION D'ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET ANTIBACTERIENNE	40
I. EVALUATION D'ACTIVITE ANTIOXYDANTE	40
1. Réduction de fer	40
2. Piégeage du radical libre DPPH •	43
3. La corrélation entre les deux méthodes	46
II. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE	47
CHAPITRE 03 : FORMULATION D'UNE POMMADE A BASE DES EXTRAITS	54
1. la préparation d'une pommade à base des extraits étudiés	54
1.2. La stabilité de pommades préparées dans le temps	56
1.3. Contrôle de l'homogénéité par microscopie optique	57
1.4. Détermination de la viscosité et étude de l'écoulement par rhéologie	57
<i>Discussion des résultats</i>	59
<i>Conclusion</i>	65



# ***INTRODUCTION GENERALE***

## INTRODUCTION GENERALE

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes [1]. Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité pour lutter contre les infections antibiorésistantes et se soigner grâce à la phytothérapie et à l'aromathérapie. [2]

Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours aux propriétés curatives des plantes et que les traitements à base de ces dernières reviennent au premier lieu car l'efficacité des médicaments décroît vue leurs effets secondaires sur la santé publique. L'organisation mondiale de la santé [2] estime qu'environ 81% de l'humanité a recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire [3].

Les plantes sont capables de produire une grande diversité de produits ne participant pas à leur métabolisme de base, mais représentant plutôt des produits du métabolisme secondaire. Nous pouvons citer comme exemple les alcaloïdes, les terpènes, les stéroïdes, les polyphénols, les huiles essentielles...etc. Parmi ces composés, les polyphénols et principalement les flavonoïdes représentent l'un des groupes les plus importants du fait qu'ils aient une faible toxicité et de nombreux avantages biologiques, notamment thérapeutiques, pharmaceutiques, cosmétologiques et alimentaires.

En effet, l'activité antioxydante a été attribuée à la majorité des flavonoïdes découverts. Ces derniers avaient la capacité de neutraliser différents types de radicaux libres : les peroxydes ( $\text{ROO}\cdot$ ), les alcoxyles ( $\text{RO}\cdot$ ), les superoxydes ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) et les hydroxyles ( $\text{HO}\cdot$ ) ; empêchant de ce fait l'oxydation des lipides, des protéines, des enzymes et de l'ADN.

De même, nombreuses études ultérieures ont prouvé que les flavonoïdes étaient capables d'inhiber différents types de microorganismes : bactéries, levures, moisissures, protozoaires et même virus. Néanmoins il y avait une grande spécificité entre les molécules actives et les microorganismes visés ; d'où l'importance de bien choisir le flavonoïde approprié.

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche des antioxydants et des agents antibiotiques naturels, en évaluant leurs propriétés antioxydantes des polyphénols et des flavonoïdes d'une plante médicinale *Rétama raetam*, suivi par l'évaluation de leurs activités antibactériennes. Pour le but de bénéficier de ces propriétés thérapeutiques, une mise en forme galénique est élaborée sous forme de pommade pour application cutané. De plus, pour enrichir les effets pharmacologiques de notre produit, une deuxième plante *Cytisus triflorus* très connu dans la médecine traditionnelle en Algérie par ses propriétés antifongiques et cicatrisantes, est étudié en parallèle avec *Rétama raetam*, puis ajouté à la formulation comme un deuxième principe actif.

La structure de notre étude se repose sur les objectifs suivants:

- ✓ **Premièrement** : Préparer les extraits végétaux et déterminer leurs teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes, par extraction froide « macération », avec des solvants de polarité différente, et sélectionner le meilleur solvant organique pour extraire les polyphénols, sélectionner les extraits avec la meilleur activité antioxydante, antibactérienne, et antifongique.
- ✓ **Deuxièmement** : comparer entre les teneurs de deux plantes de *Rétama raetam* l'une séché et conservé pendant trois ans et l'autre récemment récolté,
- ✓ **Troisièmement** : évaluer l'activité antioxydante des extraits phénolique par deux méthodes ; réduction de fer FRAP, et piégeage de radical libre DPPH•, et déterminer la corrélation entre les polyphénols et les flavonoïdes avec le pouvoir antioxydant.
- ✓ **Quatrièmement** : évaluer l'activité antibactérienne et antifongique des extraits *in vitro* par diffusion sur milieu gélosé sur 5 bactéries et 3 champignons.
- ✓ **Cinquièmement** : élaborer une pommade cicatrisante, antibactérienne et antifongique à base des extraits des fleurs de *rérama raetam* et des feuilles de *cytisque triflorus*.

## CHAPITRE 01 : LES POLYPHENOLS ET LES FLAVONOIDES

### 1. Substances actives des plantes

Les plantes ont une importance capitale pour la survie de l'homme et des différents écosystèmes. Elles renferment une partie importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme. On distingue ainsi deux groupes de métabolites : les métabolites primaires et secondaires [4]

❖ Les métabolites primaires : sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ces composés sont classés en quatre principaux groupes, les glucides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques.

❖ Les métabolites secondaires : sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures. Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante, et sont émis en très faible quantité, sont d'une grande variété structurale, plus de 200000 structures définies. [5]

#### 1.1. Les métabolites secondaires

On trouve des métabolites secondaires dans toutes les parties de plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à l'autre. Parmi les principales familles de métabolites secondaires trouvées chez les plantes on distingue :

- Les composés phénoliques qui interviennent dans les interactions plante-plante (allélopathie, inhibition de la germination et de la croissance). Parmi ces composés, on citera les polyphénols, les lignines, les flavonoïdes, les anthocyanes et les tannins.
- Les alcaloïdes, renferme un atome d'azote dans la structure. Parmi ces derniers, certains relèguent de l'acide cyanhydrique quand les plantes sont abîmées. Ils sont synthétisés à partir d'acides aminés. On citera la nicotine, l'atropine, la codéine, la lupinine.
- Les huiles essentielles : Ce sont des liquides concentrés et hydrophobes des composés aromatiques (odoriférants) volatils d'une plante, ces essences sont très volatiles et non miscibles l'eau [6]

## 2. Les polyphénols

Comme définition, nous pouvons dire que les polyphénols sont des composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines [4] [7]

### 2.1 Classification des polyphénols

Les polyphénols regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres constituants [8]. Dans cette famille de molécules, se trouvent de nombreuses substances, qui peuvent se classer selon leur structure en cinq groupes principaux:

#### 2.1.1 Les acides phénols

Ils ont une fonction acide et plusieurs fonctions phénols. Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature. Ils se divisent en deux catégories :

a- Les acides phénols dérivés de l'acide benzoïque comme l'acide gallique.

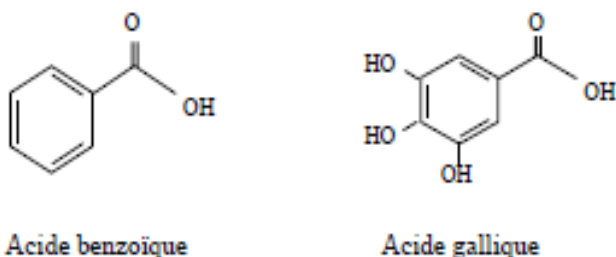


Figure 1.1 : la structure de l'acide benzoïque et l'acide gallique [8] [9]

b- Les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique

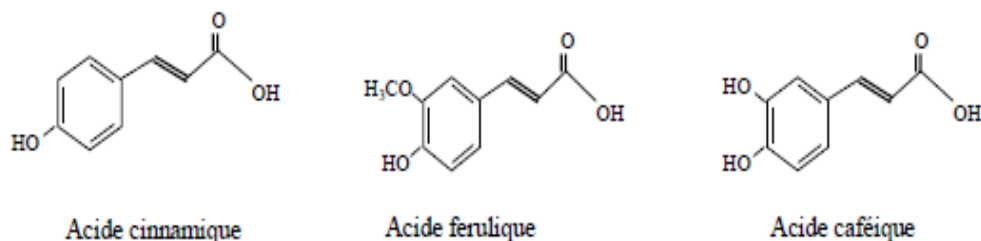


Figure 1.2 : Exemple de quelques acides phénols de la série cinnamique [8] [9]

### 2.1.2. Les flavonoïdes

Ils ont un squelette de base formé par deux cycles en C6 (A et B) reliés entre eux par une chaîne en C3 qui peut évoluer en un hétérocycle (cycle C) (Figure 3). Ils donnent des couleurs allant du jaune clair au jaune or. Selon les détails structuraux les flavonoïdes se divisent en 6 groupes : flavones, flavonols, flavonones, isoflavones, chalcones, aurones.

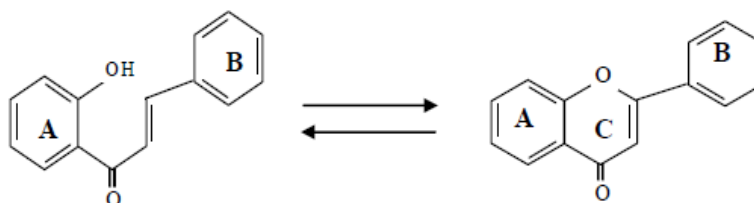


Figure 1.3 : Structure de base d'un flavonoïde [10]

### 2.1.3. Les anthocyanes

Ils donnent des couleurs très variées : bleu, rouge, mauve, rose ou rouge. Ces molécules ont, comme les flavonoïdes, un squelette de base en C15 formé de deux cycles A et B, et d'un hétérocycle (cycle C) ; mais leur caractéristique principale est que ce dernier est chargé positivement. Cette charge est due à leur structure de base commune : le cation flavylium ou 2-phényl-1-benzopyrylium (Figure 1.4) [10]

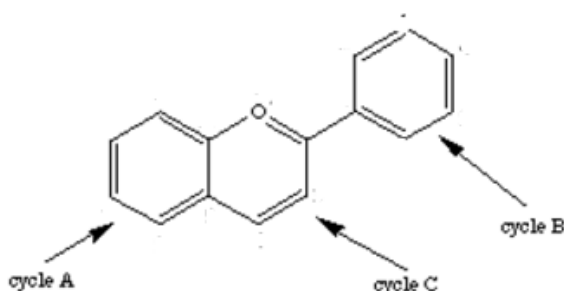


Figure 1.4 : Structure du cation flavylium ou 2-phényl-1-benzopyrylium. [10]

### 2.1.4 Les flavanes :

Les flavanes sont sous forme de monomères (ex : la catéchine) ou sous forme de polymères (dimères, trimères...de catéchine). Ils existent sous forme de plusieurs stéréoisomères provenant de deux carbones asymétriques : C2 et C3 (Figure 5). [11]

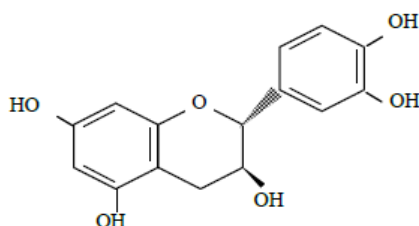


Figure 1.5 : Structure de la (+) - catéchine [11]

### **2.1.5. Les tannins :**

Les tannins sont des macromolécules qui se divisent selon leur structure en deux groupes principaux :

a- Les tannins hydrolysables : sont des esters d'acide gallique qui se lient aux molécules de glucose. Plus précisément, un glucose se lie à plusieurs molécules d'acide gallique. [7]

b- Tannins condensés ou tannins catechiques ou proanthocyanidols : qui se différencient fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons C-C. [12]

### **2.2 Intérêts thérapeutiques des polyphénols :**

La principale caractéristique des polyphénols est qu'ils sont des agents antioxydants très puissants [13] [14] [15]. Ces actions thérapeutiques sont attribuées à leurs effets antioxydants qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes. [16]

Les composés phénoliques sont largement utilisés dans les domaines thérapeutiques et pharmaceutiques. Parmi les nombreux intérêts qu'offrent les polyphénols à la santé, nous pouvons citer les suivants :

- ✓ Activité anticancéreuse : Les substances polyphénoliques sont capables d'activer les mécanismes naturels de la défense anticancéreuse. [17] [18]
- ✓ Prévention contre les maladies cardiovasculaires : En effet, la consommation des polyphénols favorise la protection contre les altérations cardiaques et vasculaires. [19]
- ✓ Prévention contre les maladies hormono-dépendantes : par exemple Certains polyphénols et plus particulièrement les isoflavones du soja ont une affinité remarquable pour les récepteurs d'oestrogènes et sont qualifiés pour cela de phytoestrogènes. Lignanes en particulier dans la prévention de cancers hormono-dépendants, des études ont montré une relation entre la présence de lignanes dans la ration alimentaire et le taux d'incidence de certains cancers. [20]
- ✓ Action gastro-protectrice des polyphénols : dont principalement les flavonoïdes et les acides phénoliques sont capables de réduire la surface des lésions gastriques produites par l'andométhacine chez les rats [21] [22]

### 3. Les Flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et d'autres parties de la plante. [23]

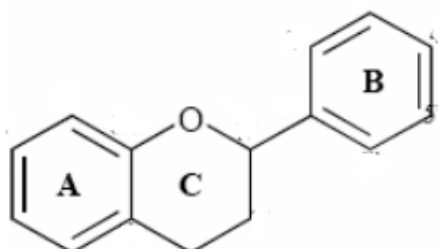


Figure 1.6: Structure générale des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés qui ont en commun la structure du diphenylpropane (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) (Figure 1.6); les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C [24]

#### 3.1. Classification des flavonoïdes

En basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines ; flavonoles ; isoflavonoles ; flavones ; isoflavones ; flavanes ; isoflavanes ; flavanols ; isoflavanols ; flavanones ; isoflavanones ; auronnes [25]

Les

classes des flavonoïdes sont résumées dans la figure

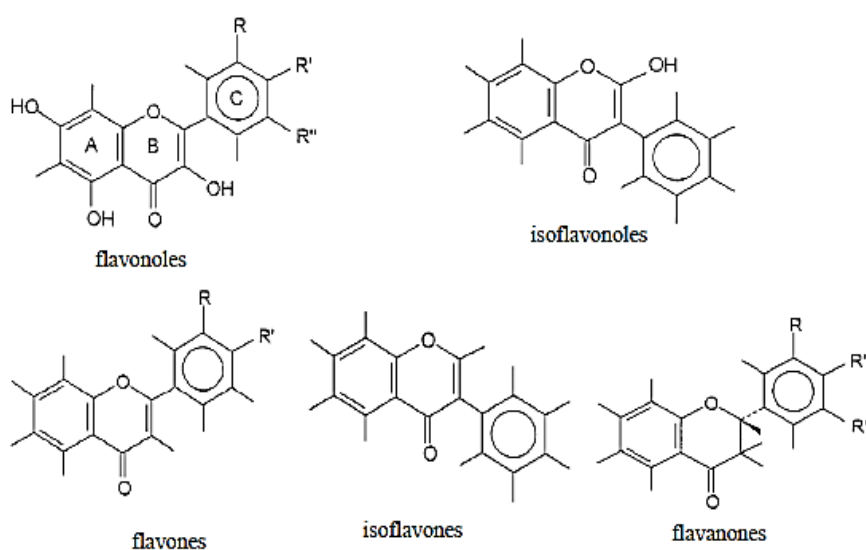


Figure 1.7. Structures des squelettes de base des flavonoïdes [26]



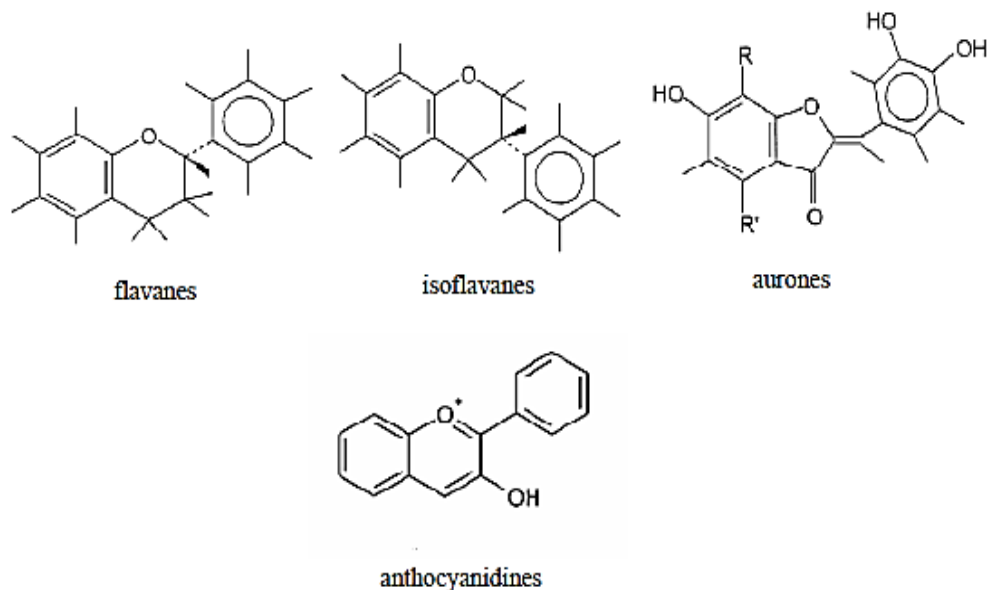


Figure 1.8. Structures des squelettes de base des flavonoïdes [26]

### **3.2. Intérêts thérapeutiques des flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont connus par ses intérêts thérapeutiques, parmi des nombreuses études qui ont montré leurs activités bénéfiques sur la santé, quelques études sont résumées

- ✓ **Activité contre le cancer** ; Parmi les flavonoïdes les plus actifs sur les cellules tumorales, la quercétine et la catéchine qui sont très abondantes dans les aliments. La quercétine prévient la cancérogenèse, surtout le cancer de la peau et du colon. La catéchine est un inhibiteur de certaines réactions, a été démontrée comme étant plus active que la vitamine E sur les radicaux libres [27]
- ✓ **Activité antimicrobienne** :
  - a) **Activité antibactérienne** ; les flavonoïdes sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries : *Staphylococcus aureus*[28] , *Escherichia coli*[29], *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Heliotropium sinuatum*, *Proteus mirabilis*..et [30]
  - b) **Activité antifongique** : les flavonoïdes ont une activité antifongique très puissante. L'une des études les plus importantes sur cette activité était celle de Ortuno et ses collaborateurs[31], qui ont démontré l'activité des flavanones glycosides et des polyméthoxyflavones extraites de *Cirtus parasidi* et de *Cirtus sinensis* sur *Penicillium digitatum*
  - c) **Activité antivirale** ; principalement contre le rétrovirus HIV responsable du symptôme d'immunodéficience acquise (SIDA), le virus d'influenza, le virus de l'herpès (HV), l'adénovirus (ADV) et le virus de la grippe A [32] [33].

- ✓ **Activité contre la cardio-toxicité, la peroxydation lipidique et l'atteinte hématologique** : En effet, ils apportent une protection contre les radicaux libres [34], et ont une capacité à capturer et désactiver les radicaux libres. [35]
- ✓ **Activité cardio-protectrice** ; Les flavonoïdes sont réputés pour leur effet protecteur sur la santé cardiovasculaire en modifiant plusieurs processus pathologiques qui interviennent dans l'apparition de ces maladies.[36]
- ✓ **Activité contre l'obésité** : Certains flavonoïdes sont supposés apporter un intérêt dans le métabolisme lipidique en diminuant la lipidémie.[37]
- ✓ **Activité contre les inflammations** ; Les mastocytes sont des cellules qui participent aux réactions allergiques et à l'inflammation en sécrétant des médiateurs inflammatoires comme l'histamine et des cytokines pro-inflammatoires. L'action pharmacologique des flavonoïdes suggère qu'ils pourraient présenter un intérêt dans le traitement des désordres allergiques en sous-régulant ces mastocytes. . [38]
- ✓ **La protection des neurones** : Ce rôle a principalement été mis en évidence dans le cas de la maladie de Parkinson. Des chercheurs ont évalué l'effet de la lutéoline, un flavonoïde possédant diverses activités et notamment des effets anti-inflammatoires sur la diminution du captage de dopamine, les résultats ont démontré que la lutéoline était capables de protéger les neurones des dommages ainsi causés [39]
- ✓ **La protection oculaire** ; Certains flavonoïdes, comme la fisétine, ont été examinés et ont montré leur effet protecteur contre le stress oxydant induit par les rayons UV dans des cellules épithéliales de la lentille. [40]

## CHAPITRE 02 : PRESENTATION DE LA PLANTE ETUDIEE RETAMA RAETAM

### Introduction :

Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses [2]. On appelle plante médicinale toutes plantes renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies [41]

Aujourd'hui, les traitements à base des plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît, les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus. [42]

### 1. Les Rétames :

Les rétames sont des Légumineuses arbustives, occupant les zones arides, semi-arides et côtières, leur nom dérive du nom biblique(ROTEM) qui fut changé par les arabes en (R'tem) ou (retam) [43].

En Algérie Le genre *Rétama* compte trois espèces :[44]

- ✓ *Rétama monosperma.*
- ✓ *Rétama sphaerocarpa.*
- ✓ *Rétama raetam.*

#### 1.1. L'espèce *Rétama raetam* :

Nom scientifique : *Retama raetam* (Forssk.) Webb

Autres noms :

Arabe: Rtem. [45] ;

Berbère: Tillugwât, îllugwât, allugû, talggût. [46] ;

Français: Rétam. [45] ;

Anglais: White Weeping Broom

## **1.2. Distribution géographique:**

Les rétames sont caractérisés par une large distribution géographique, originaires du nord-ouest Africain et probablement des îles Canaries [43]. En Algérie, *Rétama raetam* est localisé dans le sud oranais, sud de Djelfa, Ain Safra, Touggourt, au centre de la Kabylie, à l'est de Biskra [47] également à Ouargla [48], c'est une plante commune des écosystèmes arides qui entourent la méditerranée, cette plante utilise comme stratégie d'acclimation une dormance partielle pour résister aux longues périodes de sécheresse [49].

## **1.3. Description des rétames :**

### **1.3.1. Morphologie : Description botanique**

L'espèce *Rétama Raetam* est un arbuste saharien de 1 à 3,5 m de hauteur à rameaux veloutés, fleurs blanches de 8-10 mm, étendard égalant la carène ou plus long, gousse non dilatée sur sa nature ventrale contenant une petite graine [45]

La floraison est longue et précoce de la fin d'hiver à début printemps, selon le climat, elle peut s'étendre jusqu'au mois de mai [50]



Figure 2.1: *Rétama raetam* (Forssk.) Webb et Berth

## **1.4. Utilisation : Les intérêts :**

### **1.4.1. Intérêts écologique :**

Rétama raetam s'adapte bien aux conditions les plus extrêmes, elle développe un mécanisme moléculaire qui lui permet de résister aux changements climatiques (manque de nutriments et stress hydrique) et cela en entrant dans une phase de dormance partielle, en supprimant l'expression de certains gènes, grâce à une enzyme de défense qui est l'ascorbate peroxydase(APx). [49] et grâce à son potentiel germinatif élevé, sa tolérance au stress hydrique et son mode de ramification radicaire, peut être considéré comme une espèce pionnière apte à coloniser les cordons dunaires, son utilisation dans les opérations de revégétation de ces milieux fragiles est recommandable [51].

### **1.4.2. Intérêt pharmacologique**

En médecine traditionnelle, Rétama raetam est utilisé dans le traitement de plusieurs maladies. La partie aérienne est utilisée, en infusion, en poudre ou en compresse, pour le traitement du rhumatisme, les blessures et les piqûres de scorpion, elle est utilisée aussi contre les morsures de serpent [52].

En outre, des études expérimentales ont révélé que Retama raetam possède une activité antioxydante [53], antimicrobienne et cytotoxique. Elle possède aussi un effet diurétique, antihypertenseur, et une activité hypoglycémiant [42][54][55][56]. en effet l'administration orale d'une dose de 20mg/kg de l'extrait aqueux de Rétama raetam, réduisait de façon significative le taux de glucose dans le sang des rats normaux, ainsi que des rats diabétiques dont le diabète a été induit par streptozotocine(STZ).[54]

publication	Résultat de travail
(Edziri et al 2012)[119]	Isolation de deux flavonoïdes licoflavone C et derrone qui ont été testé et montré leurs activité antimicrobienne intéressante.
(Djeddi et al,2013) [112]	Isolation des isoflavonides à partir de l'extrait methanolique qui ont montrés leurs activité analgésique in vivo, comme le 3'-O-methylorobol (86.9%) qui est presque égale à l'aspirine.
(Benaissa et al,2016) [106]	Les différents extraits de rétama sphaerocarpa ont été étudiés et ont montré une forte activité antioxydante, en corrélation avec leurs richesse en polyphénols et en flavonoïdes en particulier.
(Hadj-moussa,2012) [105]	l'effet inhibiteur des extraits de Rétama raetam sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase est fortement lié à sa richesse en flavonoïdes et en polyphénols.

**Tableau 2.1 : Quelques Travaux Antérieurs**

## **2. Présentation de la plante cytisis triflorus :**

### **2.1.L'espece cytisis triflorus**

- ✓ Nom latin : *Cytisus triflorus* Lam.
- ✓ Nom français: Cytise a trois fleurs
- ✓ Nom arabe : Chadjeret en nahal
- ✓ Nom local : L'hérit
- ✓ La drogue : Partie aérienne



Figure 2.2 : *Cytisus triflorus*

### **2.2. Distribution géographique :**

Le genre de *Cytisus* de la famille fabacée contient plus de 70 espèces confinés dans les régions caractérisés par un climat doux, de sud et centre d'Europe, nord d'Afrique et le ouest d'Asie [57]. *Cytisus triflorus*, l'hérit ou localement appelé « illougui » est l'espèce parmi les espèces qui sont largement distribués à travers le nord d'Algérie.[58]

### **2.3.Description botanique :**

C'est un arbuste vivace de hauteur de 1-2 m avec branches poilus. Les feuilles sont arrangées en trois, couvertes avec des poils denses et soyeux, le médial est presque deux fois plus long que les latéraux, s'assombrit lorsqu'elle est séchée. 1-3 fleurs jaunes localisés avec les feuilles supérieures. Le fruit est une gousse poilue aplati. [58]

### **2.4.Intérêts thérapeutiques et l'utilisation traditionnelle de Cytisus triflorus**

Plusieurs études ont cités l'utilisation de ce genre pour ses propriétés médicale hypotenseur, antidiabétique, diurétique [59,60], et des études pharmacologique ont confirmé quelque informations enthomédical. [61,58]

Les études bibliographique ont montrés aucune utilisation traditionnel de cette plante en particulier dans la région méditerranéenne, cependant *Cytisus triflorus* est connu dans le nord d'Algérie par ces propriétés thérapeutiques. Elle est utilisé pour le traitement des douleurs abdominal, le soin des blessures et pour ses propriétés hémostatique, antifongique et hypotenseur. Les feuilles de *Cytisus triflorus* sont utilisées comme « henna » pour traiter et teindre les cheveux. [62]

## CHAPITRE 03 : L'ACTIVITE ANTIOXIDANTE

Les composés phénoliques sont très utilisées dans la médecine traditionnelle et moderne pour leurs activités antioxydantes) [63]. Vu leurs propriétés redox les plus élevées, les polyphénols agissent comme des agents réducteurs, donneur d'hydrogène en piégeant les radicaux libres et en chélatant les ions [64]

### **1.1. Les radicaux libres :**

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante « libre » en contenant un ou plusieurs électrons célibataires sur un atome d'oxygène ou d'azote. Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé [65], Un stress oxydatif survient lorsque l'équilibre est rompu en faveur des radicaux libres

Toutefois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydant/antioxydant [66].

### **1.2. Différents types des radicaux libres :**

#### **1.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)**

Parmi toutes les espèces réactives oxygénées (ERO), on distingue :

- a) les radicaux primaires à savoir : l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ), le radical hydroxyle ( $\bullet OH$ ), le monoxyde d'azote ( $NO\bullet$ ), le radical peroxyde ( $ROO\bullet$ ) et le radical alkoxyde ( $RO\bullet$ ).
- b) radicaux secondaires telles que l'oxygène singulet  $^1O_2$ , le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le nitroperoxyde ( $ONOOH$ ), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule.[67]

#### **1.2.2. Les espèces réactives azotées (ERN)**

Il en existe deux genres ;

- ✓ Les espèces radicalaires azotées tels que le monoxyde d'azote ( $NO\bullet$ ) qui joue un rôle protecteur vis-à-vis du stress oxydant en limitant la lipoperoxydation.

- ✓ Les espèces azotées non radicalaires ; ils se caractérisent par leur grande faculté de diffusion dans les membranes cellulaires. Il s'agit du trioxyde d'azote ( $N_2O_3$ ) et leperoxynitrite ( $ONOO^-$ ), moins réactif que son précurseur azoté, mais responsable de l'oxydation de nombreuses biomolécules (protéines, lipides et acides nucléiques) [68]

## **2. Les conséquences des radicaux libres et le stress oxydant**

Lorsqu'il y a un déséquilibre entre la balance des radicaux libres et ERN et les systèmes de défense, comme conséquence l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (ADN, protéines, lipides) en lien avec l'apparition de nombreuses maladies graves (cancer, artériosclérose, arthrite, maladies neuro-dégénératives) : c'est le stress oxydatif. [69,70]

## **3. L'antioxydant**

Un antioxydant est toute molécule endogène ou exogène présente en faible concentration qui est capable de prévenir, de retarder et de réduire l'ampleur de la destruction oxydante des biomolécules.

## **4. Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes *in vitro* :**

Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer l'activité antioxydante des aliments et les systèmes biologiques [71], Elles peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes : soit par le transfert d'atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un simple électron [72]

Les techniques du premier groupe sont employées pour évaluer la peroxydation lipidique en utilisant un substrat lipidique ou lipoprotéique. La quantification de cette propriété est exprimée par la mesure du degré d'inhibition de l'oxydation [73]

Alors, les méthodes du deuxième groupe sont celles qui interviennent dans la mesure de l'habilité du piégeage des radicaux libres. Elles comportent le balayage du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), de l'acide hypochloreux ( $HOCl$ ), de l'hydroxyle ( $\bullet OH$ ), des anions superoxyde ( $O\bullet^-_2$ ), du peroxyde ( $ROO\bullet$ ) et de l'oxyde nitrique ( $NO\bullet$ ) [72]

Parmi ces techniques, nous citons :

- ✓ la méthode d'ORAC (Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène) [74]
- ✓ la méthode d'ABTS (2,2-azinobis (3-éthyle-benzothiazoline-6-sulphonate) ou TEAC (Capacité antioxydante équivalente de Trolox) [75] ;
- ✓ la méthode FRAP (Capacités réductrices ferriques d'antioxydants) [76];



- ✓ la méthode du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) [77] ;
- ✓ la méthode de DMPD (Balayage du radical cation N, N- diméthyl-*p*-phénylènediamine) [78] ;
- ✓ la méthode TOSC (Capacité du piégeage des oxy-radicaux totaux) [79] ;
- ✓ la méthode TRAP (Paramètre du piégeage du radical total) [80] ;
- ✓ la méthode photochimiluminescence (PCL) [81] ;
- ✓ la méthode d'hémolyse [82]

## CHAPITRE 4 : L'ANTIBIORESISTANCE

### **Introduction**

L'émergence rapide de l'antibiorésistance est un problème majeure pour la santé publique [2] les données de surveillance montre que qu'il y a une augmentation des infections causée par des bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques dans plusieurs pays . La multi-résistance bactérienne aux antibiotiques est l'image la plus grave de la résistance car elle réduit notablement les possibilités thérapeutiques. [84]

### **1. Définition**

La résistance bactérienne est prise dans sa définition clinique, synonyme d'échec thérapeutique, c'est-à-dire, la capacité de la bactérie à se multiplier en présence d'une concentration d'antibiotique égale ou supérieur à celle que l'on peut obtenir in vivo. Pour le bactériologiste, une bactérie sera résistante par rapport à une valeur de référence qui est la concentration minimale inhibitrice de l'antibiotique vis-à-vis du germe. [85 ]

## **2. Impact de l'antibiorésistance**

Lorsqu'une infection ne peut plus être traitée par un antibiotique de première intention, on doit recourir à des médicaments plus coûteux. De plus, la prolongation de la maladie et du traitement, souvent dans le cadre d'une hospitalisation, accroît les dépenses de santé, ainsi que la charge financière pesant sur les familles et la société. La résistance aux antibiotiques compromet les acquis de la médecine moderne.

En l'absence d'antibiotiques efficaces pour prévenir et traiter les infections, les greffes d'organes, la chimiothérapie et certaines interventions chirurgicales telles que la césarienne deviendront beaucoup plus dangereuses [2].

## **3. Types de résistance bactérienne**

### **3.1. La résistance naturelle**

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. L'expression d'un caractère inné, partagé par l'ensemble de la communauté bactérienne, rend inappropriée l'utilisation de certains antibiotiques.

Des particularités structurales de la paroi cellulaire, empêchant les antibiotiques d'accéder à leur cible, ou l'absence de cible sont autant de facteurs, qui conditionnent la résistance naturelle [86].

### **3.2. La résistance acquise**

La résistance acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes. Cette résistance peut être acquise par mutation ou par transfert de gènes par transduction, conjugaison ou transformation. [87]

### **3.3. Mécanismes de la résistance**

Les modes de résistance connus actuellement qui résultent de la pression de sélection exercée par les ATB sont au nombre de quatre. Une même bactérie peut présenter plusieurs de ces mécanismes de résistance [88].

Ces mécanismes sont résumés dans le tableau 4.1

Tableau 4.1 : les mécanismes de la résistance des bactéries.

Mécanismes de la résistance		Détails
<b>1. L'inactivation enzymatique</b>		La bactérie acquiert la capacité d'inactiver l'action des ATB par la sécrétion d'enzymes avant même qu'ils n'aient pénétrés au sein du microorganisme[89] .Les classes d'antibiotiques visées par ces enzymes sont les $\beta$ - lactamines, les macrolides-lincosamimides-streptogramines (MLS), les aminosides et les phénicolés.
<b>3. Le mécanisme d'Efflux actif</b>		Ce sont des mécanismes de transport membranaire universellement répandus chez des organismes vivants. Ils ont un rôle clé dans la physiologie bactérienne : préserver l'équilibre physico-chimique du milieu intracellulaire en s'opposant à l'accumulation de substances naturelles ou synthétiques toxiques transport de substances nutritives et export de substances toxiques.
<b>4. Modification de la cible</b>	<b>Modification d'affinité de la cible</b>	Ce mécanisme est en relation avec une modification d'affinité d'une ou plusieurs cibles de type PLP ou PBP (Penicillin Binding Protein) comme chez <i>Streptococcus pneumoniae</i> . La résistance des entérocoques aux pénicillines telle l'ampicilline peut être en relation avec une hyperproduction de PLP d'affinité médiocre. Il est principalement présent chez les bactéries Gram négatif [90]
	<b>Substitution de cible</b>	L'exemple majeur est la résistance intrinsèque ou méticillino-résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> qui est liée d'une part, à la présence d'une nouvelle PLP de faible affinité, dénommée PLP2a et d'autre part à son hyperproduction. La conséquence clinique est importante, car il y aura résistance croisée entre $\beta$ - lactamines.
	<b>Altération des précurseurs de la paroi bactérienne</b>	Des substitutions d'acides aminés dans la protéine S12 de la sous-unité 30 S du ribosome provoquent une résistance à la streptomycine. Ces mutations ont été caractérisées chez <i>Escherichia coli</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . [91]
<b>5. Diminution de la perméabilité de la membrane</b>		Pour agir, les antibiotiques doivent pénétrer dans la cellule bactérienne. Beaucoup d'antibiotiques utilisent les systèmes de transport propres à la bactérie pour ses échanges avec l'extérieur [88]. Pour résister, la bactérie contrecarre cette entrée de toxiques en diminuant la perméabilité de sa membrane. [92]

# ***PARTIE EXPERIMENTALE***

Notre démarche expérimentale est résumée à travers le diagramme comme suit :

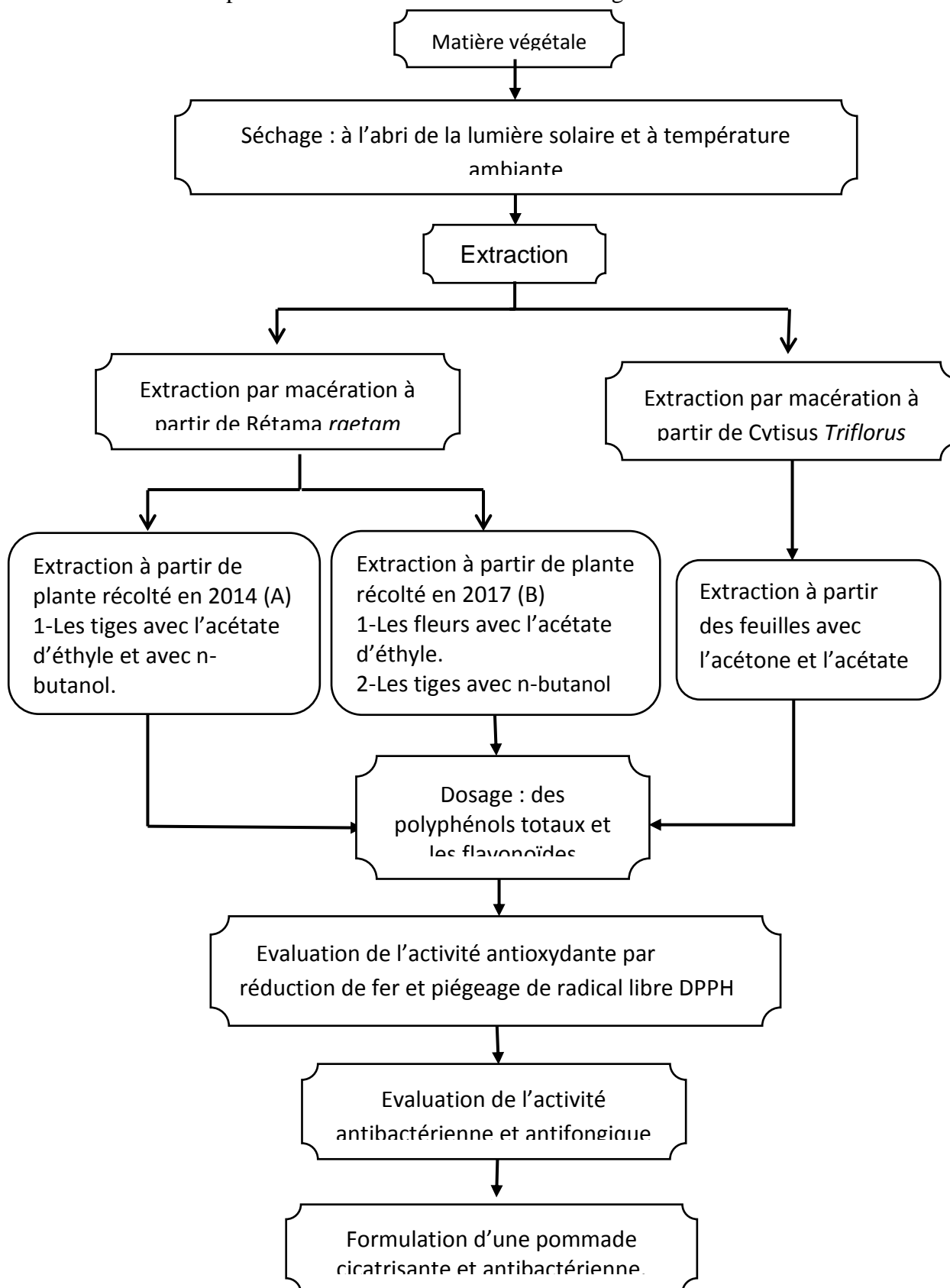


Figure 1 : diagramme de la démarche expérimentale

## CHAPITRE 01 MATIERE VEGETALE ET MICROBIENNE

### 1- Matériel végétal :

#### 1.1. *Rétama raetam* :

Nous avons ramassé les parties aériennes de *Retama raetam* de la région de Mostaganem à l'ouest Algérienne en printemps 2014, La plante était séchée pendant plusieurs semaines à une température ambiante et à l'abri de la lumière, puis elle était conservée dans un sac en polypropylène tissé, afin d'empêcher l'humidité et la moisissure, et de préserver au maximum l'intégrité des molécules. Nous avons rincé les parties aérienne avec l'eau avant de les sécher pendant quelques jours à une température ambiante et à l'abri de la lumière.



Figure 1.1 : les tiges séchés de *Rétama raetam*



Figure 1.2 : les fleurs séchés de *Rétama raetam*.

La deuxième plante était aussi récoltée de la région de Mostaganem en printemps 2017, était rincé avec l'eau puis séchée pendant plusieurs semaines à une température ambiante et à l'abri de la lumière.

#### 1.2. *Cytisus triflorus* :

La plante *Cytisus* a été récoltée de région de SIDI ELKEBER, wilaya de Blida en printemps 2017. La plante est nettoyée avec l'eau puis séchée à l'aire libre dans le laboratoire pendant une semaine.

## **2. Matériel microbien :**

Le matériel microbien comprend les bactéries pathogènes et une levure et des champignons phyto-pathogènes, provenant du laboratoire d'hygiène Feroudja, Blida.

Les bactéries comprennent deux à Gram positif qui sont : *Bacillus sp.*, *Staphylococcus aureus*, et trois à Gram négatif : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*..

La levure utilisé est *Candida albicans* et les champignons sont *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus brasiliensis*, pour l'évaluation de l'activité antifongique.

## **3. Milieux de culture**

Dans le but de l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits aqueux, nous avons utilisé deux milieux de culture : Mueller-Hinton (MH) et Sabouraud.

## **4. Contrôles positif**

Pour valoriser l'activité antibactérienne on utilise l'antibiotique gentamex pour faire le contrôle positif. [M.B.0.12]

Pour valoriser l'activité antifongique on utilise le flococonazol comme un contrôle positif

## CHAPITRE 02 : EXTRACTION ET DOSAGE

Les extraits utilisés au cours de notre étude sont préparés selon un mode d'extraction qui est la macération pour extraire les composés phénoliques et les flavonoïdes. Les extraits préparés sont: extraits par eau-acétone ou eau-méthanol puis ils sont traités par solvants pour obtenir des fractions préparées avec n-butanol et l'acétate d'éthyle.

### **1- Extraction à partir de *Rétama raetam* ;**

#### **1.1- Préparation de l'extrait des fleurs (EFAc);**

- ❖ 100g des fleurs séchés de la plante (B) sont mise en macération avec un litre de méthanol 80% à une température ambiante de laboratoire pendant 72 h et à l'abri de la lumière.
- ❖ L'extraction est répétée 2 fois pendant 48 h avec 0.5L de méthanol 80%, à chaque fois les fleurs sont filtrées et l'extrait est gardé dans l'obscurité.
- ❖ L'extrait hydro-alcoolique obtenu est séché avec un évaporateur rotatif.
- ❖ 200 ml d'acétate d'éthyle est rajouté à l'extrait récupéré précédemment.
- ❖ L'extrait est séché par évaporateur rotatif.
- ❖ Le produit est récupéré à partir des parois de ballon d'évaporation.

#### **1.2- Préparation des extraits des tiges ;**

##### **A- Fraction d'acétate d'éthyle (ET1Ac);**

- ❖ 2g de poudre des tiges de la plante (A) obtenu par broyage avec mortier, sont macérés avec 50 ml de méthanol 80% pendant une semaine à l'abri de la lumière.
- ❖ Filtration de la solution et récupération de filtrat.
- ❖ Le filtrat est séché par évaporation à l'air libre.
- ❖ Extraction liquide-liquide avec l'éther de pétrole, et récupération d'extrait de la phase aqueuse.
- ❖ 10 ml d'acétate d'éthyle est rajouté à l'extrait récupéré précédemment.
- ❖ L'extrait est séché par évaporateur rotatif.
- ❖ Le produit est récupéré à partir des parois de ballon d'évaporation.



## **B- Fractions de n-butanol ;**

B.1- à partir de la plante (A), (ET1Bn) ;

- ❖ 10g des tiges de plante (A) découpés en petits morceaux, sont mise en macération avec 100 ml de méthanol 80% à température de laboratoire pendant une semaine à l'abri de la lumière.
- ❖ Filtration de la solution et récupération de filtrat.
- ❖ Le filtrat est séché pr évaporation du méthanol à l'air libre.
- ❖ Extraction liquide-liquide avec l'éther de pétrole, et récupération d'extrait de la phase aqueuse.
- ❖ 25 ml de n-butanol est rajouté à l'extrait récupéré précédemment.
- ❖ L'extrait est séché par évaporateur rotatif.
- ❖ Le produit est récupéré à partir des parois de ballon d'évaporation.

B.2- à partir de la plante (B), (ET2Bn) ;

- ❖ Les mêmes étapes précédentes ont été effectués sur les tiges de plante (B), et dans les mêmes conditions de travail.

## **2. Extraction à partir de Cytisus triflorus ;**

### **2.1 Préparation de l'extrait acétonique des feuilles de Cytisus Triflorus**

- ❖ 50 g des feuilles séchés et broyés par mortier sont mise en macération avec 0.5 L d'acétone 80% pendant 72 h à l'abri de la lumière.
- ❖ L'extrait est filtré, la macération est répété 2 fois avec 0.4 L d'acétone 80% pendant 48 h dans les mêmes conditions.
- ❖ Le filtrat est séché par évaporateur rotatif.

### **2.2 Préparation de la fraction d'acétate d'éthyle à partir de l'extrait acetonique ; (ECtAc)**

- ✓ L'extrait acetonique des feuilles de cytisque triflorus est mis en filtration liquide-liquide avec l'éther de pétrole et récupération de la phase aqueuse.
- ✓ 200 ml d'acétate d'éthyle est rajouté à l'extrait récupéré précédemment.
- ✓ L'extrait est séché par évaporateur rotatif.
- ✓ Le produit est récupéré à partir des parois de ballon d'évaporation.



Figure 2.1 : Extraction par macération des feuilles des *Cytisus triflorus*.



figure 2.2: montage d'extraction liquide-liquide.



Figure 2.3 : Evaporation à sec avec le rota-vapeur.

### 3. Protocole d'extraction des polyphénols totaux et les flavonoïdes

Nous avons résumé les étapes d'extractions précédentes dans le schéma suivant :

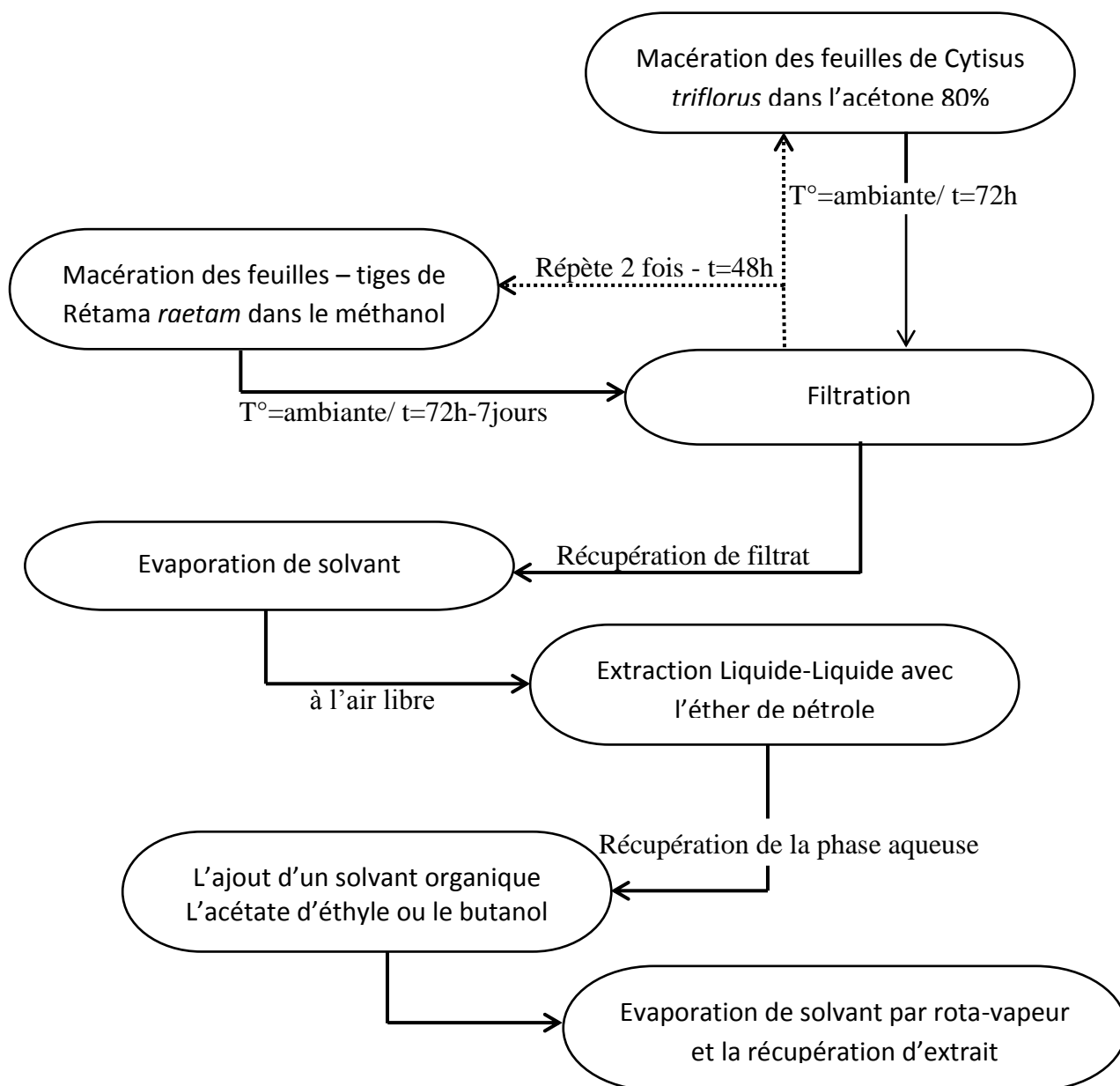


Figure 2.4 : Protocole d'extraction des phénols totaux et les flavonoïdes

#### **4. Calcul du rendement**

Le pourcentage de rendement pour chaque extrait a été calculé par la formule suivante:

$$R(\%) = M / M_0 \times 100. \quad [105]$$

Avec : (%) : Rendement exprimé en %.

**M**: Masse en gramme de l'extrait sec résultant.

**M<sub>0</sub>** : Masse en gramme du matériel végétal à traiter.

#### **5. Dosage des polyphénols totaux :**

La teneur en phénols totaux des extraits des plantes a été déterminée par la méthode de [95] Singleton et Ross (1965) utilisant le réactif de Folin–Ciocalteu.

Un volume de 200 µl pour chaque extrait est introduit dans des tubes à essais, le mélange (1 ml de Folin Ciocalteu dilué 10 fois et 0.8 ml de carbonate de sodium à 7.5 %) est additionné. Les tubes sont agités et conservés durant 30 min. L'absorbance est mesurée à 765 nm en utilisant le spectrophotomètre UV-Visible Une courbe d'étalonnage à différentes concentrations d'acide gallique a été préparée.

Les teneurs en phénols totaux dans les extraits sont exprimées en microgramme (µg) équivalent d'acide gallique par milligramme (mg) du poids de la matière sèche (µg EAG/ mg MS).

#### **6. Dosage des flavonoïdes totaux :**

Le dosage des flavonoïdes est effectué selon la méthode de trichlorure d'aluminium; (AlCl<sub>3</sub>) [96] (Chang et al.) à 1ml de chaque extrait (préparer avec des dilutions convenables dans le méthanol ou l'eau distillée) en ajoutant 1ml de la solution d'AlCl<sub>3</sub> (2% dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance est effectuée à 430nm.

Le calcul de la concentration des flavonoïdes ce fait à l'aide des gammes d'étalonnage établies avec la quercétine et la catéchine (0-40 µg/ml), et elle est exprimé en microgramme (µg) d'équivalent de quercétine ou de catéchine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg).

## CHAPITRE 03 : EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

### Introduction

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante in vitro de nos extraits des composés phénoliques a été réalisée par deux techniques chimiques à savoir : la réduction du fer, le piégeage du radical libre DPPH.

#### 1. Réduction de fer :

Cette méthode est déterminée en utilisant la technique d'Oyaizu (1986) [97].

Les différentes concentrations des extraits dans l'eau distillée (1 ml) sont mélangées avec 2.5 ml de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] (1%). Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 min. Après, 2.5 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné.

Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. A la fin, 2.5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2.5 ml de l'eau distillée et 0.5 ml de FeCl<sub>3</sub>, 6 H<sub>2</sub>O (0.1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm.

L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

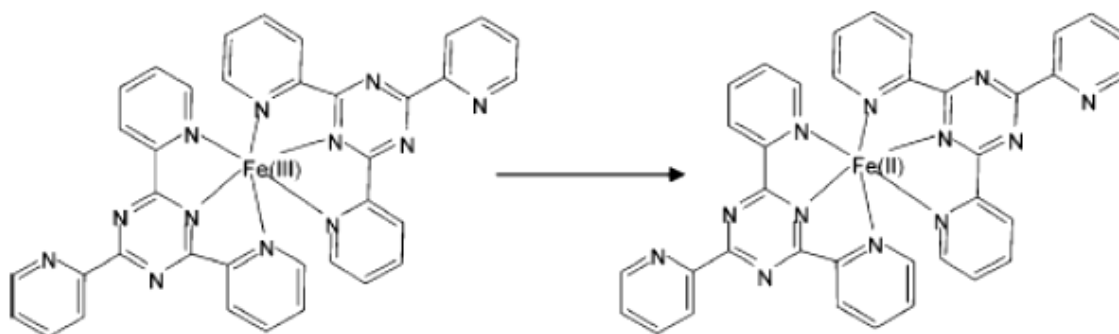


Figure 3.1 : Schéma sur la réaction de test FRAP [98]

## 2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil) :

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH•) (de couleur violette) qui est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène (vire vers le jaune), Ce changement se traduit par une diminution de l'absorbance . La réaction de DPPH est représentée dans la figure suivante :

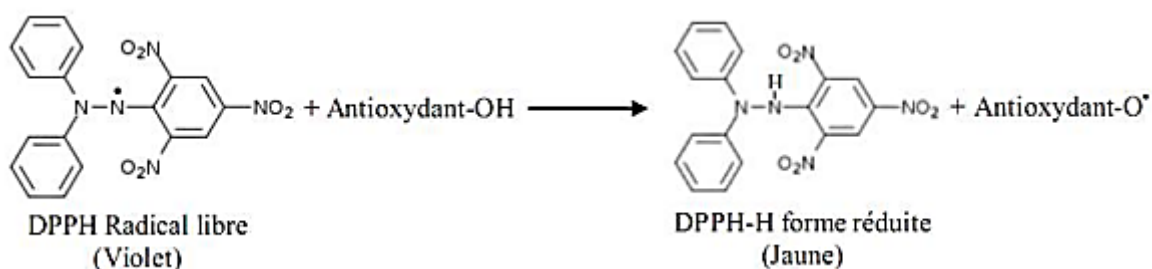


Figure 3.2: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydant. [73].

L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par Sanchez-Moreno et al(1998) [73].

Un volume de 50  $\mu$ l de différentes concentrations de chaque extrait exprimées en g/l est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanolique du DPPH• (0.025 g/l) fraîchement préparée.

L'absorbance est mesuré contre un blanc à 515 nm. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

Le pouvoir antioxydant est estimé selon l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité anti-radicalaire (\%)} = \frac{(A_{\text{échantillon}} - A_{\text{Témoin}})}{A_{\text{Témoin}}} \times 100 \quad [99].$$

Avec  $A_{\text{Témoin}}$  : est l'absorbance de témoin négatif sans extrait.

$A_{\text{échantillon}}$  : est l'absorbance en présence de l'extrait.

L'IC50 (Concentration inhibitrice 50), appelée également EC50 (Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. Les EC50 sont calculés graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés [99].

### CHAPITRE 03 : EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

Pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits aqueux, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose : appelée aromatoگرامme. Le principe de la méthode est tiré à partir du titrage des antibiotiques (BENDJELALI et al., 1986).

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antibactérien en milieu solide dans une boîte de pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antibactérien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante (figure 3.1).

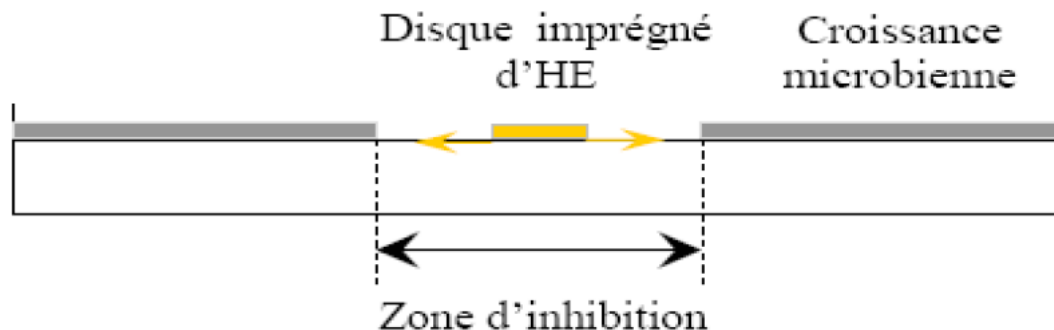


Figure 3.1 : schéma simplifié du principe de la méthode de l'aromatoگرامme

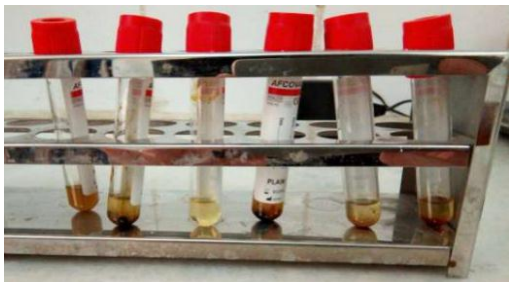
#### Protocole expérimentale :

##### 1. Préparation des extraits

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne nous avons mené nos extraits à des concentrations de (125mg/ml et 225mg/ml) dilué dans l'eau distillée stérile dans des tubes en verre stériles.

## **2. Préparation de l'inoculum bactérien**

A partir d'une culture de 18 h, une suspension bactérienne a été préparée de façon à obtenir une densité équivalente au standard de 0,5 Mac Farland. Cette densité correspond à une concentration de  $10^6 - 10^8$  UFC/ml [101].



**Figure 3.1** : les préparations d'extraits



**Figure 3.2** : les suspensions bactériennes

## **3. Préparation des disques :**

Des disques de papier Wathman n°1 de 9 mm de diamètre stériles (stérilisation à 120°C pendant 15 min par autoclavage), sont chargés de l'extrait naturel à tester, des disques imprégnés de l'eau sont également utilisés qui vont servir de témoin négatif.

## **4. Préparation des milieux de culture :**

La gélose de Muller Hinton stérile et Sabouraud prêtes à l'usage ont été coulées dans des boites de pétrie stériles. L'épaisseur de la gélose est de 2 mm répartie uniformément dans les boites. Ces dernières doivent être séchées 30 min à une température ambiante du laboratoire avant leur emploi.



**Figure 3.4** : boites de pétri contenant le milieu de culture



### 5. **Ensemencement :**

Des boîtes de pétrie stériles préalablement coulées, sontensemencées par étalage à l'aide d'un écouvillon, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries.

A l'aide d'une pince stérile, les disques de papier filtre contenant les produits à tester sont déposés à la surface de la gélose inoculée au préalable.

Les activités antibactérienne et antifongique sont déterminées en termes de diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques après 24 h d'incubation à 37° C pour les bactéries et 120h d'incubation à 28° C pour les champignons.

### 6. **Lecture :**

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle en (mm).

Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des champignons vis-à-vis des concentrations testées de nos extraits.

- Non sensible (-)
- Sensible (+)

## CHAPITRE 4 : FORMULATION D'UNE POMMADE A BASE DES EXTRAITS

### **Introduction :**

Pour le but d'utiliser les extraits des plantes étudiés et bénéficier leurs propriétés thérapeutique, nous allons proposer une forme galénique semi-solide simple, une pommade pour application dermique antibactérienne et cicatrisante.

### **1. la préparation d'une pommade à base des extraits étudiés**

#### **1.3. Les produits utilisés :**

##### **1.1.1 Les extraits utilisés :**

Les principes actifs que nous avons choisis sont les deux extraits suivants :

- L'extrait des fleurs de rétama *raetam*, pour ses propriétés antibactérienne et antifongique.
- L'extrait des feuilles de *Cytissus triflorus* pour ses propriétés antibactérienne, antifongique et cicatrisante.

On a ajouté les principes actifs avec des proportions de 50%-50%, par exemple pour une dose de 1%, on a mélangé 0.5% d'extrait de Rétama *retam* et 0.5% d'extrait de *Cytissus triflorus*.

Les extraits sont sous une forme hygroscopique, et insoluble dans la paraffine liquide et la vaseline

##### **1.1.2. Les excipients utilisés :**

- ✓ Vaseline blanche.

Mélange purifié d'hydrocarbures semi-solides obtenus à partir du pétrole et entièrement ou presque entièrement décoloré, de consistance onctueuse, légèrement fluorescente à la lumière du jour à l'état fondu. [102]

✓ Paraffine liquide.

Nous avons mélangé la vaseline Blanche et la paraffine liquide avec des proportions de 70% et 30% respectivement. Ce mélange joue le rôle d'une base dans la pommade, facilite l'administration des principes actifs et améliore leurs efficacités. [102]

✓ Tween 80.

Commercialisé sous le nom de tween 80, dont son nom chimique est Polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate, un ester de sorbate, un liquide jaune huileux, d'une saveur amère, on l'utilise comme un agent mouillant pour les constituants actives qui sont insoluble dans les bases lipophiles avec des concentrations de 0.1-3%, afin de stabiliser la pommade et obtenir une seule phase homogène. [102]

On a travaillé avec des proportions variables de 0.2%, 0.4%, 0.5% et 1%.

✓ L'éthanol absolu.

L'éthanol absolu est un liquide d'une odeur plutôt agréable, utilisé dans le domaine pharmaceutique comme un solvant, désinfectant et préservative antimicrobien, utilisé aussi comme un neutralisateur de pH (base conjugué). [102]

#### **1.4. Le mode opératoire :**

Les étapes de formulations de notre pommade sont comme suite :

✓ Principes actifs :

- ❖ Dans un bécher, on a dispersé notre extrait dans l'éthanol afin d'obtenir une concentration de 1g d'extrait/ml d'éthanol pour chaque extrait.

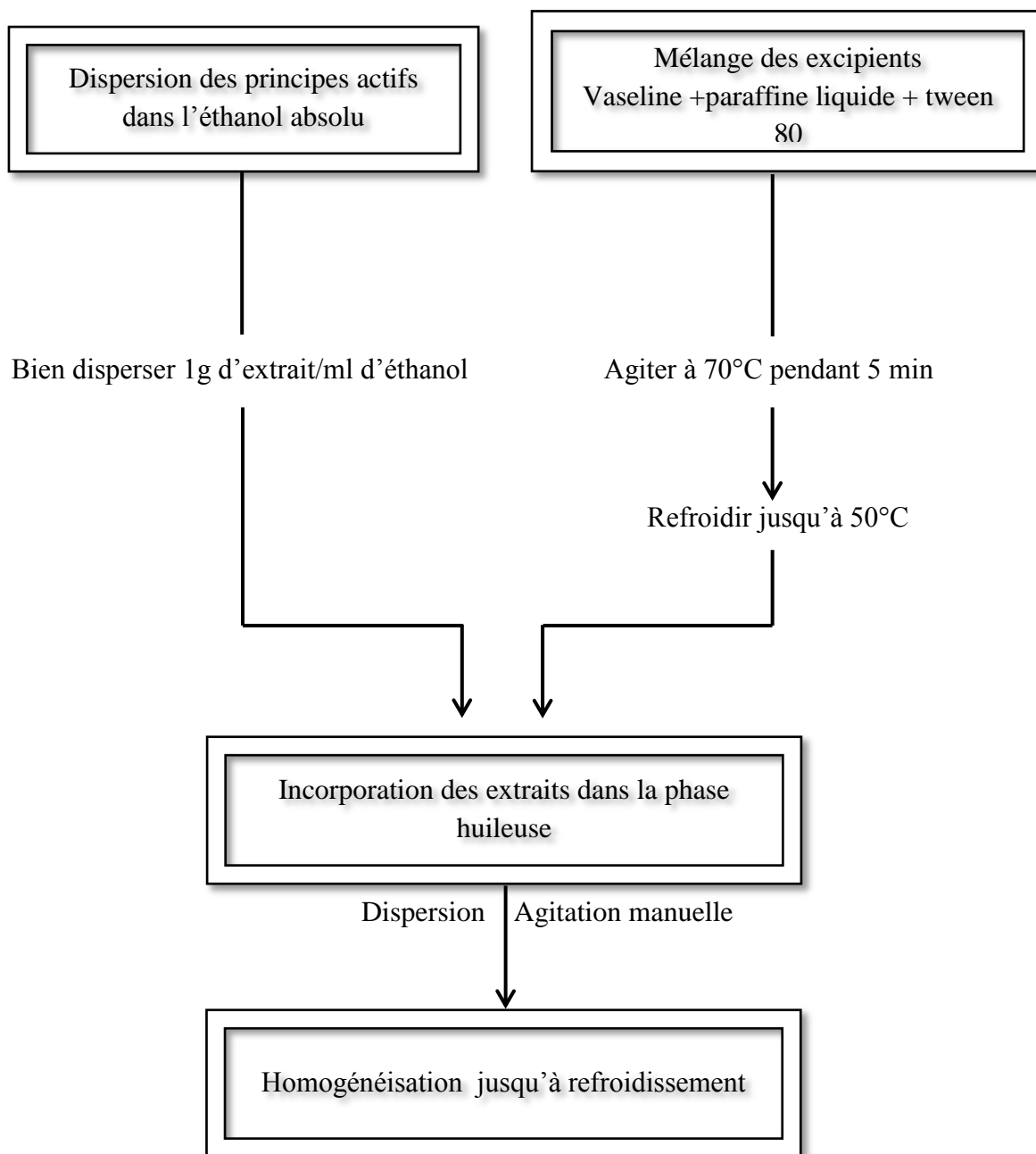
✓ Excipients :

- ❖ Phase huileuse : dans un bécher, on a mélangé la vaseline blanche et la paraffine liquide avec des proportions massiques de 70% et 30%, et la masse de l'émulsifiant Tween 80.
- ❖ Le mélange est fondu et mis sous agitation à 70°C pendant 5 min.
- ❖ On a baissé la température jusqu'à 50° sous une faible agitation.

✓ L'incorporation des principes actifs :

- ❖ Lorsque notre phase aqueuse atteint la température 50°C, une quantité de la dispersion des extraits utilisés, convenable à la dose de la pommade préparée est ajouté à la phase huileuse, avec une agitation manuelle forte suivi par une homogénéisation jusqu'au refroidissement de mélange.

Figure 4.1 : Protocole de la préparation de la pommade



## 2. Caractérisations de la pommade

Il existe des tests à effectuer pour l'évaluation d'une pommade, les tests recommandés sont les suivants :

### 2.1. La stabilité de la pommade.

La stabilité de notre formulation au cours du temps et sous des conditions physiques rigoureuses est déterminée en utilisant une centrifugeuse réglée à une vitesse de 3600 tours/min pendant 10 min.

## **2.2. Le pH de la pommade :**

L'acidité de la pommade formulée est très importante à connaître étant donné que cette dernière est destinée à être appliquée sur la peau du corps et sur la peau du visage. Cette acidité est généralement interprétée par la mesure du pH avec un pH-mètre.

## **2.3. La viscosité :**

L'objectif assigné est de caractériser le comportement rhéologique de la pommade qui est en écoulement variable afin de déterminer le modèle rhéologique auquel elle obéit.

La procédure se résume à faire varier la vitesse de cisaillement ( $\gamma$ ), En utilisant un rhéomètre type plan-plan de marque Anton Paar Modulat Compact Rheometer MCR 302 (figure 4.1), relié à un bain thermostaté et commandé à un logiciel qui permet de traiter les données. . La vitesse de cisaillement a été imposée sur une fourchette de 0,001 à 1000 s<sup>-1</sup> avec une trentaine de prise d'essai. Le tracé de la variation viscosité en fonction de la contrainte de cisaillement est représenté sur un rhéo-gramme.



Figure 4.1: Rhéomètre Anton MCR 302.

## **2.4. L'homogénéité :**

Une certaine quantité de pommade est étalée sur une lame puis recouverte d'une lamelle pour une observation microscopique. Ce test permet d'apprécier l'homogénéité et la distribution des principes actifs dans la pommade et pour cela nous avons utilisé un microscope optique avec un grandissement de  $10 \times 100 = 1000$ .

## ***PARTIE RESULTATS***

## CHAPITRE 01 : RENDEMENTS D'EXTRACTION ET DOSGE

### 1. Rendement de l'extraction :

Les extraits préparés des fleurs et tiges de *Rétama raetam* et les feuilles de *Cytissus triflorus* par macération (EFAc, ET1Ac, ET1Bn, ET2Bn et ECtAc) à différentes caractéristiques physico-chimiques et rendements qui sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 1.1 : Les caractéristiques des extraits obtenus.

Caractéristique	Aspect	Couleur	Solubilité	Rendement %
<b>EFAc</b>	poudre +hygroscopique	Marron foncé	Eau distillé : totale Ethanol : partielle Méthanol : partielle	26,63
<b>ET1Ac</b>	hygroscopique	marron	Eau distillé : totale Ethanol : partielle Méthanol : partielle	23.64
<b>ET1Bn</b>	hygroscopique	marron	Eau distillé : partielle Ethanol : partielle Méthanol-eau: totale	15.2
<b>ET2Bn</b>	hygroscopique	marron	Eau distillé : partielle Ethanol : partielle Méthanol-eau : totale	12
<b>ECtAc</b>	hygroscopique	verte foncé	Eau distillé : totale Ethanol : totale Méthanol : totale	14,76

**E**: extrait, **F**: fleurs de rétama, **T1**: tiges de rétama récolté en 2014 (A), **T2**: tiges de rétama récolté en 2017 (B), **Ct** : feuilles de *Cytissus triflorus*, **Ac**: acétate d'éthyle, **Bn**: n-butanol.

Selon les résultats, on remarque que l'aspect de tous les extraits est hygroscopique et de couleur marron foncé pour les fleurs et les tiges de *Rétama raetam* et de couleur verte foncé pour les feuilles de *Cytissus triflorus*, ce dernier présente une bonne solubilité dans l'eau distillé, l'éthanol et le méthanol et présente un rendement de 14.76%. Les rendements d'acétate (EFAc, ET1Ac) des fleurs et tiges sont proches 26.63% et 23.64% respectivement et présentent les rendements les plus élevés. Les rendements des extraits butanolique (ET1Bn,

ET2Bn) sont proches de 15.2% et 12% respectivement, ainsi on constate une différence légère de 3% en faveur de ET1Bn.

L'extrait des tiges ET1Ac présente un meilleur rendement par rapport à l'ET1Bn et sont respectivement de 23.64% et 15.2%.

## 2. Dosage de polyphénols totaux et flavonoïdes:

Les analyses quantitatives des phénols totaux, des tannins et des flavonoïdes sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage, exprimées successivement en  $\mu\text{g}$  équivalent d'acide gallique et  $\mu\text{g}$  équivalent de catéchine ou quercétine par mg de la matière sèche (Figures 1.1, 1.2 et 1.3)

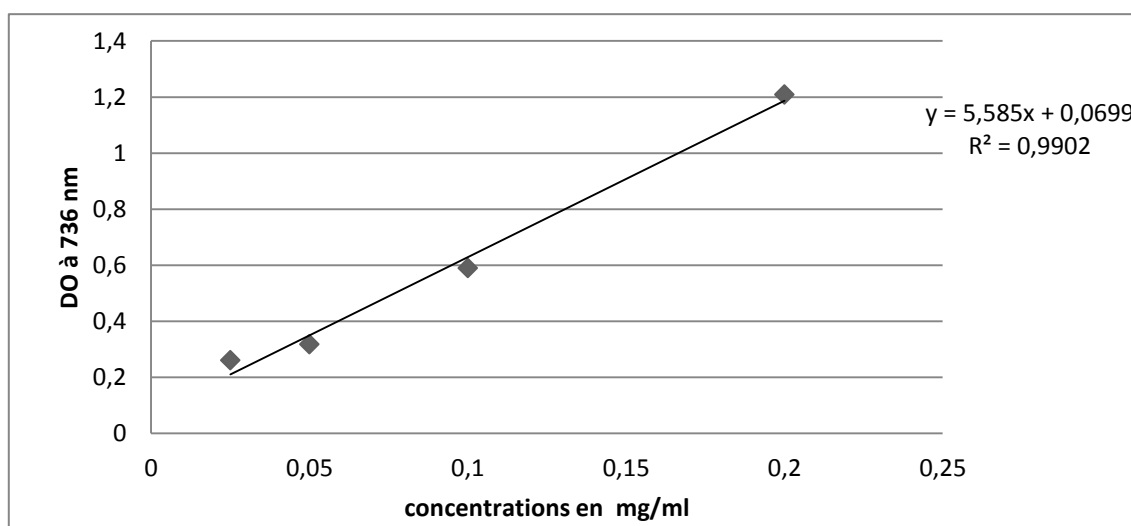


Figure 1.1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

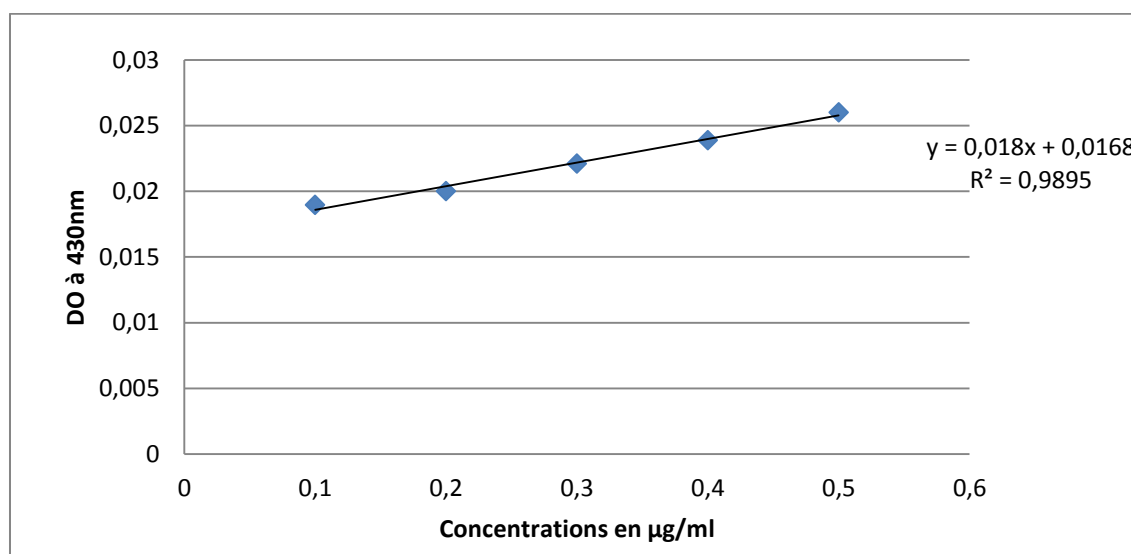


Figure 1.2: Courbe d'étalonnage de Quercétine pour Le dosage des flavonoïdes.



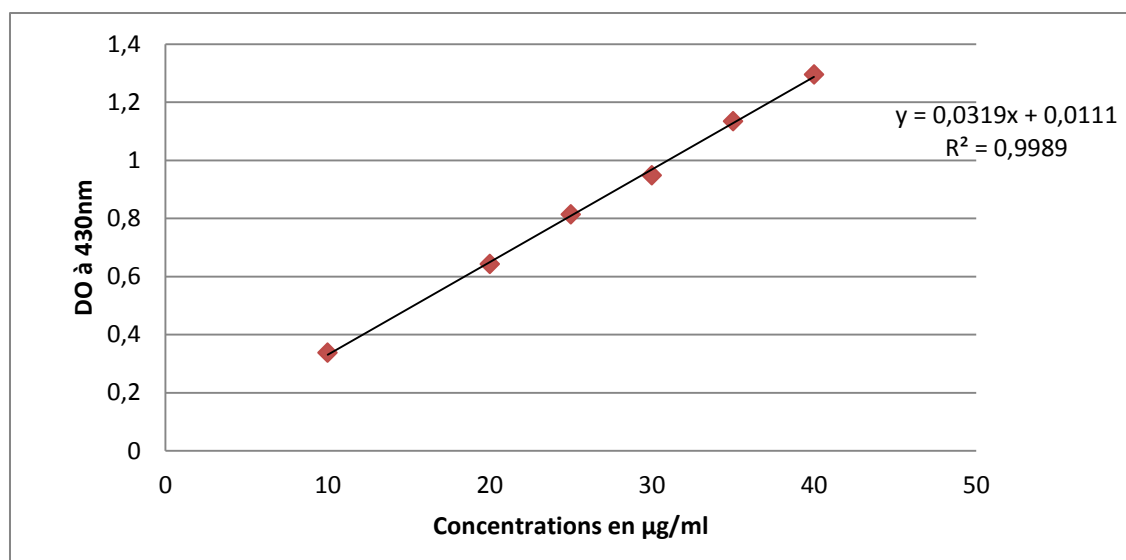


Figure 1.3: Courbe d'étalonnage de la Catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

Le tableau 1.2 résume les résultats obtenus des teneurs en phénols totaux, tannins et flavonoïdes des extraits bruts des plantes.

Tableau 1.2: Teneurs en phénols totaux et flavonoïdes totaux des deux plantes.

Les extraits		Teneurs en Phénols totaux		Teneurs en Flavonoïdes totaux			
		(µg. EqAG /mg E) <sup>a</sup>	(mg. EqAG /100g MV) <sup>b</sup>	(µg. EqC /mg E) <sup>c</sup>	(mg. EqC /100g MV) <sup>d</sup>	(µg. EqQ /mg E) <sup>e</sup>	(mg. EqQ /100g MV) <sup>f</sup>
<b>Rétama raetam</b>	EFAc	168,7	4492,481	85,536	2277,824	23,336	621,438
	ET1Ac	346,64	8194,569	35,140	830,709	10,235	241,955
	ET1Bn	304,08	4622,016	31,652	481,110	21,601	328,335
	ET2Bn	309,96	3719,520	73,600	883,200	18,949	227,388
<b>Cytisus triflorus</b>	ECtAc	687,26	10143,958	221,083	3263,185	34,081	503,035

<sup>a</sup> µg. Eq acide gallique/mg de l'extrait. <sup>b</sup> mg. Eq acide gallique/100g de matière végétale[95]

<sup>c</sup> µg. Eq catéchine/ mg de l'extrait. <sup>d</sup> mg. Eq catéchine / 100g de matière végétale [96].

<sup>e</sup> µg. Eq quercétine/ mg de l'extrait. <sup>f</sup> mg. Eq quercétine/ 100g de matière végétale [96].

**E**: extrait, **F**: fleurs de rétama, **T1**: tiges de rétama récolté en 2014 (A), **T2**: tiges de rétama récolté en 2017 (B), **Ct** : feuilles de *Cytisus triflorus*, **Ac**: acétate d'éthyle, **Bn**: n-butanol.

L'extrait des feuilles de *Cytissus triflorus* possède la teneur la plus riche en phénols totaux de l'ordre de 687,26 µg. Eq AG /mg de l'extrait et en flavonoïdes d'où les teneurs enregistrées égalent à 221,083 µg. Eq Catechine /mg d'extrait et 34,081 µg. Eq Quercetine par mg d'extrait.

Pour *Rétama raetam* les quantités des phénols totaux observées dans les extraits des tiges sont plus importantes par rapport à celle trouvée dans les fleurs. L'extrait ET1Ac possède la teneur en polyphénols la plus élevée avec un taux de 346,64 µg équivalent acide gallique par mg d'extrait, suivis par les extraits butanolique ET2Bn et ET1Bn avec des taux très proches, de 309,96 et 304,08 µg équivalent acide gallique par mg d'extrait respectivement. Alors que la teneur la plus faible est celle des fleurs avec un taux de 168,7 µg équivalent acide gallique par mg d'extrait.

Par contre, les fleurs possèdent les taux en flavonoïdes les plus élevées avec un taux de 85,536 µg. Eq catéchine/ mg de l'extrait et de 23,336 µg. Eq quercetine/ mg de l'extrait.

Les résultats montrent que les extraits des tiges de la plante (A) ET1Ac et ET1Bn possèdent des teneurs en flavonoïdes proches, avec 35,140 et de 31,652 µg. Eq quercetine/ mg de l'extrait respectivement. Tandis que l'extrait des tiges (B) possède une quantité en flavonoïdes plus importante avec 73,600 µg. Eq quercetine/ mg de l'extrait. Pour l'extrait ET1Ac, contient une faible teneur en flavonoïde 10,235 µg .Eq catéchine/mg de l'extrait

Le taux de polyphénols et de flavonoïdes dans 100g de matière végétal est déterminé à partir de multiplication des résultats obtenue 1 mg de chaque extrait par son rendement, 26,63%, 23.64%, 15.2%, 12 % et 14,76 %; EFAc, ET1Ac, ET1Bn, ET2Bn et ECtAc respectivement.

## CHAPITRE 2 : EVALUATION D'ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET ANTI BACTERIENNE

### I. Evaluation d'activité antioxydante

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits des plantes s a été réalisée par Deux techniques chimiques (la réduction de fer, le piégeage du radical libre DPPH).

#### 1. Réduction de fer :

Les résultats de l'activité réductrice des extraits des plantes étudiées sont représentés dans le tableau suivant (tableau 2.1). Nous constatons que la capacité réductrice est proportionnelle à l'augmentation de la concentration.

Extrait	La concentration (mg/ml)	Absorbance à 700 nm	Extrait	La concentration (mg/ml)	Absorbance à 700 nm
<b>EFAc</b>	0,333	0,545	<b>ET1Bn</b>	0,333	0,668
	0,667	0,618		0,667	0,871
	0,833	0,637		0,833	0,984
<b>ET1Ac</b>	0,500	0,557	<b>ET2Bn</b>	0,333	0,641
	0,667	0,586		0,667	0,866
	0,833	0,606		0,833	0,942
<b>ECtAc</b>	0,333	0,654	<b>Acide ascorbique</b>	0,333	0,560
	0,500	0,714		0,500	0,578
	0,667	0,760		0,667	0,606
	0,833	0,886		0,833	0,650

Tableau 2.1 ; Pouvoir réducteur des extraits des plantes étudiées par réduction de fer.

**E:** extrait, **F:** fleurs de rétama, **T1:** tiges de rétama récolté en 2014 (A), **T2:** tiges de rétama récolté en 2017 (B), **Ct :** feuilles de *Cytisus triflorus*, **Ac:** acétate d'éthyle, **Bn:** n-butanol.

Le pouvoir réducteur de les fractions d'acétate d'éthyle des fleurs et tiges s'élèvent de 0.545 et 0.557 la concentration 0.33 mg/ ml à 0.637 et 0.606 à la concentration 0.833 mg/ml

respectivement. Nous avons constaté que c'est la fraction acétate d'éthyle des feuilles de *Cytissus triflorus* qui s'élève de 0.654 à 0.886 d'où elle présente une meilleure activité par rapport aux fractions d'acétates de la rétama.

On remarque que Les fractions butanoliques des tiges ET1Bn et ET2Bn présentent des absorbances proches de 0,668 et 0,641 à 0.33 mg/ml, 0.871 et 0.866 à 0.66 mg/ml, et 0.984 et 0.942 à 0.83 mg/ml respectivement.

### 1.2. Détermination des concentrations IC50

Nous avons déterminé la concentration IC50 pour comparer l'activité réductrice des extraits, les résultats sont résumés dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2 ; les valeurs des IC50 des extraits étudiés.

Extrait		IC50 (mg/ml)	R <sup>2</sup>
Retama <i>raetam</i>	EFAc	0,082	0,98
	ET1Ac	0,102	0,99
	ET1Bn	0,068	0,99
	ET2Bn	0,095	0,99
<i>Cytissus triflorus</i>	ECtAc	<b>0,022</b>	0,95
Contrôle positive	acide ascorbique	<b>0,032</b>	0,96

Nous constatons que les IC50 des fractions de Retama se diffèrent entre 0.068 et 0.102 mg/ml, tandis que l'extrait de *Cytissus triflorus* présente IC50 égale à 0.022 mg/ml, avec des coefficients de détermination proches de 1.

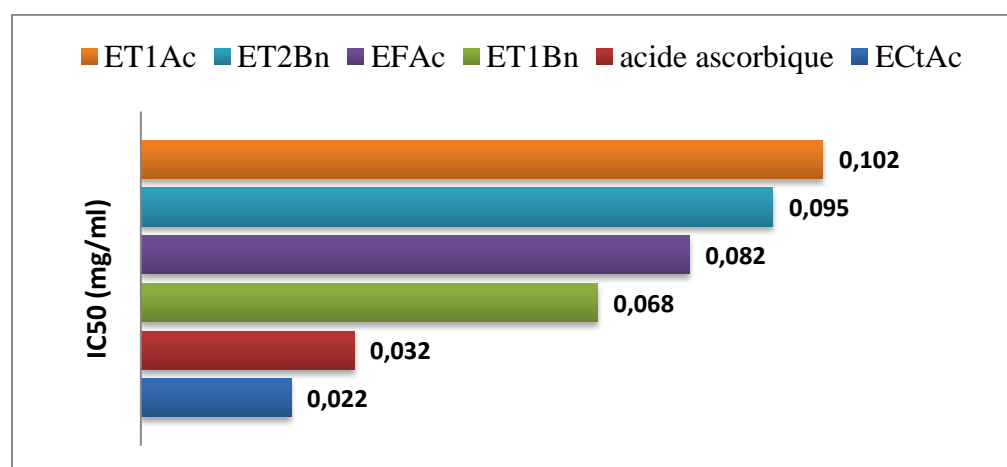


Figure 2.1 : comparaison entre les IC50 des extraits

L'efficacité de réduction de fer est inversement proportionnelle à la valeur IC50, elle est de l'ordre croissant selon le classement suivant :

ECtAc > A. ascorbique > ET1Bn > EFAc > ET2Bn > ET1Ac.

Ces résultats nous ont permis de conclure que la fraction acétate des feuilles de *Cytisus triflorus* présente une meilleure activité antioxydante par rapport à l'acide ascorbique et tous les autres extraits de *Rétama raetam*.

### 1.3 La corrélation entre les teneurs de phénols totaux et flavonoïdes avec les IC50 :

Dans le but d'établir la relation entre la réduction de fer et les teneurs en phénols totaux et les flavonoïdes, les figures ; illustre la variation d'IC50 en fonction des teneurs.

Nous remarquons la présence d'une bonne corrélation entre les teneurs en phénols totaux des plantes et les concentrations IC50 de réduction de fer avec un  $R^2 = 0.6409$  (Figure), ceci représente 64.09 % de l'activité antioxydante des composés phénoliques.

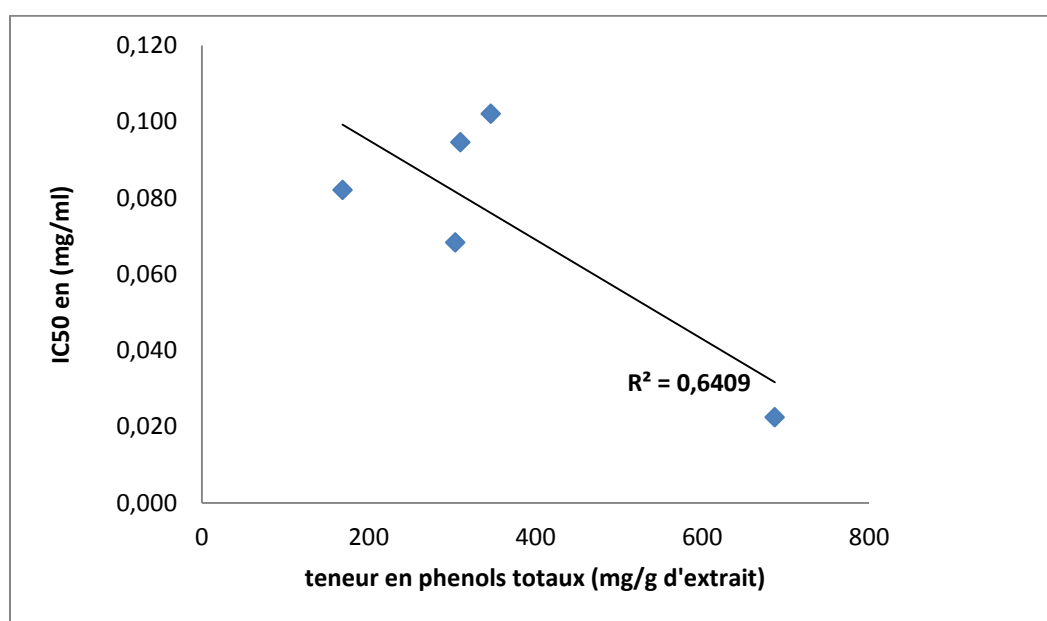


Figure 2.2 : Corrélation entre la réduction de fer exprimée en valeurs IC50 des extraits et les teneurs en phénols totaux.

La corrélation entre les IC50 et les teneurs (flavonoïdes) se représente avec les teneurs équivalents catéchine (en bleu) et quercétine (en rouge). Pour le premier groupe, nous obtenons une bonne corrélation avec  $R^2 = 0.734$  et Le deuxième groupe avec  $R^2 = 0.86$ , ceci nous permet de déduire que la capacité réductrice est due à la participation de 73.4 % et 86 % des flavonoïdes dans l'activité antioxydante.

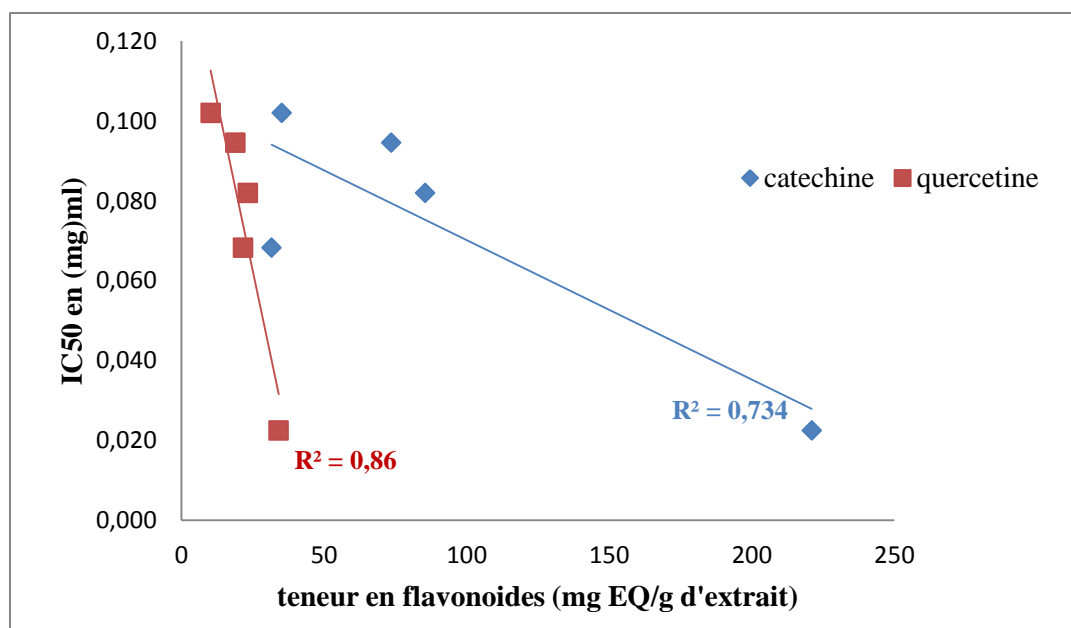


Figure 2.3 : Corrélation entre la réduction de fer exprimée en valeurs IC50 des extraits et les teneurs en flavonoïdes

## 2. Le piégeage du radical libre DPPH :

Les résultats de l'activité antioxydante des extraits des plantes étudiées sont représentés dans le tableau suivant. Nous constatons que tous les composés ont un pouvoir antioxydant exprimé en %, qui est proportionnel à l'augmentation de la concentration.

Tableau 2.3 : le pouvoir antioxydant des extraits par DPPH exprimé en (%).

les concentrations (mg/ml)	Rétama raetam				Cytissus triflorus	Mélange (50% EFAc-50% ECtAc) (%)	Contrôle positive (acide ascorbique) (%)
	EFAc (%)	ET1Ac (%)	ET1Bn (%)	ET2Bn (%)	ECtAc (%)		
0,33	27,532	1,6	35,6	20	56,962	30,063	89,2
0,5	-	-	-	21,6	-	22,468	89,2
0,67	44,620	7,2	69,2	-	68,987	32,595	90
0,83	-	-	86	48,8	-	38,608	90
1	63,924	54,8	89,6	66	75,633	-	91,2

**E:** extrait, **F:** fleurs de rétama, **T1:** tiges de rétama récolté en 2014 (A), **T2:** tiges de rétama récolté en 2017 (B), **Ct :** feuilles de *Cytissus triflorus*, **Ac:** acétate d'éthyle, **Bn:** n-butanol.

Nous remarquons que l'extrait d'acétate des feuilles de *Cytisus triflorus* présente un meilleur pouvoir antioxydant avec 56.96%, 68.98% et 75.63% à des concentrations de 0.33, 0.67 et 1 mg/ml respectivement, suivi par la fraction butanolique des tiges de rétame ET1Bn qui augmente de 35.6% à 0.33 mg/ml jusqu'à 89.6% à 1 mg/ml. D'autre cote la deuxième fraction ET2Bn présente un pouvoir faible par rapport au ET1Ac, avec un pouvoir de 35.6% à 0.33 mg/ml et 66% à 1 mg/ml. La fraction d'acétate des tiges ET1Ac présente l'activité la plus faible, avec des valeurs de 1.6%, 7.2% et 58% à 0.33, 0.67 et 1 mg/ml.

L'activité antioxydante de fraction d'acétate des fleurs de rétame s'élève de 27.53% à 0.33 mg/ml jusqu'à 63.92% à 1mg/ml.

On a étudié le pouvoir antioxydant de Mélange d'EFAc et ECtAc avec des fractions massique de 50%-50% respectivement, qui varie entre 22.46% et 38.6%, et ceci nous a présenté une activité inférieure par rapport aux résultats des extraits seuls.

### **2.1. La concentration efficace EC50 :**

Pour le but de comparer l'activité antioxydante des extraits étudiés, on a déterminé ses concentrations EC50, et l'efficacité anti-radicalaire EA, qui est inversement proportionnelle à la valeur EC50, les résultats sont exprimés dans le tableau ;

Tableau 2.4 : Détermination des concentrations EC50, et l'efficacité anti-radicalaire.

l'extrait	EC50 (mg/ml)	R <sup>2</sup>	EA (1/EC50)
EFAc	0,513	0,99	1,95
ET1Ac	1,000	0,99	1,00
ET1Bn	0,470	0,96	2,13
ET2Bn	0,818	0,95	1,22
ECtAc	<b>0,050</b>	0,98	19,80
acide ascorbique	<b>0,062*</b>	-	15,87

\*Les valeurs de l'activité antioxydante de l'acide ascorbique (tableau 2.3), ne nous permet pas de déterminer la EC50 dans ces conditions, car les valeurs sont très loin de 50%, donc on a pris une EC50=0.062 mg/ml qui était mentionnée dans ces travaux [103,104] A partir des résultats de tableau 2.4 et de la figure 2.4, l'activité antioxydante des extraits étudiés est de l'ordre croissant selon le classement suivant :

ECtAc > A. ascorbique > ET1Bn > EFAc > ET2Bn > ET1Ac.

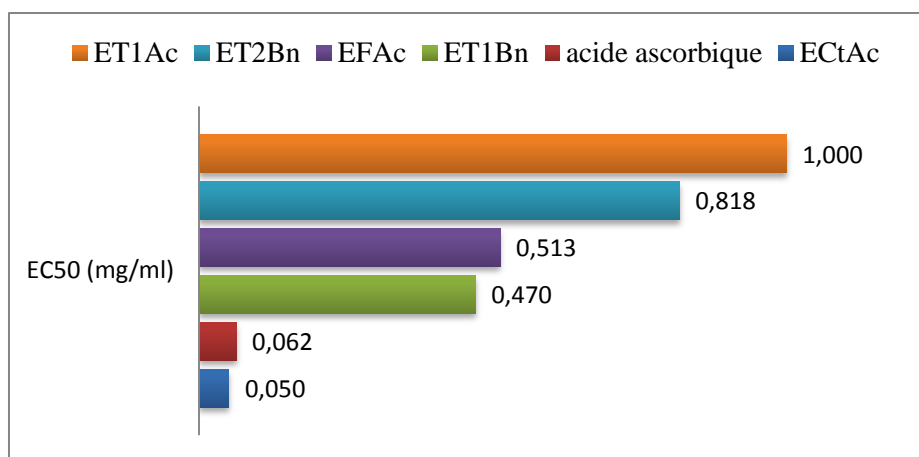


Figure 2.4 : comparaison entre les EC50 (mg/ml) des extraits étudiés.

## 2.2.La corrélation entre les teneurs de phénols totaux et flavonoïdes avec les EC50 :

Dans le but d'établir la relation entre le piégeage de radicale libre DPPH· et les teneurs en phénols totaux et les flavonoïdes, les figures (2.5, 2.6 et 2.7) ; illustre la variation d'IC50 en fonction des teneurs.

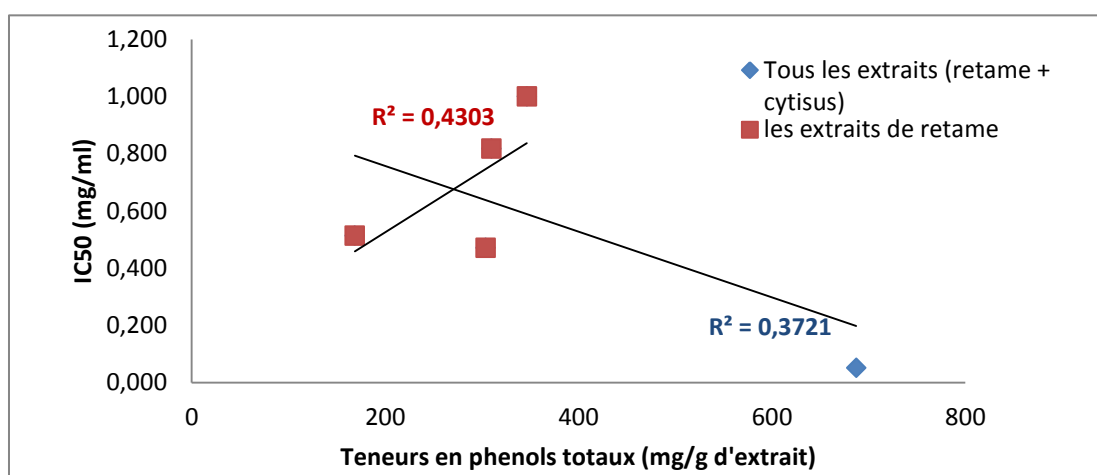


Figure 2.5 : Corrélation entre le piégeage de radical libre DPPH exprimée en valeurs EC50 des extraits et les teneurs en phénols totaux.

La figure 2.5 nous montre une faible corrélation entre les valeurs des EC50 des tous les extraits étudiés et les teneurs en phénols totaux avec un  $R^2 = 0.3721$ , tandis que les extraits de Rétame présente un  $R^2 = 0.4303$ , ceci représente 37.21% et 43.03% de l'activité antioxydante des composés phénoliques respectivement.

En revanche, La figure 2.6 nous montre une très bonne corrélation entre les EC50 et les teneurs en flavonoïdes équivalent en quercétine et en catéchine avec des valeurs de  $R^2 = 0.9418$  et  $0.6359$  respectivement. Ceci représente la participation de 94.18 % et 63.59% des flavonoïdes dans l'activité antioxydante par piégeage de radical libre DPPH·.



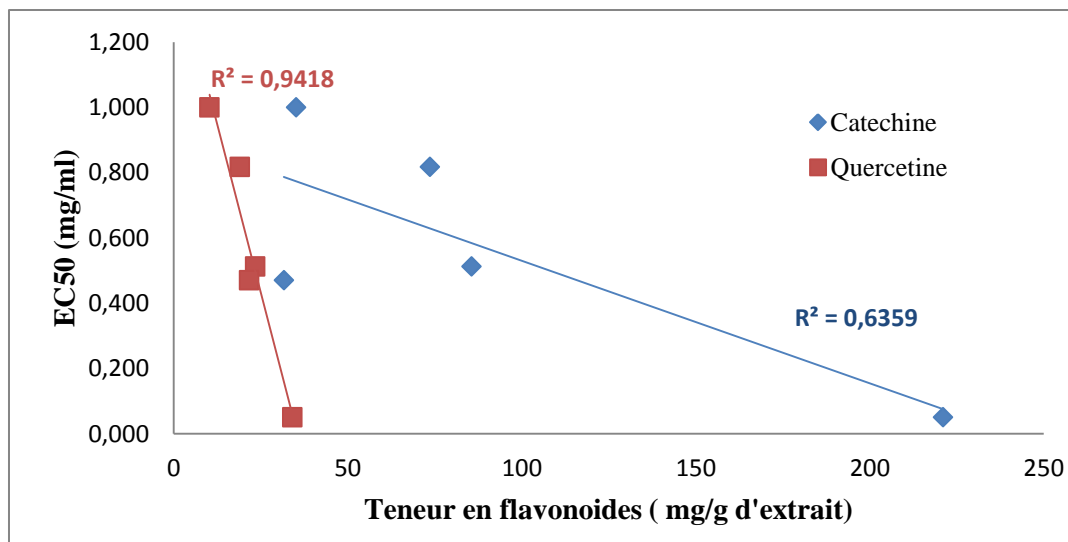


Figure 2.6 : Corrélation entre le piégeage de radical libre DPPH exprimée en valeurs EC50 des extraits et les teneurs en flavonoïdes.

### 3. La corrélation entre les deux méthodes :

Une corrélation entre les concentrations EC50 obtenus à partir de test de DPPH et les concentrations IC50 obtenus à partir de test de réduction de fer, pour le but de montrer que les deux techniques sont complémentaire, ou les composés antioxydants qui sont présents dans les extraits étudiés sont capables de réduire le radical libre de DPPH, sont capables aussi de réduire les ions ferrique. Nous observons, sur la figure 2.7, une forte corrélation entre les EC50 et les IC50 des extraits étudiés, avec une corrélation de  $R^2=0.9245$ , d'où on conclure que 92.45% des composés antioxydants participe dans l'activité antioxydante.

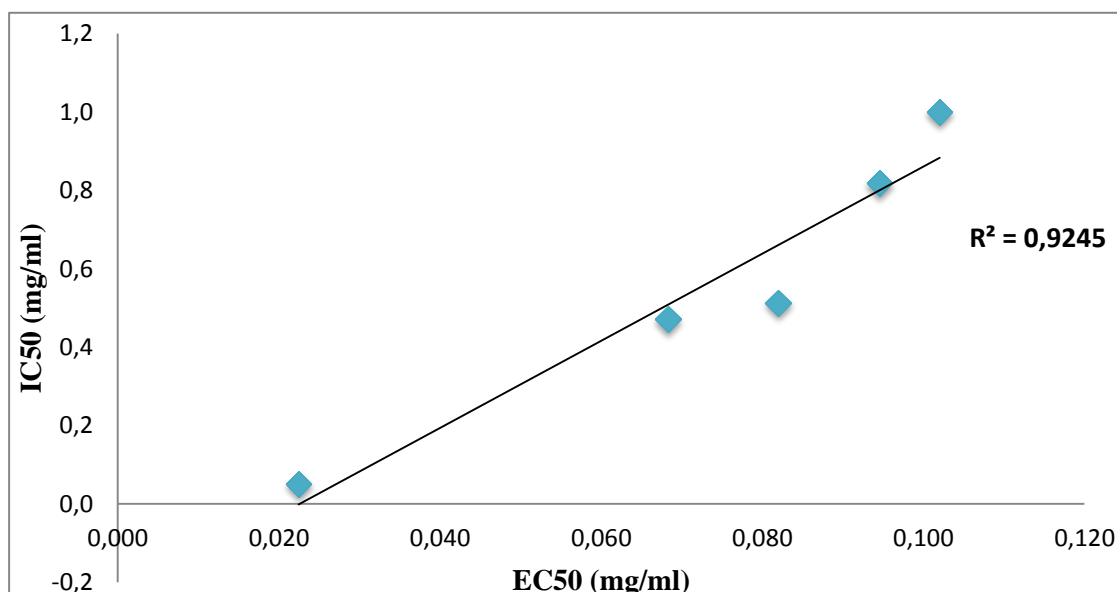


Figure 2.7: Corrélation entre les valeurs des IC50 (mg/ml) et EC50 (mg/ml)

## 2. Evaluation l'activité antibactérienne et antifongique des extraits méthanoliques des plantes [Retama reatam et cytisis triflorus] :

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérien et antifongique des extraits aqueux des plantes [Retama reatam et cytisis triflorus] par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton et Sabouraud.).

L'activité antibactérienne et antifongique de nos produits est estimée en matière de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les produits méthanoliques à tester vis-à-vis de cinq germes pathogènes d'origine hospitalière (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp.* *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*) et une levure (*Candida albicans*) et deux champignons phytopathogènes (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus brasiliensis*), après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C pour les bactéries et 120 heures d'incubation à une température adéquate de 28°C pour les champignons.

### Essai de l'extrait méthanolique de Retama Reatam et cytisis triflorus

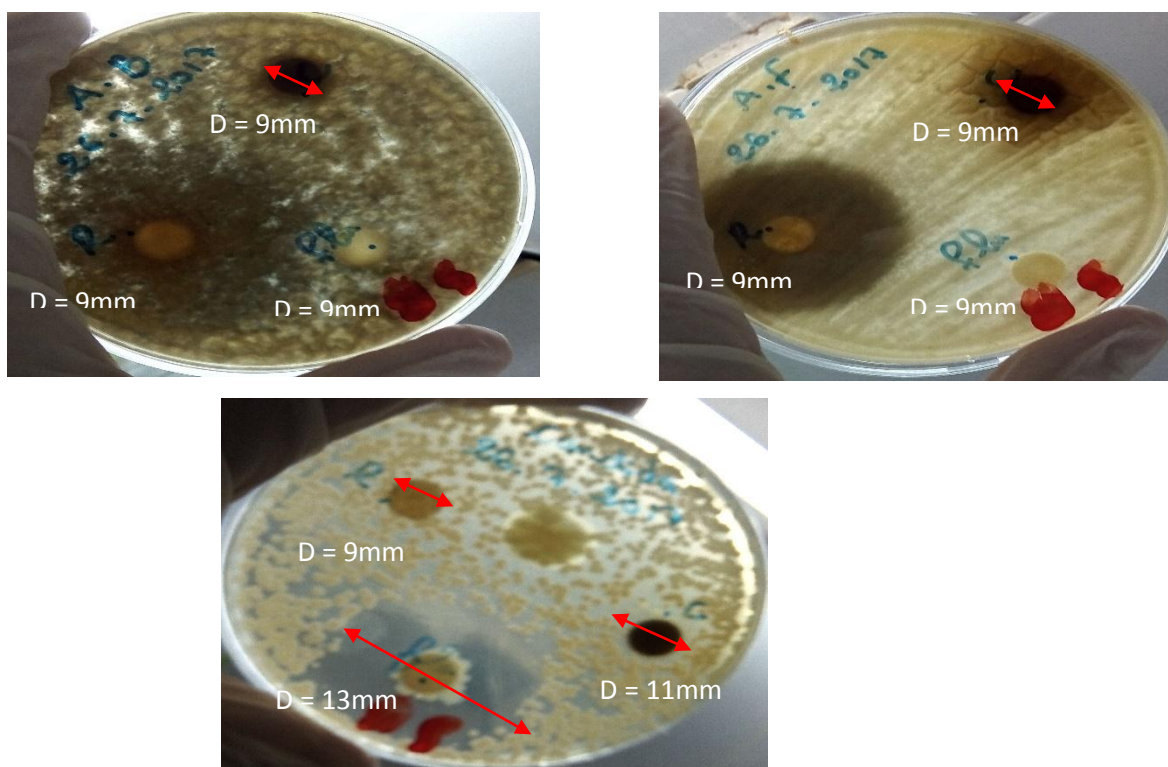


Figure 2.8 : photo montrant l'effet de l'extrait aqueux de Ratama raetam et Cytisis triflorus sur les champignons (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*- *Aspergillus brasiliensis*) (D= diamètre d'inhibition obtenue par la méthode de diffusion sur gélose).

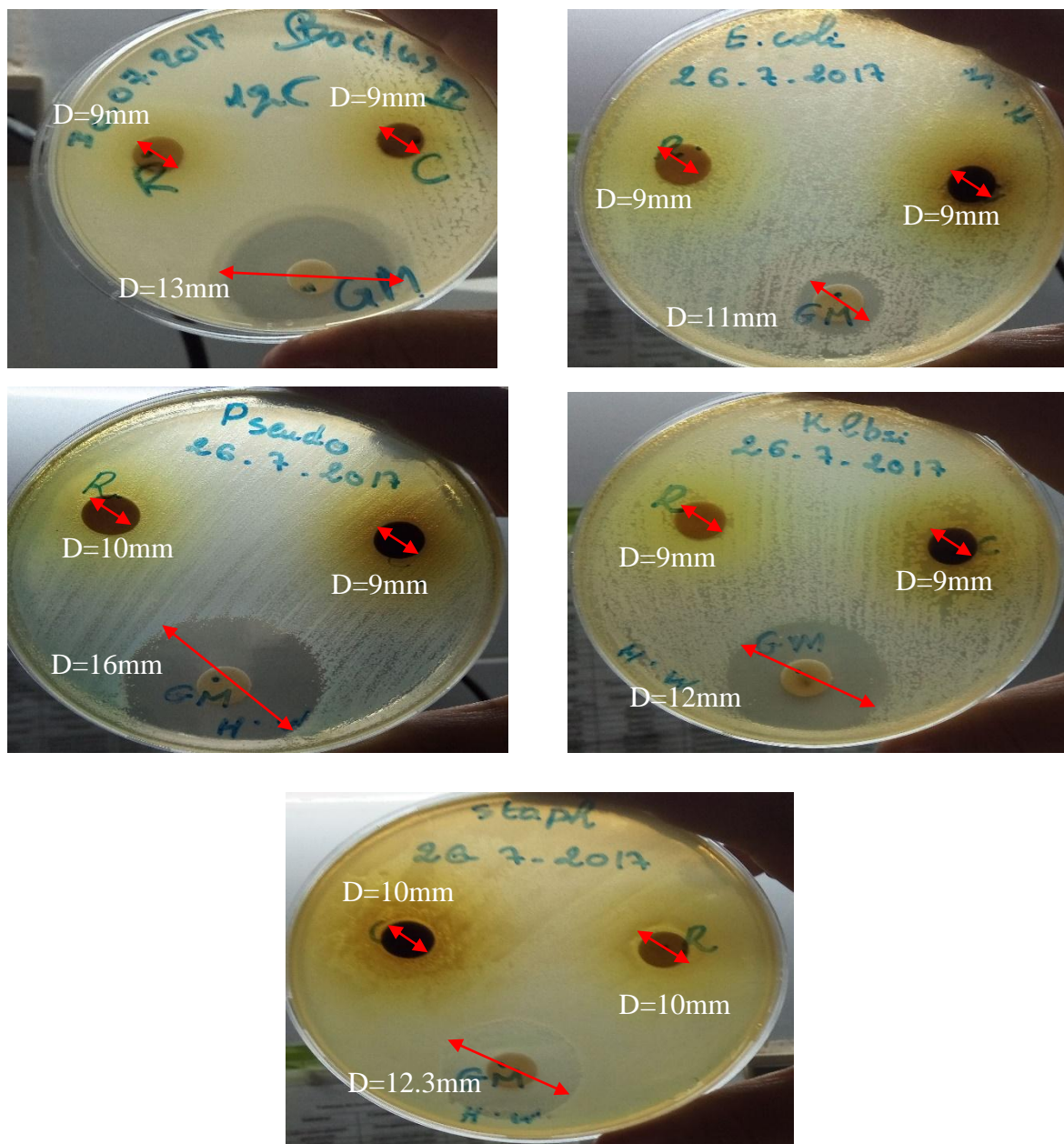


Figure 2.9 : photo montrant l'effet de l'extrait aqueux de *Ratama raetam* et *Cytisus triflorus* sur les bactéries (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus sp. Staphylococcus aureus*)

(D= diamètre d'inhibition obtenue par la méthode de diffusion sur gélose).

Les résultats des différents tests antibactériens et antifongiques sont regroupés dans les tableaux et les figures.

Tableau 2.5 : Zones d'inhibition (mm) (moyenne±écart type) de la croissance des souches bactériennes et les champignons.

	Con mg/ml	Bactéries					Champignons		
		Bacil	E.coli	KB	Pseudo	Staph	Candid	AF	AB
<b>EFAc</b>	5	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0
	25	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0
	125	12,66± 0,57	10,66± 0,57	9±0	10±0	10,33± 0,57	9±0	12,66± 0,57	15,66± 0,57
	225	13,66± 0,57	12,66± 0,57	12±0	11±0	10,33± 0,57	9±0	12,66± 0,57	9±0
<b>ET1Bn</b>	5	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0
	25	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0
	125	12±0	9±0	10,33± 0,57	10,66± 0,57	13,66± 0,57	9±0	9±0	10,33± 0,57
	225	9±0	10,66± 0,57	10,33± 0,57	10,66± 0,57	14±0	9±0	11,66± 0,57	11±0
<b>ET2Bn</b>	5	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0
	25	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0
	125	11,33± 0,57	9±0	10,33± 0,57	11,33± 0,57	9±0	9±0	9±0	10,66± 0,57
	225	9±0	10,66± 0,57	11±0	11,66± 0,57	11,33± 0,57	9±0	9±0	14±0
<b>ECtAc</b>	5	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0
	25	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0
	125	9±0	10,66± 0,57	9±0	10,66± 0,57	10±0	15±0	9±0	9±0
	225	16,66± 0,57	11,66± 0,57	13±0	11±0	10,33± 0,57	9±0	12,66± 0,57	10,33± 0,57
<b>GM</b>		12,66± 0,57	15,66± 1,57	12±0	12,16± 0,57	11,83± 0,57			
<b>FK</b>									
<b>EDS</b>		9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0	9±0

Con : concentration, Bacil : *Bacillus sp*, E.coli : *Escherichia coli*, KB : *Klebsiella pneumoniae*,

*Pseudo* : *Pseudomonas aeruginosa*, Staph : *Staphylococcus aureus*,

Candid : *Candida albican* AF : *Aspergillus fumigatus*, AB : *Aspergillus brasiliensis*,

GM : Gentamicine, FK : Flucocanazol.

**E** : extrait, **F** : fleurs de rétama, **T1** : tiges de rétama récolté en 2014 (A), **T2** : tiges de rétama récolté en 2017 (B), **Ct** : feuilles de *Cytissus triflorus*, **Ac** : acétate d'éthyle, **Bn** : n-butanol.

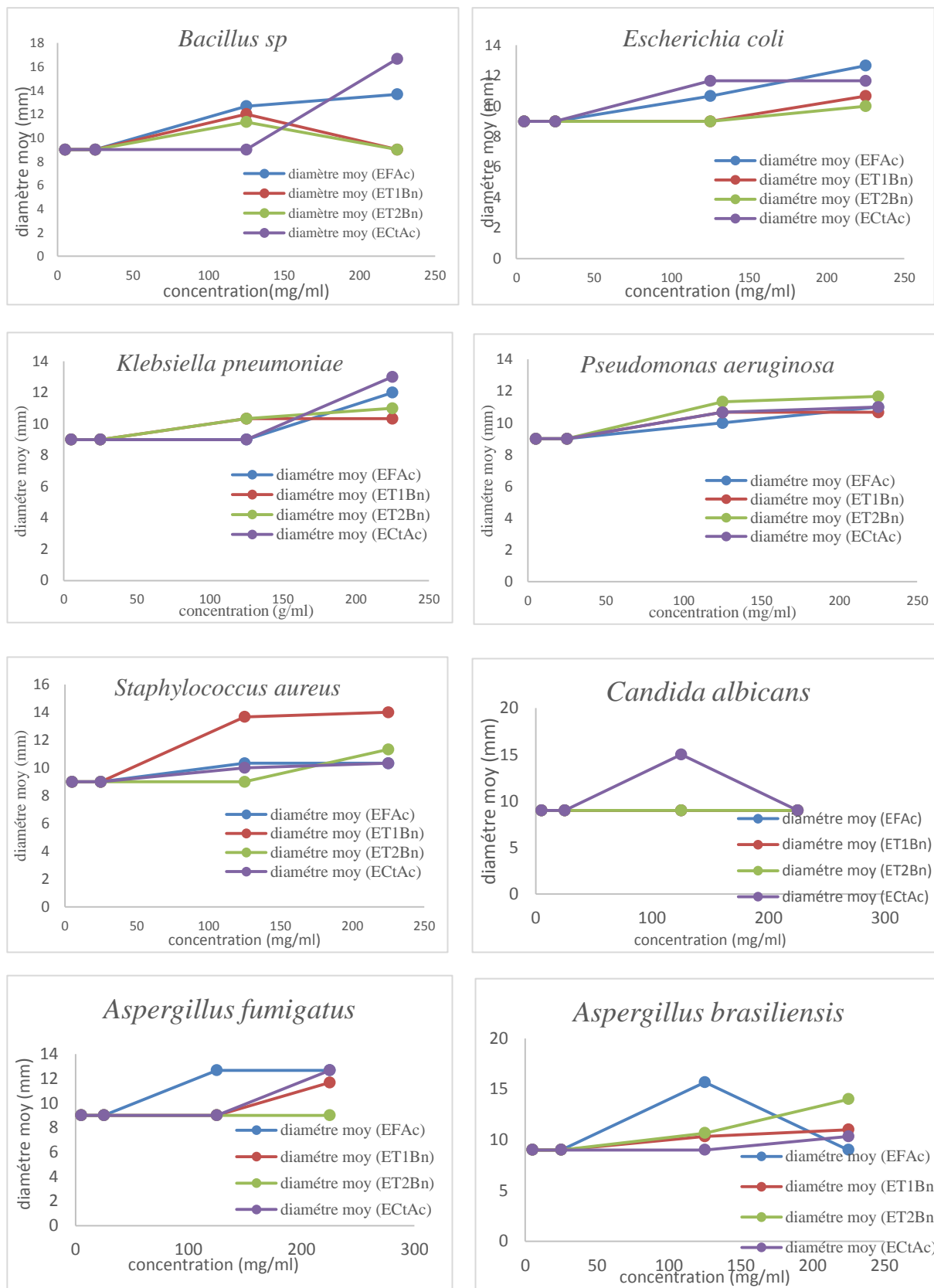


Figure 2.10 : Variation du diamètre des zones d'inhibition de la croissance de souches vis-à-vis des produits testés à différents concentration

D'après les tableaux 2.5 et la figure 2.10, Il y a une grande hétérogénéité dans les résultats obtenus des extraits (ET1Bn, ET2Bn), on remarque une résistance bactérienne de la souche *Bacillus sp* ( $9\pm 0\text{mm}$ ) aux concentrations (5mg/ml-25mg/ml-225mg/ml) et une sensibilité à la concentration 125mg/ml ( $12\pm 0\text{mm}$  pour ET1Bn-  $11.33\pm 0.57\text{ mm}$  pour ET2Bn).

De même les extraits EFAC et EFtAc ne possèdent pas une sensibilité ( $9\pm 0\text{mm}$ ) contre la souche testée aux concentrations (5 - 25mg/ml pour EFAC et 5-25-125mg/ml pour ECtAc).

Donc la *Bacillus sp* est sensible beaucoup plus au extrait ECtAc ( $16.66\pm 0.57\text{mm}$  à une concentration de 225mg/ml) qui présente la meilleur activité ensuite l'extrait EFAC ( $13.66\pm 0.57\text{mm}$  à la concentration de 225mg/ml).

Les résultats des tableaux 2.5 et la figure 2.8 fait apparaitre que les extraits (ET1Bn, ET2Bn) ont presque une même activité contre *E.coli* (absence de sensibilité  $9\pm 0\text{mm}$  aux concentrations 5-25-125mg/ml et une légère sensibilité  $10.66\pm 0.57$  [ET1Bn] -  $10\pm 0.57\text{mm}$  [ET2Bn] à la concentration 225mg/ml).

De même les extraits EFAC, ECtAc n'ont pas une sensibilité ( $9\pm 0\text{mm}$ ) aux concentrations 5-25mg/ml, par contre les concentrations 125-225mg/ml marque une sensibilité moyen contre la souche *E.coli* ( $10.66\pm 0.57$ - $12.66\pm 0.57\text{mm}$  pour EFAC et  $11.66\pm 0.57$ - $11.66\pm 1.52\text{mm}$  pour ECtAc).

On conclut que l'extrait EFAC possède la meilleure activité contre la souche *E.coli*.

Les résultats des tableaux 2.5 et la figure 2.8 semble être les même pour les extraits ET1Bn, ET2Bn d'où on remarque une non sensibilité aux concentrations 5-25mg/ml et une sensibilité aux concentrations 125-225 mg/ml ( $10.33\pm 0.57\text{mm}$  pour ET1Bn et ET2Bn-  $10.33\pm 0.57$  pour ET1Bn,  $11\pm 0$  pour ET2Bn).

Les deux extraits restants EFAC, ECtAc présentent une sensibilité contre la souche testée à la concentration de 225mg/ml ( $12\pm 0\text{mm}$  pour EFAC-  $13\pm 0\text{mm}$  pour ECtAc), et pour les concentrations restantes (5-25-125mg/ml) n'ont pas marqués une sensibilité contre la bactérie.

A partir de ces résultats l'extrait ECtAc possède la meilleure activité contre une concentration de 225mg/ml.

D'après les résultats des tableaux 2.5 et la figure 2.8 tous les extraits (EFAc, ET1Bn, ET2Bn, EAAtAc) possèdent une activité contre la souche *Pseudomonas aeruginosa* que aux concentrations 125 et 225 mg/ml ( $10 \pm 0$  -  $11 \pm 0$  mm pour EFAc,  $10,66 \pm 0,57$  pour ET1Bn,  $10,33 \pm 0,57$  -  $11,66 \pm 0,57$  mm pour ET2Bn,  $10,66 \pm 0,57$  -  $11 \pm 0$  pour EAAtAc).

L'extrait ayant la plus grande activité c'est ET2Bn à la concentration de 225mg/ml.

D'après les résultats des tableaux 2.5 et la figure 2.8 la souche *Staphylococcus aureus* semble plus résistante aux extraits EFAc (5-25mg/ml), ET1Bn (5-25mg/ml), ET2Bn (5-25-125mg/ml) et ECtAc (-mg/ml) mais sensible aux même extraits pour les deux concentrations restantes ( $10,33 \pm 0,57$  mm « EFAc »,  $13,66 \pm 0,57$  -  $14 \pm 0$  mm « ET1Bn »,  $11,33 \pm 0,57$  mm « ET2Bn »,  $10 \pm 0$  -  $10,33 \pm 0,57$  mm « ECtAc »).

Le pouvoir antibactérien plus prononcé sur la souche testée est celle de l'extrait ET1Bn ( $14 \pm 0$  mm pour une concentration de 225mg/ml).

Les tableaux 2.5 et la figure 2.8 montrent que la levure *Candida albicans* est plus résistante aux extraits (EFAc, ET1Bn, ET2Bn, ECtAc) aux différentes concentrations (5-25-125-225 mg/ml). Sauf l'extrait ECtAc marque une sensibilité contre la levure testée ( $15 \pm 0$  mm à une concentration 125mg/ml).

D'après les tableaux 2.5- et la figure 2.8 l'activité antifongique est marquée que pour les extraits EFAc aux concentrations (125mg/ml et 225mg/ml avec une même zone d'inhibition de  $12,66 \pm 0,57$  mm), ET1Bn et ECtAc à la même concentration de 225mg/ml avec des zone différentes ( $11,66 \pm 0,57$  mm -  $12,66 \pm 0,57$  mm).

D'après les tableaux 2.5 et la figure 2.8 le champignon *AB* semble plus sensible aux extraits EFAc à la concentration 125mg/ml contre une zone de  $15,66 \pm 0,57$  mm juste et ET2Bn à la concentration de 225mg/ml contre une zone de  $14 \pm 1$ .

Pour les extraits ET1Bn (125-225mg/ml), ET2Bn (125mg/ml) et ACtAc (225mg/ml) marquent une légère sensibilité ( $10,33 \pm 0,57$  mm -  $11 \pm 0$  mm -  $10,66 \pm 0,57$  mm -  $10,33 \pm 0,57$  mm).

Donc on constate que extrait EFAc à la concentration 125mg/ml contre une zone de  $15,66 \pm 0,57$  mm possède la grande activité antifongique.



L'activité antibactérienne des extraits des plantes *Retama raetam* et *Cytisus triflorus* couvrent un large spectre contre différentes bactéries de gram positif (*Bacillus sp*, *Staphylococcus aureus*) et Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*) due à la présence des flavonoïdes en raison de leur richesse en groupes phénoliques, qui sont capables de se fixer sur certaines protéines et enzymes modifiant ainsi les équilibres enzymatiques.

En comparant les résultats obtenus à partir de *Retama* et *Cytisus* avec celle de la gentamycine (antibiotique –contrôle positif) on se trouve que ECtAc possède la meilleure activité contre la *Bacillus* (16.66mm) et *klbsiella* (13mm) par rapport au gentamycine (12,66mm – 12mm), de même ET1Bn possède une grand sensibilité contre la souche *Staphylococcus* (14mm) par rapport au gentamycine (11.83mm).

De même les deux plantes possèdent une activité antifongique contre une levure (*Candida albicans*) et les champignons (*Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus brasiliensis*).

La *Cytisus* semble avoir une grande zone d'inhibition (15mm) par rapport à celle de l'antifongique flucoconazol (contrôle positif 13mm) contre la levure testée, et EFAc marque une grande activité antifongique (15,66mm) par rapport à cet antifongique (10,73mm) contre le champignon *Aspergillus brasiliensis*.

D'où on peut constater que la *Cytisus* possède une bonne activité microbienne par rapport au *Retama* ce qui signifie la richesse de la plante aux flavonoïdes.



### CHAPTRE 03 : FORMULATION D'UNE POMMADE A BASE DES EXTRAITS

Nous avons proposé une formule d'une pommade antibactérienne et cicatrisante, la méthode qu'on a suivi dans la préparation est simple et rapide, elle est suivi par une série de contrôles afin de choisir une formulation évaluée comme stable selon les normes. Les résultats des expériences sont comme suite :

#### **1. la préparation d'une pommade antibactérienne et cicatrisante à base des extraits étudiés**

Le but de notre travail est de disperser nos extraits afin d'obtenir une préparation homogène de 20g. Pour la première manipulation, on effectuer une série d'essai bi-variable, avec des doses d'extraits différentes de 1% ,2% ,5%, et des proportions de d'agent mouillant variable de 0.2% et 0.4%. Les résultats de la manipulation sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 3.1 : les proportions et résultats de la première manipulation.

<b>Pommade</b>	<b>Extrait Cytisus %</b>	<b>Extrait Rérama %</b>	<b>Phase huileuse %</b>	<b>Tween 80 %</b>	<b>Masse totale (g)</b>	<b>Aspect</b>	<b>Stabilité</b>	<b>pH</b>
<b>1%</b>	0,50	0,50	98,80	0,20	19,982	Homogène	Stable	4,22
<b>3%</b>	1,50	1,50	96,60	0,40	20,004	Homogène	Instable	4,51
<b>5%</b>	2,50	2,50	94,60	0,40	20,004	Homogène	Instable	4,4

Nous constatons d'après les résultats affichés dans le tableau 4.1, parmi les trois essais celle de 1% est la seule préparation qui est stable, avec une proportion de tween 80 de 0.20%, mais le pH=4.22 est hors les normes, ce dernier doit être entre 5.5 et 6.5. Donc, nous avons décidé de faire une deuxième manipulation pour obtenir une pommade stable avec un pH convenable aux normes.

Dans la deuxième manipulation, on a essayé d'élever le pH de la pommade par ajouter quelques gouttes de solution de NaOH saturé comme suite :

- la dispersion de Rétama : son pH est de 4.21, après l'ajout de 3 gouttes de solution saturé de NaOH, son pH est devenu pH=5.48
- la dispersion de Cytissus : son pH est de 3.54, après l'ajout de 1 goutte de solution saturé de NaOH, son pH est devenu pH=4.16

Pour les proportions de l'agent mouillant, la proportion de 0.2% a présenté un état stable pour une dose de 1%, donc on a proposé de multiplier cette proportion avec la dose pour les préparations de 2 et 3%.

Tableau 3.2 : les proportions et résultats de la deuxième manipulation.

<b>Pommade %</b>	<b>Extrait Cytissus %</b>	<b>Extrait Rétama %</b>	<b>Phase huileuse %</b>	<b>Tween 80 %</b>	<b>Masse totale (g)</b>	<b>Aspect</b>	<b>Stabilité</b>	<b>pH</b>
<b>1%-A</b>	0,50	0,50	98,60	0,40	20,00	Homogène	Stable	4,94
<b>1%-B</b>	0,50	0,50	98	1	20,00	Homogène	Stable	5,65
<b>2%</b>	1,0	1,0	98,50	0,50	20,00	Homogène	Instable	5,36
<b>3%</b>	1,50	1,50	96,60	0,60	20,00	Homogène	Instable	-

Selon les résultats de tableau 4.2, les préparations de 2 et 3% sont instable malgré l'augmentation de la quantité d'agent mouillant.

Deux préparations ont présentés un état de stabilité et les deux de même dose 1% nommés A et B, avec des proportions d'émulsifiant de 0.4% et 1% respectivement, mais leurs pH sont de 4.94 et 5.65 respectivement d'où le pH de la pommade B est dans les normes entre 5.5 et 6.5.

En jugeant ces résultats, on a conclu que la pommade la plus stable est de dose 1% nommé B, avec des proportions de phase huileuse et d'agent mouillant de 98 et 1% respectivement.

On a effectué un dernier essai afin de confirmer nos résultats, mais la préparation est de quantité de 100g, les résultats de cet essai ont montré des résultats identiques à celle de la pommade choisi, et sont résumé dans le tableau 4.3.

Tableau 3.3 : les proportions et résultats de la préparation de 100g.

Pommade %	Extrait Cytisus %	Extrait Rétama %	Phase huileuse %	Tween 80 %	Masse totale (g)	Aspect	Stabilité	pH
1%-C	0,50	0,50	98	1	100	Homogène	Stable	5.65

### **1.2. La stabilité de pommades préparées dans le temps :**

Nous avons suivi les pommades préparés qui ont un aspect homogène dans le temps pour évaluer le temps nécessaire de séparation de phase. Après deux mois tous les pommades d'une dose de 1% restent stables et homogène, pour les autres doses seulement celle de 2% reste homogène et stable après deux mois, les restes ont présenté une séparation de phases d'où on voit à l'œil nu des gouttelettes vertes sphériques apparentes sur la surface de la préparation à partir de troisième et quatrième jours pour les préparations de la première manipulation, et à partir d'une semaine pour les préparations de la deuxième manipulation.



Figure 3.1 : la pommade 1% après 2 mois



Figure 3.2 : la pommade 2% après 2 mois



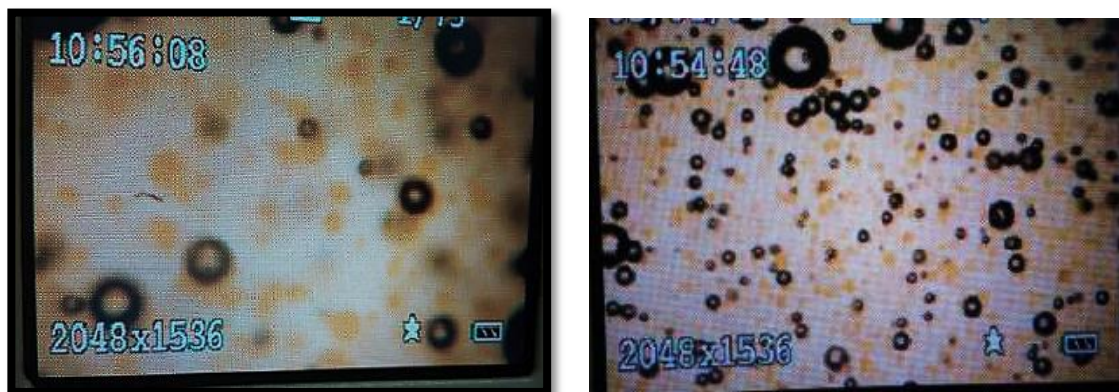
Figure 3.3 : la pommade 3% après 2 mois



Figure 3.4 : la pommade 5% après 2 mois

### 1.3. Contrôle de l'homogénéité par microscopie optique

D'après les images microscopique de la pommade élaborée présentée sur les figures 3.5 et 3.6, on voit bien que contrairement à l'œil nu d'où la préparation a l'apparence homogène, on voit clairement le mélange est hétérogène sous forme d'émulsion, nos principes actifs sont sous forme sphériques coloré en orange de taille très fine, et nous constatons la présence des bulles d'air.



Figures 3.5 et 3.6 : images microscopique de la pommade 1%

### 1.4. Détermination de la viscosité et étude de l'écoulement par rhéologie :

Afin d'étudier le comportement rhéologique de notre pommade, nous avons réalisé le test d'écoulement à l'aide d'un rhéomètre. Le tracé de la variation viscosité en fonction de la contrainte de cisaillement est représenté sur le rhéogramme sur les figures suivantes :

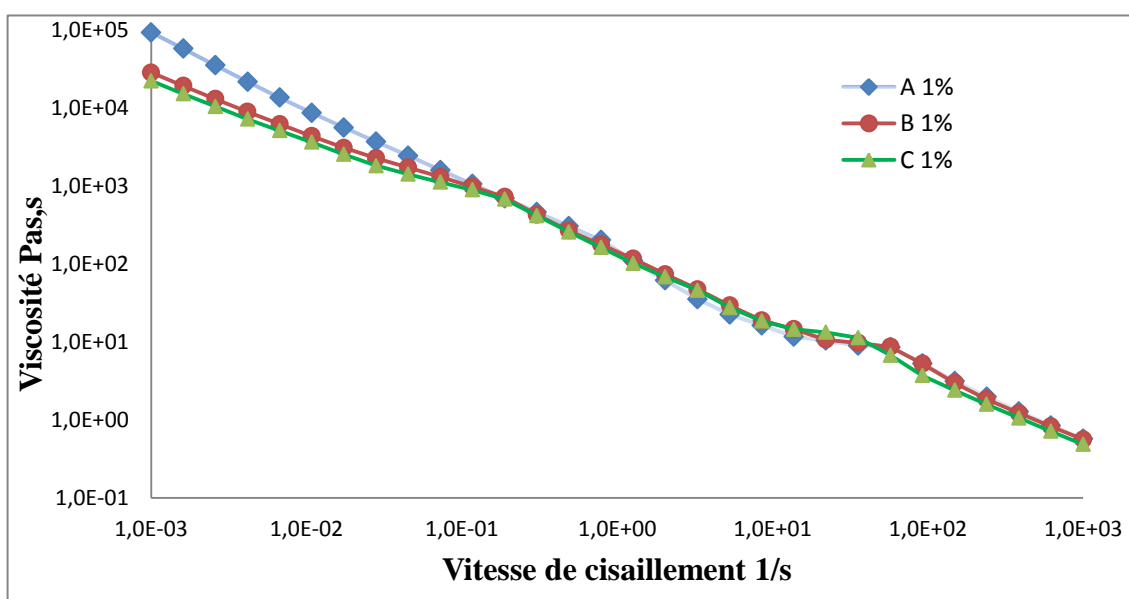


Figure 3.7 : Rhéogramme des courbes d'écoulements des pommades préparés

Nous constatons d'après le rhéogramme de la figure, que les trois pommades présentent le même comportement. D'abord à faible vitesse de cisaillement  $10^{-3}\text{s}^{-1}$  on observe une diminution de la viscosité à partir de 93100 Pa.s pour la pommade A et de 28600 et 22300 Pa.s pour les pommades B et C respectivement. L'écart entre les viscosités apparentes au début peut être dû à la quantité d'agent mouillant, lorsque la quantité est élevée, la viscosité diminue. On remarque qu'à  $0.1\text{ s}^{-1}$ , la courbe A devient en superposition avec B et C.

Cette chute de la viscosité des courbes d'écoulement à l'échelle double logarithmique exprime un comportement non newtonien de type rhéofluidifiant de pommades préparées, d'où on observe que la viscosité apparente diminue avec l'augmentation de la vitesse de cisaillement. Donc on conclut que plus la préparation est sollicitée, moins elle résiste à l'écoulement.

Les pommades B et C sont identiques, d'où on remarque que tous les points des courbes B et C sont presque en superposition, c'est à dire que les deux pommades ont le même comportement de déformation lors de l'étalement.

Le modèle rhéologique qu'on a adopté est le modèle d'Ostwald ;

Son loi en puissance est  $\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$

Avec  $n$  : exposant, inférieur à 1 pour le comportement rheofluidifiant.

$K$  : indice de consistance.

Les valeurs de la viscosité ont été présentées en fonction du coefficient de corrélation du modèle ( $R^2$  tend vers 1) sont regroupés sur le tableau 3.4.

Tableau 3.4 : Résultats de la viscosité et des coefficients de corrélation des pommades Obtenus par le rhéomètre.

Essais	k	n	Coefficient de corrélation (R2)
1% A	172,91	-0,859	0.9937
1% B	139.1	-0.781	0.9971
1% C	122.78	-0.773	0.9966

D'après le tableau 3.4, nous constatons que les coefficients de corrélations sont proches à 1, dans ce cas c'est le modèle d'Ostwald qui se rapproche le plus du comportement de notre pommade, et que les indices de consistance sont proches, particulièrement les pommades B et C, et que les exposants ( $n$ ) des trois pommades sont inférieurs à 1, et ceci confirme le comportement rhéofluidifiant de nos pommades.

## ***PARTIE DISCUSSION***

## **1. Rendements et teneurs des composés phénoliques**

Les rendements d'extraction des extraits sont variable, d'où ils sont plus élevés dans les fleurs et les tiges de *Rétama raetam* d'acétate avec des rendements de 26,63 et 23.64% respectivement, par rapport aux extraits butanolique ET1Bn et ET2Bn avec des taux de 15.2 et 12% respectivement, nous constatons que les extraits d'acétate sont presque deux fois plus grand que les extraits butanolique. Ces rendements sont supérieurs à les résultats cités par Hadj moussa 2012 [105] qui a travaillé sur *retama raetam* récolté de region de Ghardaïa, d'où les extrait des tiges d'acétate présente 12.8%, et butanoliques de 0.68% et 2.18%. Ceci nous confirme que le rendement d'extraction dépend de la méthode d'extraction, et aussi des caractéristiques physicochimiques des solvants utilisés, notamment leur polarité, il s'ensuit que la solubilité des substances contenus dans la matière végétale dépend de ces propriétés.

On a effectué le dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux dans nos extraits. Les quantités en phénols totaux des extraits de rétama varient entre 168.7 et 346.64  $\mu\text{g. EqAG /mg E}$ . nos résultats sont nettement supérieurs à celles de Benaïssa et al, 2016 [106] qui ont présentés des taux en phenols des extraits d'acétate et de n-butanol des tiges de *retama sphaerocarpa* récolté de région de kabyle sont de  $73.9 \pm 0.3$  et  $111.7 \pm 0.1$   $\mu\text{g. EqAG /mg E}$ , et en flavonoïdes de  $16.5 \pm 0.8$  et  $15.3 \pm 0.6$   $\mu\text{g Eq quercetine/ mg E}$  respectivement, tandis que nos extrait des tiges ET1Ac, ET1Bn et ET2Bn présentent des taux en phenols de 346,64, 304,08 et 309,96  $\mu\text{g. EqAG /mg E}$  et en flavonoïdes de 10.235, 21.601 et 18.9496  $\mu\text{g Eq quercetine/ mg E}$  respectivement. Ces résultats sont aussi plus élevés de celles de hadj moussa 2012 qui varient entre 187 et 272.46  $\mu\text{g. EqAG /mg E}$ .

Nous remarquons que les deux plantes de *Rétama raetam* dont l'une était conservée pendant 3 ans et l'autre fraîche, présentent des taux de rendements d'extraction et des taux en composés phénoliques et en flavonoïdes proches. Ceci nous confirme qu'un bon séchage et conservation est important à propos de garder les composés phénoliques, et que ses propriétés sont conservés même après deux ans.

aitkaci et al, 2015 [107] a révélé que l'extrait hydro-ethanolique des feuilles de *Cytisus triflorus* récolté de région de Azazga contient  $204 \pm 4,24$   $\mu\text{g. EqAG /mg E}$  et 52,13  $\mu\text{g Eq quercetine/ mg E}$ , qui sont inférieurs à nos teneurs d'extrait ECtAc avec 687,26  $\mu\text{g. EqAG /mg E}$  et avec 221,083  $\mu\text{g Eq catéchine/mg}$  de l'extrait et 34,081  $\mu\text{g Eq quercetine/ mg}$  de l'extrait, ce qui indique une richesse en composés phénolique, et en flavonoïdes.

Ces variations entre les résultats sont probablement liées aux plusieurs facteurs, à des facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol, agressions [108] les périodes de récolte [109], La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux [110]. Ceci est confirmé par l'étude de [52]. Chehma, (2006) qui révèle que l'extrait aqueux des feuilles de *Rétama raetam* récolte dans la région de Ouargla sur quatre périodes saisonnières différentes: Été, Automne, Hiver et le printemps présentent des taux variables de polyphénols de l'ordre 4.85 %, 3.555 %, 3.925 %, 4.455 % respectivement. Selon l'auteur, cette différence entre les résultats, peut être liée aux variations de facteurs climatiques, édaphiques et au stade du développement physiologique de la plante [52].

## **2. L'évaluation de l'activité antioxydante**

Nous avons évalué l'activité antioxydante de nos extraits des deux plantes *Retama raetam* et *Cytissus triflorus* par deux méthodes, par réduction de fer et par piégeage de radical libre DPPH•. Jusqu'à présent, il n'y a pas une méthode simple et universelle par laquelle l'activité antioxydante est évaluée qualitativement et quantitativement [111]. Nos résultats ont montré une activité antioxydante forte, sur tout de l'extrait d'acetate des feuilles de *Cytissus triflorus*, d'où on a marqué une IC50 et EC50 de 0,022 et 0,050 mg/ml, meilleur que l'acide ascorbique de 0,032 et 0.063 mg/ml, ceci est confirmé par AitKaci et al 2015, qui a montré que l'extrait hydroethanolique des feuilles de *Cytissus triflorus* donne une EC50= 19,17 µg/ml.

Les extraits de rétama ont révélé un pouvoir antioxydant considérable exprimé en IC50 entre 0,068 et 0,102 mg/ml d'où l'extrait ET1Bn a marqué la meilleure concentration inhibitrice. Le test de piégeage de radical libre DPPH• a confirmé les résultats précédentes, d'où l'extrait ET1Bn présente EC50= 0,470 mg/ml, la meilleure concentration efficace parmi les extraits de la rétame.

Autres auteurs ont étudiés et apprécié l'activité anti-radicalaire forte de la rétame par piégeage de radical libre DPPH•, ceci est confirmé par les résultats cités par [106] Benaissa et al, 2016 d'où il a montré l'activité anti-radicalaire est élevée des fractions des tiges de rétama *sphaerocarpa* d'acetate et de n-butanol avec 76% et 82%, respectivement à 0.1 mg/ml, par contre [112] Djeddi et al 2013 a révélé une faible activité anti-radicalaire des extraits aqueux des tiges, racines, fruit et fleurs avec  $14.06 \pm 0.40\%$ ,  $04.20 \pm 1.40\%$ ,  $04.26 \pm 1.35\%$  et  $11.96 \pm 0.49\%$  à 1000 mg/L respectivement, ces résultats sont liés aux taux faibles en phénols totaux qui sont de 25.19, 11.11, 11.11 et 51.68 mg GAE/g d'extrait respectivement.



Nous constatons que nos résultats d'activité antioxydante sont fortement liés à la richesse de nos extrait en polyphénols totaux et en flavonoïdes avec les deux méthodes, ceci est confirmé par les coefficients de corrélation, d'où on a marqué une bonne corrélation entre les taux polyphénols totaux avec les IC50 de 64,09% et avec les EC50 de 43.03 et 37.21 %, ces résultats confirment les études qui ont révélés l'existence d'une corrélation positive entre les taux en phénols et l'activité antioxydante [113, 114, 115]. L'activité antioxydante est due à l'effet inductif des trois groupes hydroxyles de l'acide gallique [73]. Cependant autres auteurs ont indiqués que ce n'est pas nécessairement la forte teneur en polyphénols exhibe une activité antioxydante puissante[116], et que l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration mais aussi de la structure de ces molécules.

Le fractionnement des composés phénoliques révèle la présence d'une bonne corrélation entre les teneurs en flavonoïdes de 86% et 73.4% avec les IC50 et de 94.18 % et 63.59% avec les EC50, cette corrélation positive était montrée par l'étude de Belmokhtar et al 2014 sur les extraits de *Rétama monosperma*, avec une corrélation de 79% entre les EC50 et les taux en flavonoïdes. Ceci confirme que les flavonoïdes possèdent des propriétés antioxydantes puissantes. Le nombre et/ ou la position des groupes hydroxyle sur les noyaux de ces molécules, les substitutions sur les cycles B et A avec la présence de la double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo sur le cycle C renforcent l'activité antioxydante des flavonoïdes [117].

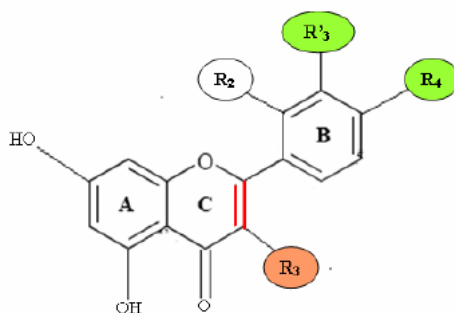


Figure 1 : Principaux éléments de l'activité antioxydante des flavonoïdes [117].

Une corrélation positive entre les concentrations EC50 et IC50 présentés par les deux techniques utilisées avec  $R^2 = 0,9245$ , cette linéarité est dû à la présence des antioxydants, qui sont les flavonoïdes et polyphénols, qui sont capables de participer dans l'activité anti-radicalaire par les deux méthodes.[118] Benhammou et al 2009, ont évalués l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Marrubium deserti* et *Thymelaea microphylla* par les deux méthodes, les résultats révèlent une forte corrélation entre les IC50 et les EC50 de  $R^2 = 0.713$  et  $0.934$  respectivement.

### **3. L'évaluation de l'activité antibactérienne**

Concernant l'activité antibactériennes et antifongiques des extraits des plantes étudiés *Rétama raetam* et *Cytisus triflorus*, nous avons marqué que tous les extrait possèdent une activité moyenne, et ceci est confirmés par les résultats obtenu par la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Nous concluons que l'extrait de *cytisque triflorus* possède une activité meilleur par rapport aux extrait de la rétame et de contrôle positive.

Cette étude nous a permis de réaliser l'extraction par macération des fleurs et tiges de *Retama raetam* et les fleurs de *Cytisus triflorus* et évaluer l'activité antibactérienne et antifongique de ces extraits sur la croissance in vitro des souches bactériennes multi-résistantes et les champignons.

Le test de sensibilité des souches a permis de montrer la présence d'une activité antibactérienne et antifongique. Ainsi, les souches *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp*, *Klebsiella pneumoniae*, la levure *Candida albicans* et les champignons ont été plus sensible avec des diamètres d'inhibition allant de 10 jusqu'à 16mm aux concentrations 125 et 225 mg/ml. Cependant, les souches *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ont été moins sensible.

Nos observations concordent avec les résultats obtenus sur l'activité antibactérienne (*Bacillus spi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) et antifongique (*Candida albicans*) des extraits de plante *Retama raetam* (EDZIRI et al 2012) mais reste inférieur par rapport à leurs résultats de même supérieur à celle de [106] (BENAISSA et al 2016).

On constate également que la plus part des zones d'inhibitions (*Bacillus sp* pour l'extrait de *Cytisus* et *Retama*, *Klebsiella pneumoniae* pour l'extrait de *Cytisus* et *Staphylococcus aureus* pour l'extrait de *Retama*) étaient supérieures à celles de l'antibiotique qui ont montré des zones d'inhibition larges par rapport à celles obtenues en testant les extraits aqueux de *Retama raetam* et *Cytisus triflorus*.

Divers paramètres contribuent à expliquer cette différence d'efficacité entre les l'antibiotique et les extraits :

- La concentration (peut être exagérées dans les disques).
- Le degré de pureté.
- La toxicité elle-même.

Les extraits des plantes ont été examinés également pour l'activité antifongique contre *Candida albicans*, AB et AF. Les résultats ont prouvé que les extraits ont modérément réduit

la croissance de ces champignons, ces résultats sont presque les mêmes par rapports à ceux obtenus dans une autre étude (EDZIRI et al 2012)[119]

L'activité antibactérienne des substances actives d'origine végétale dépend surtout de la nature des bactéries Gram+ ou Gram – et aussi de la méthode d'extraction réalisée (BasliA., 2012). Cowan (1999) explique que la toxicité des extraits envers les microorganismes est dû aux différentes classes de poly phénols essentiellement les tanins et les flavonoïdes. Cette toxicité est en 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, séquestration de substrats nécessaires à la croissance microbienne et l'inhibition du métabolisme énergétique microbien (Jungkind, 1995 ; Harrar A.2012).

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).

Par ailleurs, la paroi des bactéries Gram+ est riche en protéines tandis que chez les souches Gram–, elle est surtout assemblée en lipopolysaccharides (LPS), la membrane extérieure de ces dernières constitue une barrière de perméabilité efficace. Le LPS, grâce à ses charges négatives de surface, empêche la diffusion des molécules hydrophobes, et les protéines excluent le passage des molécules hydrophiles de poids moléculaire élevé. Alors que les bactéries Gram+ sont moins protégées contre les agents antibactériens, le peptidoglycane n'entrave que la diffusion des molécules supérieures à plus de 50 000 D (Hogan D, KolterR.,2002)

## ***CONCLUSION GENERALE***

## CONCLUSION

Dans la première partie, la quantification par des méthodes spectrophotométriques nous a permis de déterminer les teneurs en phénols totaux par le réactif du Folin-Ciocalteu et en flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium. Les résultats obtenus nous ont révélé des rendements d'extraction considérable et une richesse des plantes en composé phénoliques, dont les extraits de *Rétama raetam* et de *Cytisus triflorus* ont marqués des taux élevés en polyphénols et en flavonoïdes, on a enregistré des teneurs voisins en polyphénols concernant les extrait butanolique des deux plantes étudiés, la première séché et conservé pendant trois ans et la deuxième plante récemment récolté, les valeurs sont 304,08 et 309,96  $\mu\text{g. EqAG /mg}$  d'extrait. Les résultats obtenus dans la première partie nous amène à avancer les conclusions suivantes :

- ✓ Les fractions d'acétate d'éthyle ont marqué les meilleurs rendements d'extraction, sa polarité a permet de solubiliser les substances contenus dans la matière végétale, en particulier les polyphénols, car la teneur de la fraction d'acétate des tiges est plus élevé par rapport à la fraction de butanol.
- ✓ La rétame fraîche et la rétame conservé ont marqué des taux en polyphénols voisin, donc les polyphénols sont capable à être conservés. . Ceci nous confirme qu'un bon séchage et conservation est important à propos de garder les compose phénoliques, et que ses propriétés sont conservés même après trois ans.
- ✓ La plante fraîche a marqué un meilleur teneur en flavonoïdes, plus précisément la catéchine, et des teneurs voisins en quercétine.
- ✓ Le cytise à trois fleurs est énormément riche en polyphénols et en flavonoïdes par rapport à la Rétame.

Dans la deuxième partie, nous sommes intéressés par l'étude des propriétés antioxydantes des extraits brutes de ces plantes par deux techniques complémentaires, réduction de fer de piègeage de radical libre DPPH•, Les résultats obtenus dans la deuxième partie nous amène à avancer les conclusions suivantes :

- ✓ La fraction d'acétate de *cytisus triflorus* a enregistré un meilleur resultat en comparaison avec tous les extraits et le contrôle positif, un pouvoir réducteur fort avec  $IC_{50} = 0,022 \text{ mg/ml}$  et une forte activité anti-radicalaire avec  $EC = 0,032 \text{ mg/ml}$ .

- ✓ Les extraits de *Rétama raetam* ont une bonne activité antioxydante, avec des IC50 entre 0.068 et 0.1 mg/ml, et avec EC50 entre 0.470 et 1 mg/ml.
- ✓ La rétame fraîche et la rétame conservé ont marqué un pouvoir réducteur proche avec IC50 = 0,068 et 0,095 respectivement,
- ✓ les flavonoïdes possèdent des propriétés antioxydantes puissantes, et ceci est confirmé par les résultats des corrélations des IC50 et de EC50 avec les teneurs en flavonoïdes ( $R^2=0.86$  et  $0.734$ ) et ( $R^2=0.9418$  et  $0.6359$ ) respectivement.
- ✓ La corrélation obtenue entre les concentrations IC50, EC50 est positive  $R^2= 0,9245$  avec la contribution de plus de 92.45% des antioxydants de la plante qui sont des polyphénols et des flavonoïdes.

Concernant l'activité antibactérienne et antifongique des extraits des plantes étudiés *Retama raetam* et *Cytisus triflorus*, nous avons marqué que tous les extrait possèdent une activité moyenne, et ceci est confirmés par les résultats obtenus par la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Nous concluons que l'extrait de *cytisque triflorus* possède une activité meilleur par rapport aux extraits de la Rétame et de contrôle positive.

Les extraits ont été incorporés dans une préparation en tant que principes actifs pour formuler une pommade thérapeutique antibactérienne et cicatrisante. Une optimisation des paramètres de formulation ont été effectués nous a mené à obtenir une formulation stable avec une dose de 1%.

## LISTE DES REFERENCES

- [1] **Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., De Laage de Meux A., Moulard F., Zha E., De la Roque R., De la Roque O., Vican P., Deelesalle –Féat T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloth J. et Botrel A.**, 2001. Larousse des plantes medicinales : identification, préparation, soins. Ed Larousse. p10-12.
- [2] **OMS, 2015.** Organisation Mondiale de Santé, « Antibiotiques : à manipuler avec précaution ».
- [3] World Health Organization. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. Geneva: World Health Organization; 1993. [Online] Available from: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh2946e/> [Accessed on 20th May, 2014].
- [4] **Wink, M., Hartmann, T.**, 1982. Localisation of the enzymes of quinolizidine alkaloid biosynthesis in leaf chloroplasts of *Lupinus polyphyllus*. *Plant Physio* 70, 74-77.
- [5] Wink, M., Hartmann, T., 1982. Localisation of the enzymes of quinolizidine alkaloid biosynthesis in leaf chloroplasts of *Lupinus polyphyllus*. *Plant Physio* 70, 74-77
- [6] Jhonson I. Antioxydants et anticancéreux. *Biofutur* 1999, 186: 109-10.
- [7] **Sarni-Manchado P, Cheynier V.** 2006. Les polyphénols en agroalimentaire, Ed. Lavoisier (Tec & Doc), Paris, , 300-398.
- [8] **Bruneton J. Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales.** 4e Ed. Éditions médicales internationales (Tec & Doc), Paris, 2009, 1288.
- [9] **Pawlowska AM, De Leo M, Braca A.** Phenolics of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) fruits: Identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54 (26): 10234-38.
- [10] **Heller W, Forkmann G.** The flavonoids. Advances in research since 1986. In Harborne JB. Secondary Plant Products. Encyclopedia of plant physiology. Ed. Chapman & Hall, London, 1993, 399-425.
- [11] **Jakupovic J, Paredes L, Bohlmann F, Watson L.** Prenyl flavanes from *Marshallia* species. *Phytochem.* 1988, 27 (10): 3273-5.
- [12] **Bruneton J.** Les tanins. Ed. Editions médicales internationales, Paris, 1999, 369-404.
- 13 **Pietta PG.** Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 2000, 63 (7), 1035-42.
- [14] **Frei B, Higdon JV.** Antioxidant activity of tea polyphenols *in vivo*: Evidence from animal studies. *J. Nutr.* 2003, 133: 3275-84.
- [15] **Oszmianski J, Wojdylo A, Lamer-Zarawska E, Swiader K.** Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. *Food Chem.* 2007, 100 (2): 579-83.

- [16] **Nijveldt, R. J., Nood, E., Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Norren, K., Leeuwen, P.** (2001). Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am.J. Clin Nutr*, 74 : 418–425.
- [17] **Ames BN, Gold LS, Willett WC.** The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995, 92: 5258-65.
- [18] **Jhonson I.** Antioxydants et anticancéreux. *Biofutur* 1999, 186: 14-15.
- [19] **Martin S, Andriantsitohaina R.** Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. *Ann. Cardiol. Angéiol.* 2002, 51 (6): 304-15.
- [20] **Lainé E, Hano C, Lamblin F.** Les lignanes phyto-oestrogènes du lin sont ils des bienfaiteurs méconnus ? *Phytothér.* 2007, 5: 121-8.
- [21] **Funatogawa K, Hayashi S, Shimomura H, Yoshida T, Hatano T, Ito H, Hirai Y.** Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiol. Immunol.* 2004, 48 (4): 251-61
- [22] **Ruggiero P, Tombola F, Rossi G, Pancotto L, Lauretti L, Del Giudice G, Zoratti M.** Polyphenols reduce gastritis induced by *Helicobacter pylori* infection or VacA toxin administration in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006 50 (7): 2550-52.
- [23] **Tsimogiannins, D.I., Oreopoulou, V.** (2006). The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovat Food Sci Emerg Tech*, 7: 140-146.
- [24] **Yao, L.H., Jiang, Y.M., SHI, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S.** (2004). Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr*, 59 : 113-122.
- [25] **Edenharder, R., Grünhage, D.** (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res*, 540: 1–18.
- [26] **Havsteen, B.H.** (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut*, 96: 67– 202
- [27] **Ames BN, Gold LS, Willett WC.** The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995, 92: 5258-65.
- [28] **Babayi H, Kolo I, Okogum JI.** The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. *Biochemistri* 2004, 16 (2): 102-5.
- [29] **Ulanowska K, Traczyk A, Konopa G, Wegrzym G.** Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DND, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbiol.* 2006, 184 (5): 271-8.



- [30] **Didrak M.** Antimicrobial activities of the extracts of various plants (Valex, Mimosa bark, Gallnut powders, Salvia sp and Phlomis sp). *J. Biol.* 1999, 23: 241-8.
- [30] **Modak B.** Actividad antibacteriana de flavonoïdes aïslados des exudado resinod de Heliotropium sinuatum. Efecto del tipo de estructura. *Bol. Soc. Quin.* 2001, 47 (1): 366-421.
- [31] **Ortuno A, Baidez A, Gomez P, Arcas MC, Porrás I, Garcia-Lidon A, Del Rio JA.** Citrus paradisi and Citrus sinensis flavonoids: Their influence in the defence mechanism against Penicillium digitatum. *Food Chem.* 2006, 98 (2): 351-8.
- [32] **Spedding G, Ratty A, Middleton E.** Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antiviral Res.* 1989, 12 (2): 99-110.
- [33] **Choi HJ, Song JH, Park KS.** Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2009, 37 (3-4): 329-33.
- [34] **Chaudhuri S, Banerjee A, Basu K, Sengupta B, Sengupta PK.** Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins : Antioxidant and antihemolytic effects. *Int. J. Biol. Macromol.* 2007, 41 (1): 42-8.
- [35 ] **Lopez-Lazaro M.** Two new flavonol glycosides as DNA topoisomerase I poisons. *Z. Naturforsch C.* 2000, 735 (11-12): 898-902
- [36] **Ariefdjohan MW, Savaiano DA.** Chocolate and cardiovascular health: is it too good to betruer? *Nutr. Rev.* 2005, 63 (12-1): 427-30.
- [37] **Morikawa K, Nonaka M, Mochizuki H, Handa K, Hanada H, Hirota K.** Naringenin and hesperetin induce growth arrest, apoptosis, and cytoplasmic fat deposit in human, preadipocytes. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56 (22): 11030-7.
- [38] **Park HH, Lee S, Son HY, Park SB, Kim MS, Choi EJ, Singh TS, Ha JH, Lee MG, Kim JE, Hyun MC, Kwon TK, Kim YH, Kim SH.** Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch. Pharm. Res.* 2008, 31(10):1303-11.
- [39] **Chen HQ, Jin ZY, Wang XJ, Xu XM, Deng L, Zhao JW.** Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. *Neurosci. Lett.* 2008, 448 (2): 175-9.
- [40] **Yao K, Zhang L, Zhang Y, Ye P, Zhu N.** The flavonoid, fisetin, inhibits UV radiationinduced oxidative stress and the activation of NF-kappaB and MAPK signaling in human lens epithelial cells. *Mol. Vis.* 2008, 14: 1865-71.
- [41] **OMS,2003 cité par MADI, 2010.** Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Thèse de magister en biotechnologie végétale. Département de biologie et écologie. Université Mentouri de Constantine

- [42] **Eddouks M, Ouahidi M.L, Farid O, Moufid A, Khalidi A, Lemhadri A. (2007).** L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. Springer Phytothérapie 5: 194–203.
- [43] **Zohary Michael, (1962).** Plant life of Palestine, Israel, and Jordan, Ronald, New York. Science 11 may: Vol. 163. no.3515, p.523. DOI:10.1126/science.136.3515.523.
- [44] **Quezel et Santa ; 1962.**Nouvelle flore de l'Algérie. Tome I.p156-162
- [45] **Quezel, P., Santa, S., 1962-1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, pp. 475–476.
- [46] **Bellakhdar, J., 1997.** La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ed Ibis Press, Maroc, pp. 318-319.
- [47] **Ighil Hariz Z., 1990.**Etude du comportement physiologique, biochimique et structurale du *Rétama retam* vis à vis du NaCl.*Thèse de Magister*, Université d'Oran Algérie, 120 p.
- [48] **Allal-benfakih.I ;2006 .**Recherche quantitatives sur le criquet migrateur *Locusta migratoria* (Orth.Oedipodinae) dans le Sahara algérien. Perspectives de lutte biologique à l'aide de microorganismes pathogènes et de peptides synthétiques .thèse de doctorat N°17-2006.UNIV de limoge. Laboratoire UMR INRA 1061. Institut National Agronomique d'El Harrach.p27.
- [49] **Mittler.R , et al ;2000.** Living under a dormant canopy : a molecular acclimation mechanism of the desert plant *Retama raetame*.the plant journal.Blackwell ScienceLtd. (2001) **25**(4), 407-416.
- [50] **Selami.N ;2000.** Contribution à l'étude de rétama monosperma étude du système racinaire et recherche des associations de type Rhizobium. Mémoire d'ingénieur en biotechnologie.USTO.ORAN .38P
- [51] **Farchichi, A. 1996.** La lutte contre l'ensablement et pour la stabilisation des dunes: Essai de la fixation biologique des dunes en Tunisie présaharienne. Recherches sur la désertification dans la Jeffara. Rev. Tunis. Geogr. **12**: 49–102.
- [52] **Chehma Abdelmadjid, (2006 a).**Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. Dar Elhouda. 140:87.
- [53] **Saadaoui.B et al., (2007).** Etude de la composition et du pouvoir antioxydant des composés phénoliques de quelques espèces végétales de l'aride tunisien. Revue des régions arides. pp.316-321[6 page(s) (article)]. Édition. : Institut des régions arides, Médenine, Tunisie.
- [54] **Maghrani, M., Lemhadri, A., Jouad, H., Michel, J.B., Eddouks, M., (2003).** Effect of the desert plant *Retama raetam* on glycaemia in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. J. Ethnopharmacol; 87, 21–25.

- [55] **Maghrani, M., Michel, J.B., Eddouks, M., (2005b).** Hypoglycemic activity of *Retama raetam* in rats. *Phytother. Res*; 19, 125–128.
- [56] **Maghrani, M., Zeggwagh, N.A., Haloui, M., Eddouks, M., (2005a).** Acute diuretic effect of aqueous extract of *Retama raetam* in normal rats. *J. Ethnopharmacol*; 99, 31–35.
- [57] **R Sundararajan, NA Haja, V Kumar, K Mukherjee, BP Saha, A Bandyopadhyay, PK Mukherjee,** *BMC Complementary and Alternative Med.*, **2006**, 6(8), 1-7.
- [58] **P Quezel, S Santa,** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome I, Editions C.N.R.S, Paris, **1963**. P 484.
- [59] **R Sundararajan, R Koduru,** *Indo American J. Pharmacol. Res.*, **2014**, 4(4), 2151-2169.
- [60] **OR Pereira, AMS Silva, MRM Domingues, SM Cardoso,** *Food Chem.*, **2012**, 131, 652-659.
- [61] **N González, D Ribeiro, E Fernandes, DR Nogueira, E Conde, A Moure, MP Vinardell, M Mitjans H Dominguez,** *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*,**2013**, 125, 83-89.
- [62] **K. Ait-KaciAourahoun, F. Fazouane1 and S. Benayache.** Pharmacological potential of *Cytisus triflorus* l'Hérit. Extracts as antioxidant and anti-inflammatory agent, 2015
- [63] **Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G.** (1996). Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med*, 20: 933–956.
- [64] **Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B.** (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res*, 22(4): 375-83.
- [65] **Goudable J. & Favier A.**, 1997. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition*
- [66] **Christophe P. & Christophe S.**, 2011. Physiologie, pathologie et thérapie de la CLEVENGER JF. « Apparatus for volatile oil determination, Description of New Type ». *American Perfumer & Essential Oil Review*, 1928, 467-503.
- [67] **Favier, A.** (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.
- [68] **Barouki, R.**, 2006. Stress oxydant et vieillissement, *Med Sci (Paris)*, Vol. 22, N° 3; p. 266-272
- [69] **Hadj Salem J.**, 2009. Extraction, Identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. Thèse de Doctorat : Université de LORRAINE.

- [70] **Evans P., et Halliwell B.**, 1999."Free radicals and hearing: Cause, consequence, and criteria."Annals of the New York Academy of Sciences 884: 19-40.
- [71] **Scherer, R., Godoy, H.T.** (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1 picrylhydrazyl method. *Food Chem*, 112: 654–658.
- [72] **Sanchez-Moreno, C.** (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Sci Tech Int*, 8(3): 121-137.
- [73] **Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A.** (1998). Main methods used in lipid oxidation determination. *Food Sci. Technol. Int*, 4: 391-399.
- [74] **Cao, G.H., Alessio, H.M., Cutler, R.G.** (1993). Oxygen-Radical Absorbency Capacity Assay for antioxidants. *Free Radical Biol Med*, 14: 303-311.
- [75] **Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A.** (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*, 84: 407–412.
- [76] **Benzie, I. F. F. et Strain, J. J.** (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.
- [77] **Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C.** (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food. Sci. Technol*, 28 : 25–30.
- [78] **Li, C., Oldham, C.D., May, S.W.N.** (1994). N-Dimethyl-1,4-phenylenediamine as an alternative reductant for peptidylglycine. Alpha-amidating mono-oxygenase catalysis. *Biochem. J*, 300: 31-36.
- [79] **Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, A. J., Fong, J. H., Blanchard, K. A.** (1998). A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biol. Med*, 24: 480–493
- [80] **Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U. et Locke, S.** (1985). Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Letters*, 187: 33-37.
- [81] **Popov, I., Lewin, G., Baehr, R.** (1987). Photochemiluminescent detection of antiradical activity. I. Assay of superoxide dismutase. *Biomed Biochim Acta*, 46: 775–779
- [82] **Charfi D.**, (1995). Effet des eaux usées traitées sur les caractéristiques physico-chimiques du sol et sur la physiologie de quelques espèces végétales cultivées au périmètre d'ElHajeb (Sfax). Thèse en écologie végétale, Fac. Sci. de Sfax.
- [84] **Vincent JL, Brealey D, Libert N, Abidi NE, O'Dwyer M, Zacharowski K**, 2013. Rapid diagnosis of infection in the critically ill, a multicenter study of molecular detection in bloodstream infections, pneumonia, and sterile site infections. *Crit Care Med.*;43:2283–91.

- [85] **Jarlier V et Nordmann P.** 2000. Entérobactéries et  $\beta$ -lactamines. ESKA 2000-Précis de bactériologie clinique.
- [86] **Norkmak.** 2002 citée par BELMIMOUN ASMAA, Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de quelques plantes aromatiques et médicinales. 2016
- [87] **Goossens et al,** 2006 Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de quelques plantes aromatiques et médicinales. 2016
- [88] **Bevilacqua,S.,**2011. Évaluation de l'impact d'une équipe opérationnelle en infectiologie sur la consommation et le coût des antibiotiques au CHU de Nancy. (Essai d'intervention contrôlé), thèse de doctorat en science de la vie et de la santé, Université de Nancy.
- [89] **Babic M, Hujer AM, Bonomo RA,** 2006. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. Drug Resist Updat. Jun; 9(3):142-56.
- [90] **Bobba S, Ponnaluri VK, Mukherji M, Gutheil WG,** 2011. Microtiter Plate-Based Assay for Inhibitors of Penicillin-Binding Protein 2a from Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. Jun; 55(6):2783-7.
- [91] **Lessard IA, Walsh CT. VanX,** 1999. A bacterial D-alanyl-D-alanine dipeptidase: resistance, immunity, or survival function? Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 28; 96(20):11028-32.
- [92] **Marchou B, Bellido F, Charnas R, Lucain C, Pechère JC,** 1987. Contribution of betalactamase hydrolysis and outer membrane permeability to ceftriaxone resistance in Enterobacter cloacae. Antimicrob Agents Chemother. Oct; 31(10):1589- 95.
- [93] **A.Le Hir, J-C Chaumeil, D Brossard.** Pharmacie galénique – Formulation et technologie pharmaceutique. P.WEHRLE. 9e édition, Maloine. P375
- [94]: Pharmacopée Européenne. 6ème Ed. 16 juillet 2007.
- [95] **Singleton V. L., Rossi J. R.,** 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic –phosphothungstic acid. Am. J. Enol. Vitic, 16: 144–158.
- [96] **Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. J.** Food Drug Anal. 2002; 10: 178-182.
- [97] **Oyaizu, M.** (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. Jpn. J. Nutr, 44: 307-315.
- [98] **PRIOR R L., WU X., SCHAICH K.,** 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements . Agric. Food Chem. (53) : 4290-4302.
- [99] **Torres R., Faini F., Modak B., Urbina F., Labbe´ C., Guerrero J.,** 2006: Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudate of Haplopappus multifolius. Phytochemistry. 67: 984–987.

[100] BENDJELALI

[101] **Wade D., Silveira A., Rollins-Smith L., Bergman T., Silberring J., Lankinen H.**,2001. Hematological and antifungal properties of temporin A and a cecropin A-temporin a hybrid. *Acta Biochim Pol.* Vol. 48. Pp: 1185 – 1189.

[102] **Raymond C Rowe, Paul J Sheskey, Marian E Quinn.** Handbook of Pharmaceutical Excipients, sixth edition P-481-550-17

[103] **Fawzia Atik Bekkara, Nabila Benhammou and Tatjana Kadifkova Panovska.** BIOLOGICAL ACTIVITIES OF THE ESSENTIAL OIL AND ETHANOLIC EXTRACT OF *Inula viscosa* FROM THE TLEMCEN REGION OF ALGERIA. 2008

[104] **Nabila Benhammou1\*, Fawzia Atik Bekkara1 and Tatjana Kadifkova Panovska2,** ANTIRADICAL CAPACITY OF THE PHENOLIC COMPOUNDS OF *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia atlantica* Desf.2007

[105] **HADJ MOUSSA ALI,** Contribution à l'étude in vitro de l'effet des extraits de feuilles de *Retama raetam* sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase.2012, P 30-39

[106] **Akila Benaissa, Radia Cherfia, Laetitia Canabady-Rochelle, Dominique Perrin, Patrick Chaimbault, Mohamed Bouhelassa, and Noredine Kacem Chaouche.** Antioxidant and Antimicrobial Potentials of *Retama Sphaerocarpa* 2016

[107] **K. Ait-KaciAourahoun, F. Fazouane and S. Benayache.** Pharmacological potential of *Cytisus triflorus* l'Hérit. Extracts as antioxidant and anti-inflammatory agent 2015

[108] **EBRAHIMI N.S., HADIAN J., MIRJALILI M.H., SONBOLI A., ET YOUSEFZADI M.** 2008. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food chemistry*, 110 : 927-931. Ed C.N.R.S. Paris, 662 Pages.

[109] **MILIAUSKAS. G., VENSKUTONIS P.R., ET VAN BEEK T.A.** 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food chemistry*, 85 : 231-237.

[110] **LEE K.W., KIM Y.J., LEE H.J., ET LEE C.Y.** 2003. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food chemistry*., 51 : 7292-7295.

[111] **Prior, R.I., WU, X.L., Schaich, K.** (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric Food Chem*, 53 (10): 4290-4302.

[112] **Samah Djeddi1, Anastasia Karioti, Elina Yannakopoulou,** Kyriakos Papadopoulos3, Rim Chatter4 and Helen Skaltsa1. Analgesic and Antioxidant Activities of Algerian *Retama raetam* (Forssk.) Webb & Berthel Extracts 2013

- [113] **Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N.** (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654-660.
- [114] **Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H.** (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74, 2157–2184.
- [115] **Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El- Elimat, T.** (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 104, 1372–1378.
- [116] **Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J., Dominguez, H., Núñez, M. J., Parajo, J. C.** (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*, 72: 145–171.
- [117] **Cai, Y-Z., Sun, M., Xing, J., Luo, Q., Corke, H.** (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci*, 78: 2872-2888.
- [118] **N Benhammou, F Atik Bekkara and JM Coustard.** ANTIOXIDANT ACTIVITY OF METHANOLIC AND WATER EXTRACTS FROM *Marrubium deserti* (de Noë) AND *Thymelaea microphylla* FROM ALGERIAN SAHARA, 2009
- [119] **Hayet Edziri , Maha Mastouri , Mohamed Ali Mahjoub , Zine Mighri , Aouni Mahjoub and Luc Verschaeve,** Antibacterial, Antifungal and Cytotoxic Activities of Two Flavonoids from *Retama raetam* Flowers, 2012

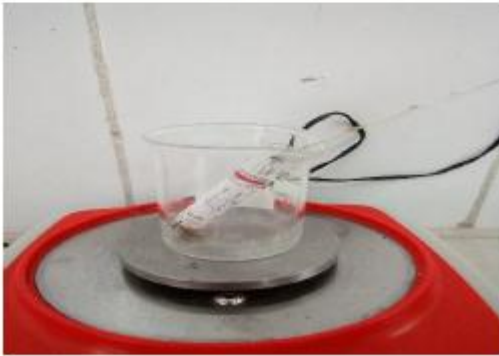
## ANNEXE



Boite de petri remplie en milieu  
de culture



autoclave utilisé pour la stérilisation des  
disques



La pesée des extrait



les masses des extraits voulus



Préparation des solutions d'extraits





Préparation de la solution d'inoculum

