

UNIVERSITE DE BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et de Physiologie Cellulaire

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Biotechnologies Végétales

EXTRACTION, CARACTERISATION DE QUELQUES METABOLITES
SECONDAIRES D'UNE PLANTE A CARACTERE THERAPEUTIQUE,
Rhamnus alaternus L. ET ETUDE DE QUELQUES ACTIVITES
BIOLOGIQUES

Par

Amina LATRECHE

Devant le jury composé de :

D. GUETARNI	Professeur, Université de Blida 1	Président
M.S. HAMAI	Professeur, Université de Blida 1	Examinateur
N. SMAIL-SAADOUN	Professeur, Université de Tizi-Ouzou	Examinatrice
F. SAIDI	Professeur, Université de Blida 1	Promotrice

Blida, 22 décembre 2015

RESUME

L'objectif de cette étude est l'extraction, la caractérisation de quelques métabolites secondaires et l'étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne de *Rhamnus alaternus* L.

Un screening phytochimique des feuilles a été effectué. Il a mis en évidence la présence des tanins, des flavonoïdes, des dérivés anthracéniques, des saponines et des alcaloïdes. Un extrait méthanolique a été obtenu par extraction au soxhlet. La teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes contenus dans l'extrait a été mesurée. Elle a montré une richesse en polyphénols totaux et en flavonoïdes avec des valeurs de $664,10 \pm 8,89$ mg EAG/g d'extrait et $158,07 \pm 3.57$ mg EQ/ g d'extrait respectivement.

L'extrait méthanolique a montré une activité antioxydante vis-à-vis du radical DPPH avec une concentration inhibitrice à 50% (IC 50) estimée à $0,435 \pm 0.08$ mg/ml. L'extrait méthanolique a révélé une activité légèrement inhibitrice seulement sur *Echerichia coli*, *Citrobacter freundii* et *Staphylococcus aureus* avec des zones d'inhibition de 14.33 ± 0.29 mm, 13.17 ± 0.76 mm et 14.17 ± 0.29 mm respectivement.

Mot clés : *Rhamnus alaternus* L. ; métabolites secondaires ; extrait méthanolique ; activité antioxydante ; activité antimicrobienne.

ABSTRACT

Our work concerns the extraction and the identification of some secondary metabolites of *Rhamnus alaternus* L. as well as the study of its antioxidant and antimicrobial effects. *Rhamnus alaternus* L.

The phytochemical screening of the leaves which was performed by the plant enabled us to identify tannins, flavonoids, anthracene derivatives, saponins and alkaloids. A methanol extract was obtained by using soxhlet apparatus. Total polyphénols and flavonoids contained in the extract were measured and revealed an important quantity of total polyphénols and flavonoids evaluated to 664, 10 ± 8,89 mg EAG/g extract and 158,07 ± 3,57 mg EQ/g extract respectively.

The methanolic extract revealed an antioxidant activity towards DPPH with an inhibitory concentration to 50 % (IC₅₀) estimated to 0,435 ± 0.08 mg/ml. The methanolic extract showed a significant antimicrobial effect only on *Echerichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Staphylococcus aureus* with zones of inhibition of 14.33 ± 0.29 mm, 13.17 ± 0.76 mm and 14.17 ± 0.29 mm respectively.

Key words: *Rhamnus alaternus* L. ; secondary metabolites ; methanolic extract ; antioxidant activity ; antibacterial activity.

ملخص

اهتمنا في عملنا هذا باستخراج وصف بعض المركبات الثانوية ودراسة الأثر المضاد للأوكسدة و الجراثيم للنبتة، *Rhamnus alaternus L*.

الغرلة الفيتو كيميائية لأوراق النبتة أظهرت وجود الدباغ ،البوليفينول ، الفلافونويدات ، مشتقات الانتراسين و القلويدات.

و تم استخراج مستخلص الميثانولي باستعمال جهاز السوكسلت . ثم تم تكميم محتوى هذا المستخلص من المركبات البوليفينول و الفلافونويدات.

بينت النتائج ان المستخلص الميثانولي غني بهذه المركبات وقدر ذلك بـ $89,8 \pm 10,664$ مغ معادل حمض الغاليك /غ مستخلص و $3,57 \pm 158,07$ مغ معادل كارستين/غ مستخلص على الترتيب.

اظهر المستخلص الميثانولي نشاط مضاد للأوكسدة بواسطة طريقة منع الجذر الحر DPPH المقدره بـ $0,435 \pm 0,08$ مغ / مل . تم أيضا تقييم الفعل المضاد للجراثيم للمستخلص و أظهرت النتائج انه يثبط فقط 3 جنوات بكتيرية *Echerichia coli* و *Citrobacter freundii* و *Staphylococcus aureus* وقدرت أقطار التثبيط بـ $14,33 \pm 29,0$ مم $13,17 \pm 76,0$ مم و $17,14 \pm 0,29$ مم على الترتيب.

كلمات المفتاح : *Rhamnus alaternus L* . مليس ، مركبات ثانوية ، مستخلص الميثانولي ، نشاط مضاد للأوكسدة ، نشاط مضاد للجراثيم

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements au Pr F. SAIDI qui fut pour moi une promotrice attentive et disponible malgré ses nombreuses charges. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris.

J'exprime également mes sincères remerciements au Pr D. GUETARNI d'avoir accepté de présider le jury de soutenance et d'examiner mon travail.

Je tiens à remercier Dr M.S. HAMAI et Pr N. SMAIL-SAADOUN qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce modeste travail.

Je ne saurais oublier mes amies, sœurs et camarades S. BENTOURA, L. ALI ABDESSAMED, Y. MELZI, N. AIZER et N. ABD LATIF. Leur soutien moral et leur compréhension ont davantage compté pour moi que je ne saurais l'exprimer. Qu'ils trouvent tous ici l'expression de ma reconnaissance et de ma tendresse.

Je souhaite remercier les responsables du laboratoire de post graduation de biotechnologies végétales et du laboratoire des biotechnologies liées à la reproduction animale de l'université de Blida 1.

Je désire en outre remercier tous les membres du laboratoire des analyses biologiques de l'EPSP de Ouled Yaich pour leur soutien et leur patience tout au long de la thèse en particulier à M^{me} Baghdadi et M^{elle} Chicha.

Je remercie tous les enseignants du département de biologie et d'agronomie, qui ont contribué à ma formation et toutes les personnes qui ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

DEDICACES

Je dédie ce travail

A mes parents, qui m'ont encouragé tout au long de mes études

A mon mari pour son soutien, sa confiance et sa patience sans

limites

A ma sœur et mon frère

A ma famille et ma belle-famille

A mes amies

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
ABSTRACT	2
ملخص	3
REMERCIEMENTS	4
DEDICACES	5
TABLE DES MATIERES	6
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	8
INTRODUCTION	10
BIBLIOGRAPHIE	12
1.1 Les plantes médicinales	12
1.1.1 Généralités	Erreur ! Signet non défini.
1.1.2 Les métabolites secondaires	12
1.1.3 Les principales familles de métabolites secondaires	13
1.2 Étude de la plante : Nerprun alaterne <i>Rhamnus alaternus</i> L.	19
1.2.1 Généralités	19
1.2.2 Systématique	19
1.2.3 Appellation et étymologie	19
1.2.4 Répartition géographique	20
1.2.5 Description botanique de la plante	20
1.2.6 Culture et exigences	23
1.2.7 Parties utilisées	23
1.2.8 La multiplication	23
1.2.9 Propriétés thérapeutiques	23
1.2.10 Les principes actifs	23
1.2.11 Effets secondaires et précaution d'emploi	23
1.3 Activité antioxydante des polyphénols	24
1.3.1 Les radicaux libres	24
1.3.2 Définition stress oxydatif	24
1.3.3 Les antioxydants	25
1.4 Activité antimicrobienne	26
1.4.1 Les antibiotiques	26
1.4.2 Activité antimicrobienne des polyphénols	27
MATERIEL ET METHODES	30

2.1Matériel	30
2.1.1Matériel biologique	30
2.2Méthodes	32
2.2.1Identification botanique de la plante	33
2.2.2Analyses phytochimiques de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	34
2.2.3Screening phytochimique	35
2.2.4Extraction au soxhlet	41
2.2.5Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes	42
2.2.6Etude des activités biologiques	44
RESULTATS ET DISCUSSION	51
3.1Résultat de l'étude microscopique	51
3.1.1Structure de la tige	51
3.1.2Structure de la feuille	53
3.2Résultat des analyses phytochimiques	54
3.2.1La teneur en eau	54
3.2.2Le taux humidité de la poudre	55
3.2.3Les cendres	56
3.3Résultat du screening phytochimique	56
3.3.1Groupes chimiques caractérisés	56
3.4Résultat de l'extraction au soxhlet	59
3.4.1Caractéristiques organoleptiques des extraits	59
3.4.2Rendement de l'extraction	59
3.5Résultats du dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes	59
3.5.1Les polyphénols totaux	59
3.5.2Les flavonoïdes	61
3.6Résultats de la mise en évidence de l'activité antioxydante	62
3.7Résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne	65
CONCLUSION	73
REFERENCES	75
APPENDICES	86
GLOSSAIRE	97

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

<u>Figure 1.1 : Structure de base des flavonoïdes</u>	15
<u>Figure 1.2: Structure chimique des acides gallique et ellagique</u>	16
<u>Figure 1.3 : Structure des tanins condensés</u>	16
<u>Figure 1.4: Structures de base des quinones naturelles</u>	17
<u>Figure 1.5: Exemples d'alcaloïdes utilisés pour leurs activités biologiques</u>	18
<u>Figure 1.6: Structure générale des saponosides</u>	18
<u>Figure 1.7: Représentation de l'espèce <i>Rhamnus alaternus</i> L.</u>	21
<u>Figure 1.8 : Feuille de <i>Rhamnus alaternus</i> L.</u>	22
<u>Figure 1.9: Fleurs de <i>Rhamnus alaternus</i> L.</u>	22
<u>Figure 1.10: Fruits de <i>Rhamnus alaternus</i> L.</u>	22
<u>Figure 2.1: Situation géographique de la station</u>	31
<u>Figure 3.1 : Vue d'ensemble de la coupe transversale de la tige de <i>Rhamnus alaternus</i> L. vue au MP Gx10 après double coloration</u>	51
<u>Figure 3.2: Coupe transversale de la tige de <i>Rhamnus alaternus</i> L.</u>	52
<u>Figure 3.3: Poil épidermique tecteur de la tige de <i>Rhamnus alaternus</i> L.</u>	53
<u>Figure 3.4 : Coupe transversale de la feuille de <i>Rhamnus alaternus</i> L.</u>	54
<u>Figure 3.5 : Teneur en eau</u>	55
<u>Figure 3.6 : Le taux des cendres</u>	56
<u>Figure 3.7 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique</u>	60
<u>Figure 3.8 : Courbe étalonnage de la quercétine</u>	61
<u>Figure 3.9 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour MeOH de <i>Rhamnus alaternus</i> L.</u>	63
<u>Figure 3.10 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour la quercétine</u>	63
<u>Figure 3.11: Pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour la rutine</u>	64
<u>Figure 3.12 : Diamètres des zones d'inhibition des bactéries sensibles au MeOH</u>	67

<u>Figure 3.13 : Les différentes ZI de croissance de MeOH et de l'infusé sur quelques souches bactériennes testées</u>	68
<u>Figure 3.14 : Effet des antibiotiques et du DMSO sur les bactéries étudiées</u>	69
<u>Figure 3.15 : Effet des antibiotiques sur les bactéries étudiées</u>	70
<u>Tableau 1.1:Classification des familles des composés phénoliques</u>	14
<u>Tableau 1.2: Classification des composés phénoliques à activité antimicrobienn</u>	29
<u>Tableau 2.1: Lieu de récolte de <i>Rhamnus alaternus</i> L. et caractéristiques géographiques</u>	30
<u>Tableau 2.2: Les souches microbiennes testées</u>	32
<u>Tableau 3.1 : Résultats des pesées de la teneur en eau après dessiccation pendant 48H</u>	54
<u>Tableau 3.2: Résultats des pesées du taux d'humidité après dessiccation 72H</u>	55
<u>Tableau 3.3 : Teneur en cendres de <i>Rhamnus alaternus</i> L.</u>	56
<u>Tableau 3.4 : Groupes chimiques dans les feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.</u>	57
<u>Tableau 3.5 : Caractéristiques organoleptiques des concrètes des feuilles</u>	59
<u>Tableau 3.6 : Pourcentage d'inhibition et les IC50 obtenus</u>	64
<u>Tableau 3.7 : Comparaison de la IC 50 de MeOH avec d'autres travaux</u>	65
<u>Tableau 3.8 : Diamètres des ZI (en mm) obtenus le cas des bactéries Gram ⁻</u>	66
<u>Tableau 3.9 : Diamètres des ZI (en mm) obtenus le cas des bactéries Gram⁺</u>	67
<u>Tableau 3.10 : Diamètres de la ZI en mm en présence des antibiotiques</u>	69

INTRODUCTION

La valorisation des ressources naturelles est une préoccupation qui devient de plus en plus importante dans de nombreux pays. Ainsi, depuis son assemblée générale, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande l'évaluation de l'innocuité et de l'efficacité des médicaments à base des plantes en vue de standardiser leur usage et les intégrer dans les systèmes de soins conventionnels [1].

En effet, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal. Et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces qui dans la plupart des cas sont dénuées de tout effet adverse. Les nombreuses études ont mis en évidence la présence de métabolites secondaires doués d'activités biologiques telles que les polyphénols, les alcaloïdes et les terpènes [2].

L'Algérie de par son climat et la nature de ses sols, possède une flore particulièrement riche en plantes médicinales et aromatiques dont la plupart existe à l'état spontané [3]. Parmi les plantes médicinales se trouve l'espèce *Rhamnus alaternus* L., communément appelée nerprun alaterne. Une plante largement utilisée en médecine traditionnelle. Le choix de la plante étudiée repose simplement sur une tradition ancestrale d'utilisation et il n'y a que peu de recherches scientifiques qui expliquent son mode d'action. C'est pourquoi il semble important de s'intéresser à l'étude de cette plante. La question posée serait : la caractérisation de ces métabolites permet-elle d'avoir une idée sur ses propriétés phytothérapeutiques

Dans le cadre des activités de recherche du laboratoire de recherche des biotechnologies, environnement et santé de l'université de Blida 1, notre travail a pour but de contribuer à la valorisation de la flore algérienne. Nous nous sommes intéressés à l'évaluation des activités phytothérapeutiques comme antioxydante et antimicrobienne de *Rhamnus alaternus* L.

Nous avons mené une recherche qui consiste à :

- ✓ L'identification botanique de la plante étudiée,
- ✓ la détermination des différentes classes chimiques par screening phytochimique,
- ✓ l'extraction des composés phénoliques en utilisant la technique d'extraction par l'appareil de soxhlet,
- ✓ dosage des polyphénols et des flavonoïdes contenus dans l'extrait méthanolique,
- ✓ étude des activités biologiques portant sur l'effet antioxydant par la méthode du piégeage du radical libre DPPH ainsi que l'effet antimicrobien vis-à-vis sept souches microbiennes par la méthode de diffusion sur l'agar.

CHAPITRE 1

BIBLIOGRAPHIE

1.1 Les plantes médicinales

1.1.1 Introduction

Une plante médicinale est définie comme une plante dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. L'utilisation de la plante entière est peu fréquente. Le plus souvent une seule partie est utilisée. Elle concerne la racine, la feuille, la fleur ou la graine. Cette partie, fraîche ou desséchée, est appelée drogue végétale [4] ; [5].

Plusieurs drogues végétales issues d'une même espèce pourront être utilisées en phytothérapie : dans ce cas elles auront souvent des indications distinctes, en raison de la composition chimique différente [5].

Environ 35 000 espèces de plantes sont utilisées dans le monde à des fins médicinales. Elles constituent le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne [6].

1.1.2 Les métabolites secondaires

Une des originalités majeures des plantes réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires (glucides, protéides et lipides), les végétaux accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représente une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire [7].

Les métabolites secondaires sont d'une variété structurale extraordinaire. Ils sont produits en faible quantité. Ces métabolites marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique [8].

1.1.3 Les principales familles de métabolites secondaires

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques très variés parmi eux, les composés phénoliques, les terpènes, les stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités biologiques [7]. Quelques exemples représentatifs sont présentés ci-après.

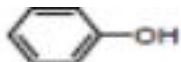

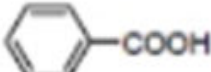
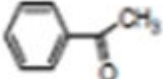
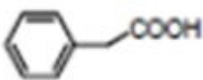
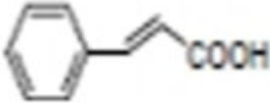
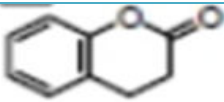

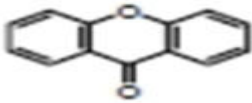


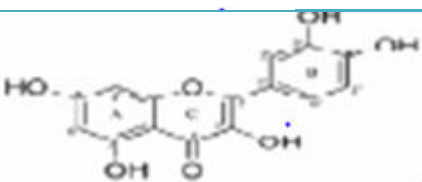
1.1.3.1 Les composés phénoliques

De très nombreux composés phénoliques ont été caractérisés à ce jour. Ils ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (Tableau 1.1). Ils peuvent être répartis en plusieurs classes, selon la complexité de leur squelette de base, du degré de modification de ce squelette et des liaisons possibles de ces composés avec d'autres molécules [7] ; [9].

Les composés phénoliques sont issus de deux grandes voies d'aromogénèse : La voie la plus courante est celle de l'acide shikimique. L'autre voie est la voie acétate- malonate [4].

Tableau 1.1:Classification des familles des composés phénoliques [10]

Nombre de Carbone	Classe	Structure chimique	Sources
-------------------	--------	--------------------	---------

C6	Phénols simples		Céréales, abricot, banane, chou-fleur
	Benzoquinones		
C6-C1	Acide benzoïque		
C6-C2	Acétophénones		
	Acide phénylacétique		
C6-C3	Acide cinnamique		Carotte, tomate, céréales, aubergine
	Coumarine		Carotte, céleri, citron, persil
C6-C4	Naphthoquinones		Abricot
C6-C1-C6	Xanthones		Mangue
C6-C2-C6	Stilbènes		Raisin
	Anthraquinones		
C6-C3-C6	Flavonoïdes		Largement distribués
(C6-C1)_n	Tanins hydrolysables	Polymère hétérogène composé d'acides phénoliques et de sucres simples	Grenade, framboise

1.1.3.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont formés d'un squelette à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), soit deux noyaux aromatiques (A et B) et un hétérocycle oxygéné (cycle C) (Figure 1.1) [11] ; [12]. Ce sont des composés responsables des colorations

jaune, orange et rouge des végétaux. Ils se subdivisent en différentes classes dont on peut citer les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanoïdes, les chalcones et les anthocyanes [11] ; [13] .

Nous les trouvons, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits [14]. Ils sont reconnus pour avoir un effet anti-inflammatoire, antioxydant, antiallergique, antithrombotique, antiviral et anti cancérigène [15].

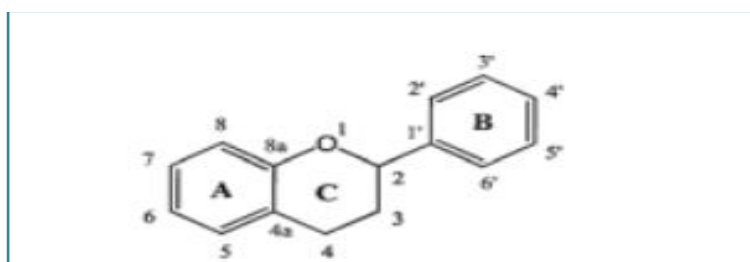


Figure 1.1 : Structure de base des flavonoïdes [11]

1.1.3.3 Les tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques hydrosolubles dont la masse moléculaire est comprise entre 500 et 3000. Ils ont la propriété de tanner la peau. Cette propriété est liée à leur aptitude à se combiner à des macromolécules (protéine, polysaccharides) [5].

Au plan thérapeutique, les tanins ont des propriétés astringentes prononcées. Ils sont utilisés, en usage externe, pour traiter les ulcères variqueux, les hémorroïdes, les engelures et les brûlures. En usage interne ils traitent la diarrhée et l'hypersécrétion des muqueuses intestinales [4]. Tous les organes végétaux peuvent renfermer des tanins (racines, écorces, feuilles). Toutefois nous notons une accumulation fréquente dans les organes âgés (écorces) et dans les tissus d'origine pathologique (galles). Leur teneur est souvent élevée (10 à 70 %) [5].

Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux groupes, tanins hydrolysables et tanins condensés:

a. Les tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables sont des oligo- ou poly-esters d'un sucre, en général le glucose, et de molécules d'acide-phénol. Ils sont classés selon la nature de l'acide-phénol : les tannins galliques possèdent un acide gallique. Alors que les tannins éllagiques ont un acide hexahydroxyphénique (Figure 1.2). Les tannins éllagiques sont obtenus suite à un couplage oxydatif entre les molécules d'acide gallique [16]. Ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par l'hydrolyse chimique (enzymatique) [17].

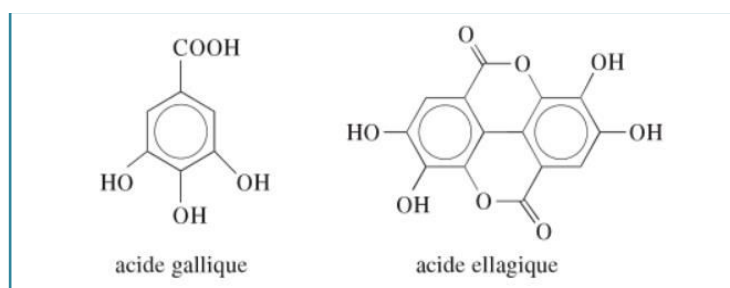


Figure 1.2: Structure chimique des acides gallique et ellagique [5]

b. Tannins condensés ou tannins catéchiques ou proanthocyanidols

Ils diffèrent 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 carbone-carbone [4]. (Figure 1.3).

Ces tanins ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide à chaud par rupture de la liaison inter monomérique [18].

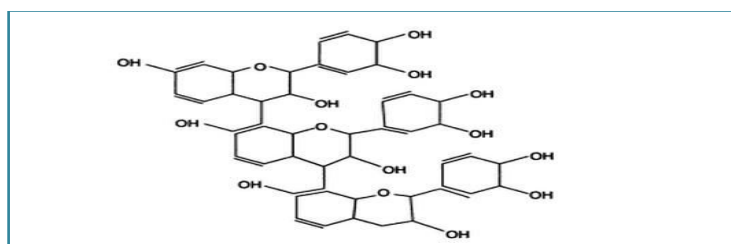


Figure 1.3 : Structure des tanins condensés [19]

1.1.3.4 Les quinones

Les quinones sont des composés oxygénés issues de l'oxydation des phénols. Quel que soit leur degré d'oxydation, ces composés ont en commun une

double hydroxylation en C-1 et C-8 (Figure 1.4). On peut citer les benzoquinones, les naphthoquinones, les anthraquinones [7] ; [20].

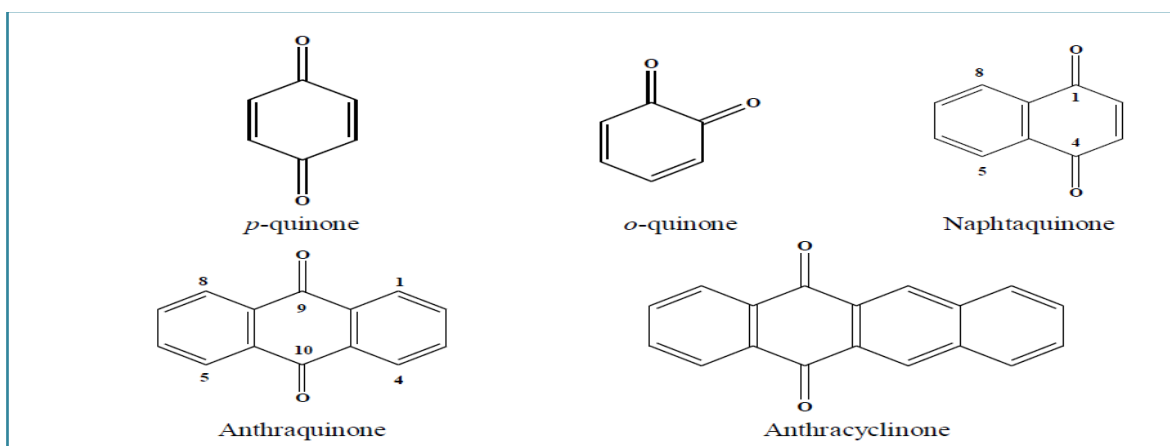


Figure 1.4: Structures de base des quinones naturelles [21]

Certaines quinones, dérivant de l'antraquinone, sont des laxatifs stimulants. Elles sont présentes dans la bourdaine (*Rhamnus frangula L.*), les sénéés (*Cassia spp.*) et les aloès (*Aloe spp.*). Elles ont des activités antidépressives, anti-protazoaires, antivirales, antibactériennes, fongicides et antiallergiques. Toutefois plusieurs molécules de ce groupe ont une toxicité non négligeable [4] ; [22].

1.1.3.5 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un groupe de composés azotés faiblement basiques [23]. Ils possèdent des structures hétérocycliques (Figure 1.5). Environ 20% des espèces de plantes produisent des alcaloïdes [24].

Les propriétés médicamenteuses des alcaloïdes font de ce groupe de métabolites secondaires un intérêt particulier. Au niveau du système nerveux central ils agissent comme dépresseurs (morphine, scopolamine) ou comme stimulants (caféine, strychnine). Certains jouent le rôle d'anesthésiques locaux (cocaïne) et d'antipaludiques (quinine) [23].

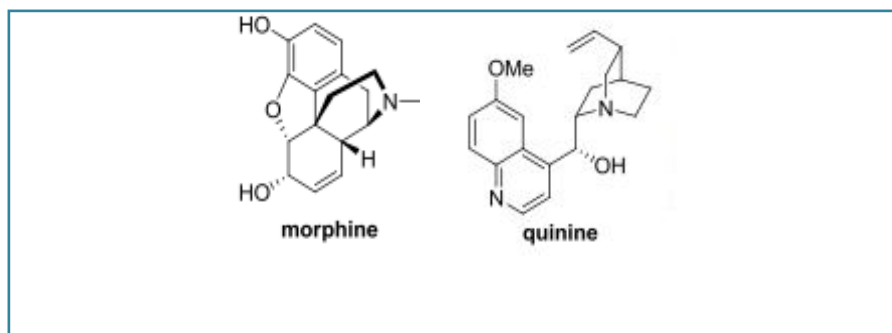


Figure 1.5: Exemples d'alcoïdes utilisés pour leurs activités biologiques [25]

1.1.3.6 Les saponosides

Les saponosides ou saponines (Figure 1.6) sont des hétérosides de stérols ou de triterpènes dont les solutions aqueuses ont des propriétés tensioactives et un pouvoir moussant. Ils libèrent par hydrolyse un ou plusieurs oses et une génine appelée sapogénine [26].

Les saponosides sont utilisés en thérapeutique pour leurs propriétés anti-inflammatoires, antivirales, antifongiques, antibactériennes, cicatrisantes, expectorantes, antispasmodiques et diurétiques et en tant que protecteurs veineux [5].

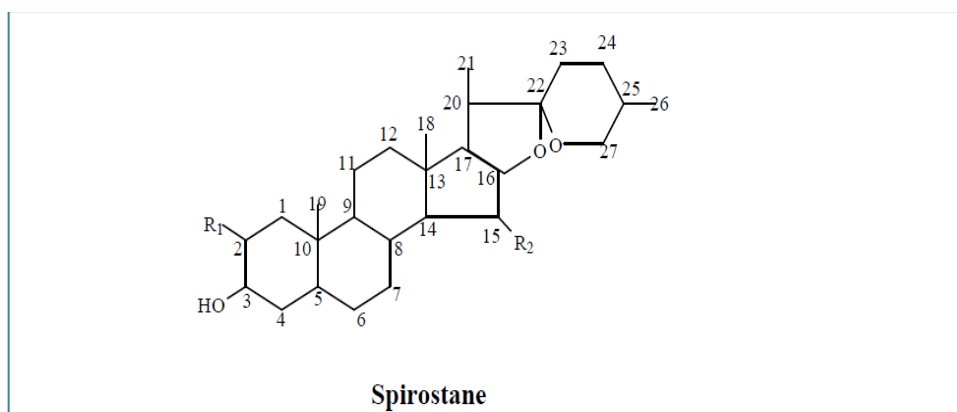


Figure 1.6: Structure générale des saponosides [27]

1.2 Étude de la plante : Nerprun alaterne *Rhamnus alaternus* L.

1.2.1 Généralités

Les nerpruns appartiennent à la famille des *Rhamnaceae* et plus précisément au genre *Rhamnus* regroupant environ 100 espèces d'arbustes de 1 à 10 m de haut. Ce sont des espèces originaires des régions subtropicales. Elles sont présentes principalement en Afrique et en Amérique du Sud [28] ; [29].

1.2.2 Systematique

Règne	: <i>Plantae</i>
Sous-règne	: <i>Tracheobionta</i>
Embranchement	: <i>Magnoliophyta</i>
Classe	: <i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	: <i>Rosidae</i>
Ordre	: <i>Rhamnales</i>
Famille	: <i>Rhamnaceae</i>
Genre	: <i>Rhamnus</i>
Genre et espèce	: <i>Rhamnus alaternus</i> L.

[30]

1.2.3 Appellation et étymologie

Le nom de genre '**Rhamnus**' vient du grec **rabdos** qui signifie baguette, en référence à la flexibilité des rameaux [31].

Le nom vernaculaire « **Nerprun** » est une déformation de « noirprun », dérivé du latin populaire *niger Prunus*, prunier noir, qui évoque l'aspect de l'arbuste et la couleur de ses fruits. Il est exact que le nerprun cathartique, *Rhamnus cathartica*, ressemble beaucoup au prunellier épineux, *Prunus spinosa* [32] ; [33].

- Le nom commun : Nerprun alaterne, alaterne, Sanguin blanc,
- Le nom vernaculaire arabe : Qaced, Aoud el kheir, Méliles, ouchbat safar,
- Le nom targui ou berbère : Ajroudj, khalis n'imidekh, Amliles [34] ; [31] ; [35].

D'autres appellations à travers l'Europe sont attribuées au *Rhamnus alaternus* L. Telles que :

- *En anglais: Buckthorn ;*

- *En Allemand: Kreülzdorn ;*
- *En Espagnol: Aladierna, Cosco Unia, Sanguino de Andalucia ;*
- *En Italien: Alaterno, Legno Puzzo [36].*

1.2.4 Répartition géographique

Le nerprun alaterne se trouve en France, Portugal, Espagne, ex-Yougoslavie, Albanie, Grèce, Italie, Turquie, Israël, Libye, Tunisie, Algérie, Maroc et Ukraine [32]. (Appendice B)

L'alaterne caractérise les fourrés méditerranéens sempervirents [37]. Il est très connu dans le tell Algérien. Il évolue dans les forêts, les rocailles, les zones côtières, les garrigues et les coteaux calcaires bien ensoleillés [37].

1.2.5 Description botanique de la plante

C'est un arbrisseau haut de 3 à 5 m. Les rameaux sont alternes, glabres et non épineux [38].

Les feuilles

Les feuilles sont persistantes et luisantes. Elles peuvent être entières à fortement dentées [39] (Figures 1.7 , 1.8). La disposition des feuilles fluctue en fonction de l'âge des rameaux qui les portent : opposées sur les plus jeunes, alternes sur les autres [38]. Les nervures sont peu saillantes (4 à 6 de chaque côté de la nervure principale) [32].

Les fleurs

Les fleurs sont petites et unisexuées. Elles sont de couleur vert-jaunâtre [40] (Figure 1.9). Elles sont groupées en petits glomérules terminaux. Elles possèdent des pétales très petits ou nuls [38]. Le calice à 5 lobes lancéolés. Ces lobes sont réfléchis dans les fleurs mâles et ils sont dressés dans les fleurs femelles [32]. Les fleurs mâles ont 4 étamines [38].

Le fruit

Les fruits sont des baies, de couleur rouge au préalable ensuite elles deviennent noires [32] (Figure 1.10).

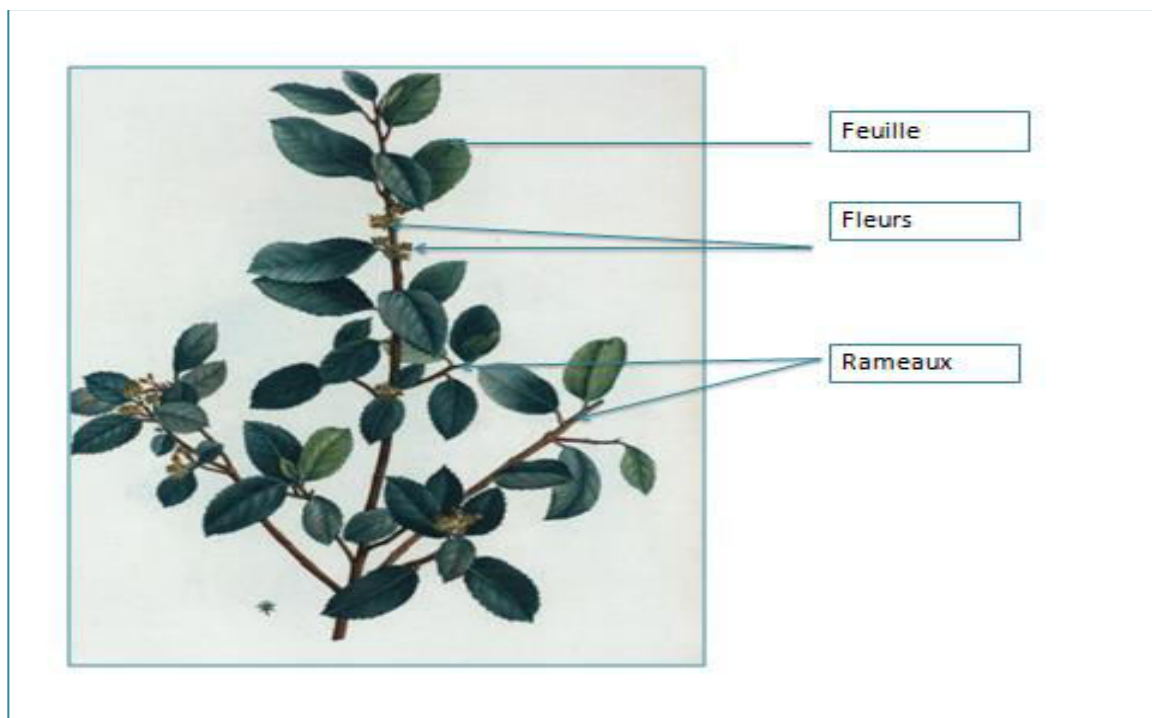


Figure 1.7: Représentation de l'espèce *Rhamnus alaternus* L. [28]

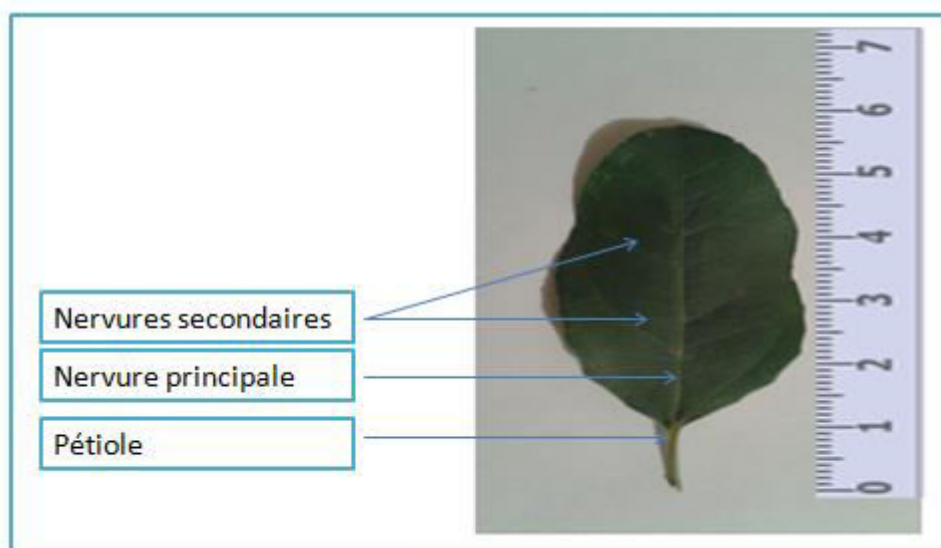


Figure 1.8 : Feuille de *Rhamnus alaternus* L. (Originale)



Figure 1.9: Fleurs de *Rhamnus alaternus* L. (Originale)

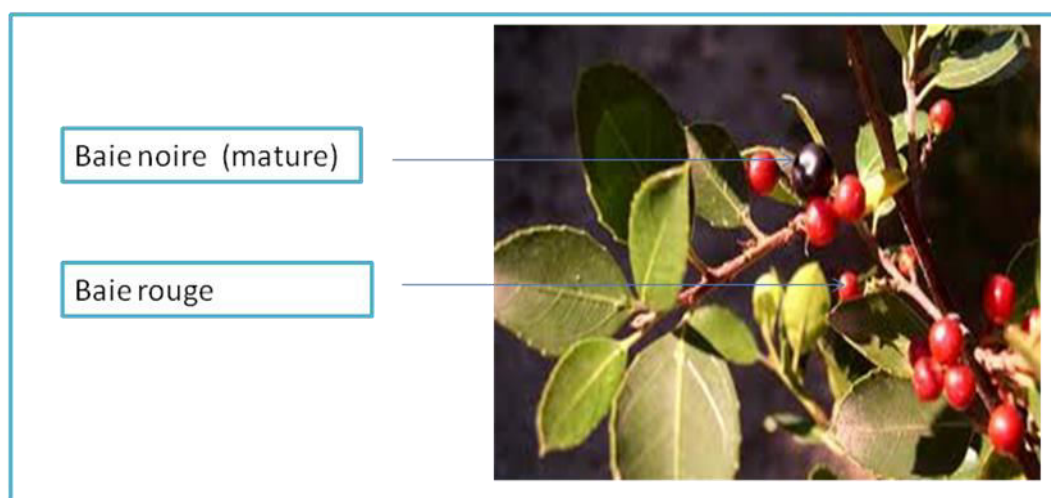


Figure 1.10: Fruits de *Rhamnus alaternus* L. [41]

1.2.6 Culture et exigences

- *Rhamnus alaternus* L. tolère la sécheresse et les conditions défavorables. C'est une plante qui colonise le sol car elle est buissonnante que l'on peut cependant tailler [41].
- *Climat* : Elle résiste moyennement au froid. C'est une plante héliophile qui n'évolue de manière optimale qu'en pleine lumière [42].
- *Floraison* : Elle se situe en mars- avril [32].
- *Fructification* : Elle se situe entre les mois d'octobre à novembre [32].

1.2.7 Parties utilisées

Les feuilles, les tiges, l'écorce et les baies de *Rhamnus alaternus* L. sont utilisées en phytothérapie [32].

1.2.8 La multiplication

Rhamnus alaternus L. se multiplie par voie sexuée, comme il peut se multiplier par marcottage, bouturage, greffage d'une espèce sur une autre ou par semis [43].

1.2.9 Propriétés thérapeutiques

La plante *Rhamnus alaternus* L. est surtout utilisée pour ses propriétés laxatives, purgatives et astringentes. La décoction des parties aériennes de cette plante semble être efficace pour le traitement de l'ictère [32] ; [32] ; [44].

1.2.10 Les principes actifs

Les baies, les feuilles et l'écorce de *Rhamnus alaternus* L. sont riches en principes actifs. Principalement en dérivés anthracéniques, flavonoïdes, glucosides, alcaloïdes et en tanins [31].

1.2.11 Effets secondaires et précaution d'emploi

Rhamnus alaternus L. possède des baies toxiques, émétiques et purgatives. Pour une action médicale simplement purgative, le jus doit être cuit afin d'éliminer les symptômes du vomissement. Les noyaux sont aussi toxiques [45].

Le nerprun ne doit pas être utilisé pendant la grossesse ou la lactation (le laxatif peut être transféré au nourrisson) [46].

1.3 Activité antioxydante des polyphénols

1.3.1 Les radicaux libres

Les radicaux libres sont définis comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe [47]. Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique [48].

Du fait de leur caractère très électrophile, les espèces radicalaires vont tenter de rattraper leurs électrons célibataires. Elles agressent toute molécule susceptible de se faire arracher un électron [49]. L'espèce agressée devient à son tour radicalaire initiant de cette façon un processus de réaction en chaîne. Ce processus se caractérise par trois étapes ; (i) initiation, (ii) propagation et (iii) terminaison provoquant enfin une perturbation de la cellule vivante [48].

Parmi les espèces radicalaires les plus intéressantes se trouvent les espèces réactives de l'oxygène (ERO) : le radical superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), et aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxydinitrite ($ONOO^-$) [47]. (Appendice C) Ces ERO sont dotées de propriétés oxydantes qui les amènent à réagir, dans l'environnement où elles sont produites, avec toute une série de substrats biologiques (lipides, protéines, ADN, glucose) [50].

1.3.2 Définition stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des ERO et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs [51].

1.3.3 Les antioxydants

Pour contourner les dommages causés par les ERO, la cellule fait appel à des systèmes de défense appelés antioxydants. Un antioxydant est défini comme toute substance ayant la capacité de retarder, prévenir ou réparer un dommage oxydatif d'une molécule cible [52]. Ainsi, les antioxydants servent à contrôler le niveau des espèces réactives pour minimiser le dommage oxydatif [53].

Ces mécanismes de défense peuvent se résumer à :

- Des systèmes enzymatiques spécifiques ou endogènes (la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase) ;
- des antioxydants non enzymatiques ou exogènes (la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes et les polyphénols) [54].

1.3.3.1 Les polyphénols antioxydants

Plusieurs études épidémiologiques ont montré qu'il y a un rapport inverse entre la prise d'aliments riches en polyphénols (les fruits et les légumes) et le risque des maladies liées à l'âge comme les maladies neurodégénératives [55].

Selon HALLIWELL [56], KETSAWATSAKUL ET *al.*, [57] et GULCIN ET *al.*, [58], les composés phénoliques exercent une activité antioxydante via plusieurs mécanismes:

- ✚ Le piégeage direct des ERO ;
- ✚ l'inhibition des enzymes génératrices d'EOR;
- ✚ la chélation des ions de métaux de transitions responsables de la production des ERO ;
- ✚ l'induction de la biosynthèse d'enzymes antioxydantes.

Parmi les polyphénols doués d'activité antioxydante nous citons :

Les flavonoïdes

Une importance particulière a été accordée aux propriétés antioxydantes des flavonoïdes. Cette importance est liée à leur propriété de donation d'atomes d'hydrogène disponibles dans les substituants hydroxyles de leurs groupes phénoliques [59]. Leur capacité de donation d'hydrogène augmente avec l'augmentation de l'hydroxylation de leurs cycles phénoliques. Cette caractéristique structurale peut être observée dans les flavonoles comme le kaempférol, la quercétine et la myricétine. L'activité antioxydante est croissante en fonction du nombre des groupements OH dans la molécule [60]._Les flavonoïdes exercent des effets antioxydants aussi par la chélation des ions métalliques [61].

Les tanins

Les tanins inhibent la peroxydation lipidique des mitochondries du foie et des microsomes. Ils sont également responsables de l'oxydation de l'acide ascorbique et du linoléate lors de la peroxydation. Les tannins donnent des protons face aux radicaux libres c'est ainsi que des radicaux tanniques stables sont formés. Ce qui permet de stopper la réaction en chaîne de l'auto-oxydation lipidique [62].

Les coumarines

Elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires. Elles peuvent capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes [63].

Les phénols

Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants [63].

1.4 Activité antimicrobienne

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques.

1.4.1 Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances antibactériennes produites par des micro-organismes (champignons et bactéries) ou de synthèse chimique [64]. Ils ont la capacité soit de détruire les bactéries (effet bactéricide), ou d'inhiber leur croissance (effet bactériostatique) [65].

Les antibiotiques peuvent être classés selon l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action [64]. Les principales familles chimiques des antibiotiques sont: Bêtalactamines: pénicilline et céphalosporines; Aminosides: streptomycine, gentamycine; chloramphénicol et thiamphénicol; cyclines: tétracyclines, doxycycline ; macrolides et apparentés : érythromycine, oléandomycine [66].

Leur prescription à grande échelle est parfois inappropriée car elle peut entraîner l'apparition de souches multirésistantes. D'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base de plantes [67].

1.4.2 Activité antimicrobienne des polyphénols

Les polyphénols sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases). D'autres interactions peuvent inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et l'enveloppe cellulaire [68].

En effet certaines **quinones** présentent un effet bactériostatique sur les bactéries à Gram positif mais pas vis-à-vis des bactéries à Gram négatif [69]. **Les acides-phénols** ont des propriétés antiseptiques urinaires, antifongiques et antibactériennes [4].

Des études ont montré que les **coumarines** exercent plusieurs activités antimicrobiennes [70]. Elles permettent l'inhibition de la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* et de la germination des spores d'*Aspergillus niger*. Elles sont plus efficaces contre les Gram positif [71].

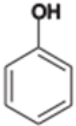
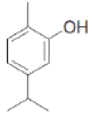
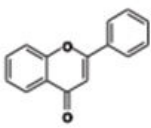
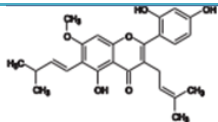
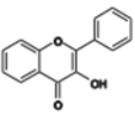
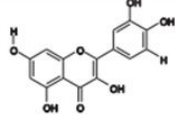
Selon ALAN ET MILLER [72] et MARFAK [73], **les flavonoïdes** avec leurs différentes classes: les flavones, flavonols, flavonones, flavonones 3-oles, flavanes-3,4 dioles, et les anthocyanidines ont un grand potentiel antibactérien :

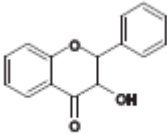
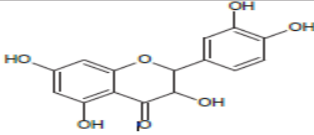
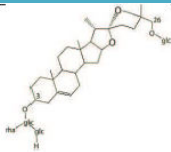
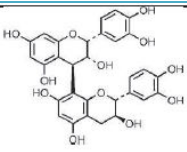

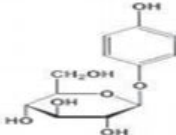
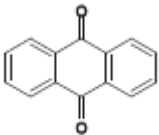
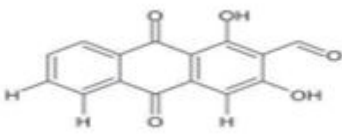
- ✚ en se complexant avec des composants des parois, ils inhibent la croissance microbienne,
- ✚ en perturbant leurs métabolismes énergétiques.

Les tanins : l'activité antimicrobienne des tanins est importante. La croissance de plusieurs bactéries, virus, champignons et levures est inhibée par les tanins. Cette activité serait due à leur capacité à se complexer aux protéines de transport [74].

Le tableau 1.2 représente les différents groupes de composés phénoliques ayant une activité antimicrobienne décrite.

Tableau 1.2: Classification des composés phénoliques à activité antimicrobienne [74]

Groupe	Sous-groupe	Structure de base	Exemple d'antimicrobien	Origine
Phénol simple			 Carvacrol	antifongique, isolé de <i>Satureja hortensis</i> L.
Flavonoïdes	Flavone		 Artocarpin	Antibactérien isolé de <i>Artocarpus heterophyllus</i>
	Flavonone		 Quercétin	antiparasitaire, isolé de <i>Morinda morindoides</i>

	Flavononol			antibactérien isolé de <i>Mimusops elengi</i> L.
Saponines				antibactérien, isolé de <i>Avena sativa</i> L.
Tanins				antibactérien, isolé de <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.
Quinones	Benzoquinone			antibactérien, isolé de <i>Pyrus</i> spp
	Anthraquinone			antifongique, isolé de <i>Morinda lucida</i>

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1 Matériel

2.1.1 Matériel biologique

2.1.1.1 Matériel végétal : Source et conservation

La plante étudiée *Rhamnus alaternus* L., a été récoltée au mois d'octobre 2013 dans la station de Cherkia, commune de Bouarfa wilaya de Blida, Algérie (Figure 2.1). La situation géographique de la station de récolte est représentée dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1: Lieu de récolte de *Rhamnus alaternus* L. et caractéristiques géographiques (Original)

Plante	Station	Période de récolte	Partie étudiée	Longitude (Ouest) (m)	Latitude (Nord) (m)	Altitude (m)
<i>Rhamnus alaternus</i> L.	Cherkia	Octobre (2013)	Les feuilles	4025455.67	480803.03	450



Figure 2.1: Situation géographique de la station de récolte (Original)

Les feuilles de *Rhamnus alaternus* L., fraîchement récoltées, sont lavées et séchées à l'ombre dans un endroit sec et aéré. Ensuite, elles sont conservées dans des sacs propres. Une quantité de feuilles est récupérée à l'état frais pour la mesure de la teneur en eau.

2.1.1.2 Matériel microbiologique

Sept souches microbiennes référencées ATCC (American Type Culture Collection) ont été choisies pour leur pathogénicité. (Appendice D) Elles sont représentées dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2: Les souches microbiennes testées (Originale)

Nom de la souche	N° ATCC	Gram
<i>Staphylococcus aureus</i>	28923	+
<i>klebsiella pneumoniae</i>	700603	-
<i>Echerichia coli</i>	25922	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27859	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	13311	-
<i>Citrobacter freundii</i>	8090	-
<i>Candidas albicans</i> (ascomycète)	1023	

2.2 Méthodes

Nos expérimentations ont été réalisées sur une durée d'une année, du mois d'Octobre 2013 au mois d'Octobre 2014. Elles ont été effectuées au niveau du :

- Laboratoire de recherche biotechnologies, environnement et santé du département de biologie, université de Blida 1 ;
- Laboratoire des ressources naturelles de l'université de Mouloud Mammeri, université de Tizi-Ouzou ;
- laboratoire des biotechnologies liées à la reproduction animale du département de vétérinaire de l'université de Blida 1 ;
- laboratoire de biotechnologie des reproductions végétales du département d'agronomie de l'université de Blida 1.

2.2.1 Identification botanique de la plante

L'identification botanique de l'espèce a été réalisée au niveau :

- Du laboratoire de botanique du département d'agronomie de l'université de Blida 1,
- École Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA) d'El Harrach au niveau du laboratoire de botanique.

2.2.1.1 Aspect microscopique

Des coupes histologiques sont réalisées sur les tiges et les feuilles de *Rhamnus alaternus* L. Pour cela nous avons utilisé la technique de la double coloration.

✓ Confection des coupes

Dans les organes végétaux (feuilles et tiges) fraîchement récoltés, des coupes transversales sont réalisées à la main à l'aide d'une lame de rasoir.

Les coupes ainsi préparées sont mises dans un creusé contenant de l'eau puis elles sont immergées successivement dans :

- L'eau de javel pendant 15 min, pour éliminer le contenu cellulaire,
- l'eau pendant 20 min pour le rinçage,
- l'acide acétique à 5% pendant 1 min, pour éliminer totalement l'eau de Javel et assurer la fixation du colorant sur la paroi,
- l'eau distillée pendant 20 min, pour le rinçage,
- le vert de méthyle pendant 10 min, pour la coloration des parois lignifiées,
- l'eau distillée pendant 20 min,
- le rouge Congo pendant 10 min, pour la coloration des parois pectocellulosique,
- l'eau pour un dernier rinçage des coupes.

Les coupes sont ensuite mises entre lame et lamelle pour l'observation au microscope photonique.

2.2.2 Analyses chimiques de *Rhamnus alaternus* L.

2.2.2.1 Détermination de la teneur en eau

Afin de déterminer la teneur en eau, une quantité de feuilles fraîches de masse $M_f = 1 \text{ g} \pm 0,0033$ a été séchée dans une étuve à 75°C jusqu'à obtention d'un poids constant [75].

La masse des feuilles séchées (M_s) a été déterminée à l'aide d'une balance de précision à $0,0001\text{g}$. La teneur en eau (T) a été calculée selon la formule suivante :

$$T = \frac{M_f - M_s}{M_f} \times 100$$

T : Teneur en eau en pourcentage

M_f : Masse fraîche de l'échantillon (g)

M_s : Masse sèche de l'échantillon (g)

2.2.2.2 Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité TH est déterminé par dessiccation d'1g de poudre sèche à 75°C jusqu'à poids constant [75].

Le pourcentage du taux d'humidité de la poudre est donné selon la formule suivante:

$$TH = \frac{\text{Masse drogue essai} - \text{Masse sèche}}{\text{Masse drogue essai}} \times 100$$

Où :

Masse drogue essai = Masse total avant dessiccation (g)

Masse sèche = Masse après dessiccation (g)

2.2.2.3 Détermination de la teneur en cendres

Les cendres d'un matériel biologique représentent les résidus inorganiques obtenus après calcination de la matière organique. Ces cendres généralement de

couleur blanchâtre donne une idée sur la quantité d'éléments minéraux présents dans l'aliment. En pratique, la calcination est réalisée dans un four à température comprise entre 450 et 550°C [76].

✓ Mode opératoire

Le dosage des cendres est effectué par incinération d' 1g d'échantillon sec dans un four à moufle à 550°C pendant 3 à 5 heures (jusqu'à obtention d'une poudre blanche). La matière organique correspond à la différence entre la prise d'essai et les cendres qui en résultent [77].

✓ Expression des résultats

Cette quantité est reportée à 100 g de plante sèche par la formule suivante :

$$\% \text{ cendres totales} = \frac{\text{masse de cendres}}{\text{masse drogue essai}} \times 100$$

Masse cendres = Masse total après calcination - Tare

Masse drogue essai = Masse total avant calcination – Tare

2.2.3 Screening phytochimique

Dans le but de caractériser les différents groupes chimiques contenus dans la plante étudiée des analyses qualitatives (marqué positive : + ou négative : -) ont été effectuées. Nous avons suivi les protocoles de DIALLO [63] et N'GUESSAN et *al.*, [78].

Le principe est basé sur la formation de complexes colorés en utilisant des réactions de coloration (conjugaison ou insaturation dans une molécule), ou sur la formation de complexes insolubles en utilisant des réactions de précipitation.

Cette étude permet de mettre en évidence la présence de quelques groupes chimiques (Tanins, flavonoïdes, alcaloïdes, saponines, dérivés anthracéniques).

2.2.3.1 Réaction de révélation des tanins

Dans le but de caractériser les tanins nous avons d'abord préparé un infusé à 5% :

✓ Préparation de l'infusé à 5%

- Introduction de 5 g de poudre sèche dans un bécher avec 100 ml d'eau distillée bouillante,
- après infusion pendant 15 mn, une filtration sur papier et un rinçage avec un peu d'eau chaude est réalisé de manière à obtenir 100 ml de filtrat. (Appendice G₁)

✓ Caractérisation des tanins par le chlorure ferrique

- Nous avons introduit dans un tube à essai 5 ml de l'infusé à 5% ; puis nous avons ajouté 1 ml d'une solution aqueuse diluée de FeCl₃ à 1%.
- ❖ En présence de tanins il se développe une coloration verdâtre ou bleu noirâtre.
 - Pour caractériser la présence de tanins catéchiques, nous avons ajouté 1ml d'acide chlorhydrique concentré à 5 ml d'infusé à 5%, puis nous avons porté à ébullition pendant 15 min et ensuite filtré sur papier.
- ❖ En présence de tanins catéchiques, il y a formation d'un précipité rouge soluble dans l'alcool amylique.

✓ Différenciation des tanins

La différenciation des tanins (catéchiques et galliques) est obtenue par la réaction de Stiasny :

➤ Précipitation par la réaction de Stiasny

- À 30 ml d'infusé à 5%, nous avons ajouté 15 ml de réactif de Stiasny (10 ml de formol à 40% plus 5 ml HCl concentré) et nous avons chauffé au bain-Marie à 90°C pendant 15 mn. L'obtention d'un précipité montre la présence de tanins catéchiques,
- ensuite nous avons filtré et saturé le filtrat d'acétate de sodium pulvérisé. Nous avons ajouté 1 ml d'une solution de FeCl_3 à 1%. Le développement d'une teinte bleu noire indique la présence de tanins non précipités par le réactif de Stiasny : Ce sont les tanins galliques.

2.2.3.2 Réaction de révélation des flavonoïdes

✓ Les anthocyanes

- A 5 ml d'infusé à 5%, nous avons ajouté 5 ml d'acide sulfurique puis 5 ml de NH_4OH .
- ❖ Si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu violacé en milieu basique, on peut conclure la présence d'anthocyane.

✓ La réaction à la cyanidine

- Nous avons introduit dans un tube à essai 5 ml d'infusé, ensuite nous avons ajouté 5 ml d'alcool chlorhydrique (alcool à 95°, eau distillée, HCl concentré à parties égales en volume) ; 1 ml d'alcool iso amylique puis quelques copeaux de magnésium. Il se produit une réaction de crépitation pendant quelques minutes.
- ❖ L'apparition d'une coloration rose orangée (flavones) ou rose- violacée (flavanones) ou rouge (flavonones, flavanonols) rassemblée dans la couche

surnageante d'alcool iso-amylque indique la présence d'un flavonoïde libre (génine),

- ❖ les colorations sont moins intenses avec les hétérosides flavoniques,
- ❖ la réaction est négative avec les chalcones, les dihydrochalcones, les aurones, les catéchines et les isoflavones.

Nous avons répété la réaction à la cyanidine sans ajouter de copeaux de magnésium et chauffer pendant 15 mn au bain-Marie :

- ❖ En présence de leucoanthocyane, il se développe une coloration rouge cerise ou violacée ;
- ❖ Les catéchols donnent une teinte brun-rouge.

2.2.3.3 Réaction de révélation des dérivés anthracéniques : y compris les quinones et les anthraquinones

Afin de caractériser les dérivés anthracéniques nous avons préparé les solutions suivantes :

- Extrait chloroformique : A 1 g de poudre de la plante, nous avons ajouté 10 ml de chloroforme et nous avons chauffé au bain-Marie pendant 3 mn. Ensuite nous avons filtré à chaud et complété à 10 ml si nécessaire.
- Hydrolysât : A une partie du résidu de la poudre épuisée par le chloroforme, nous avons ajouté 10 ml d'eau distillée et 1 ml d'acide chlorhydrique concentré. Ensuite nous avons maintenu le tube à essai dans le bain-Marie bouillant pendant 15 mn. Nous avons refroidi sous un courant d'eau et filtré. A la fin nous avons complété à 10 ml avec l'eau distillée.

✓ Caractérisation

- Dérivés anthracéniques libres : A 1 ml d'extrait chloroformique est ajouté 1 ml de NH₄OH dilué. Après agitation; la coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres.
- Dérivés anthracéniques combinés

- O-hétérosides (anthraquinones)
 - Nous avons prélevé 5 ml d'hydrolysât et nous les avons agité en présence de 5 ml de chloroforme. La phase organique est ensuite soutirée et introduite dans un tube à essai. Par la suite nous avons ajouté 1 ml de NH_4OH dilué. Après agitation, la présence d'anthraquinones est révélée par la coloration rouge plus ou moins intense.

 - O-hétérosides à génines réduites
 - A 5 ml d'hydrolysât nous avons ajouté 3 à 4 gouttes de FeCl_3 à 10 %, pendant 5 mn au bain-Marie. Après refroidissement, nous avons agité en présence de 5 ml de chloroforme. Ensuite nous avons soutiré la phase chloroformique et nous l'avons introduite dans un tube à essai. Nous avons ajouté 1 ml de NH_4OH dilué et agité. En présence de produits d'oxydation des anthranols ou anthrones, la coloration rouge est plus intense.

 - C-hétérosides
 - Nous avons repris la phase aqueuse qui a été conservée au cours de la caractérisation des O-hérosides par 10 ml d'eau distillée et nous lui avons ajouté 1 ml de FeCl_3 à 10%. Le tube à essai est maintenu dans un bain-Marie bouillant pendant 30 mn. Après refroidissement nous avons agité en présence de 5 ml de chloroforme, ensuite nous avons soutiré la phase chloroformique dans un tube à essai. Après avoir ajouté 1 ml NH_4OH dilué, le contenu a été agité.
- ❖ Une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de génines de C-hétérosides.

2.2.3.4 Réaction de révélation des alcaloïdes

- Nous avons procédé à une macération sous agitation pendant 24 h de 10 g de la poudre végétale dans 50 ml de H_2SO_4 dilué au 1/10 à la température ambiante du laboratoire,
- après filtration sur un papier, nous avons lavé à l'eau distillée de manière à obtenir environ 50 ml de filtrat.

✓ Caractérisation

1ml du macéré est introduit dans deux tubes à essai puis 5 gouttes de réactif de Mayer (Appendice G₁, G₂) ont été ajoutées dans le premier tube et 5 gouttes de réactif de Wagner (Appendice G₁, G₂) ont été ajoutées dans le deuxième.

- La présence d'une turbidité ou d'un précipité, après 15 minutes indique la présence d'alcaloïdes.

2.2.3.5 Réaction de révélation des saponosides

L'indice de mousse (IM) est fourni par le degré de dilution d'un décocté aqueux de la plante qui, dans des conditions déterminées, donne une mousse persistante.

- Dans une fiole conique de 500 ml, nous avons introduit 100 ml d'eau bouillante et 1,0 g de poudre grossière, nous avons maintenu à ébullition pendant 30 min. Nous avons ensuite filtré. Après refroidissement le filtrat est ajusté à 100 ml,
- dans une série de 10 tubes à essai, nous avons introduit successivement 1, 2, 3..., 10 ml de décocté. Le volume de chaque tube est ajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Après agitation de chaque tube dans le sens de la longueur pendant 15 secondes. Nous avons mesuré la hauteur de la mousse après 15 min de repos.
- Si la hauteur de mousse est inférieure à 1 cm dans tous les tubes, l'IM est inférieur à 100 ;
- Si la hauteur de mousse est de 1 cm dans l'un des tubes, la dilution dans ce tube est l'IM cherché. Si, par exemple, il s'agit du quatrième tube renfermant 4 mL de décocté à 1 pour cent, soit 0,04 g de drogue, l'IM est :

$$\frac{10 \times 1}{0.04} = 250$$

- Si la hauteur de mousse est supérieure à 1 cm dans tous les tubes, l'IM est supérieur à 1 000. Diluez le décocté et recommencez la détermination [79].

2.2.4 Extraction au soxhlet

La méthode d'extraction par le soxhlet permet d'extraire des quantités plus importantes de principes actifs, en l'occurrence les polyphénols et les anthraquinones, à partir de la poudre sèche. C'est une technique couramment pratiquée [80].

✓ Principe

Le solvant est porté à ébullition dans un ballon placé dans un dispositif chauffant et ses vapeurs sont condensées dans un tube réfrigéré. Le solvant condensé tombe goutte à goutte sur l'échantillon solide placé dans une cartouche poreuse. Un système de siphon permet de vidanger le réceptacle contenant l'échantillon quand le volume du solvant atteint un niveau donné, le solvant, aspiré dans le ballon de distillation, entraîne les composés organiques extraits. Ceux-ci restent dans le ballon où leur concentration dans le solvant augmente progressivement [81].

✓ Mode opératoire

L'extraction a été effectuée d'abord par un solvant apolaire, qui est l'éther de pétrole. Après séchage du matériel végétal, une autre extraction a été réalisée par un solvant polaire, qui est le méthanol.

- 20 g de feuilles, soigneusement lavée et séchée, est introduite dans la cartouche en papier filtre et placée au niveau du soxhlet (Appendice H);
- 250 ml d'éther de pétrole sont incorporés à un ballon à col rodé à fond plat qui est lui-même placé dans un bain-Marie et porté à ébullition ;
- Après une douzaine de siphonages, nous récupérons d'une part, le ballon contenant le solvant enrichi en substances solubles (fraction lipidique) d'autre part la matière végétale contenue dans la cartouche de papier filtre que l'on nommera marc et qu'on laisse sécher à l'air libre ;
- Le marc récupéré et séché est réintroduit dans une seconde cartouche et soumis à une seconde extraction au soxhlet en utilisant cette fois-ci du méthanol afin de récupérer les substances polaires solubles dans les alcools ou autres solvants polaires ;

- Après une douzaine de siphonages, nous récupérons un marc et le ballon contenant le solvant ainsi que la fraction polaire de la plante (sucres, flavonoïdes, tanins, divers glycosides) [83] ;
- Les extraits, méthanolique et étheré secs sont obtenus par évaporation du solvant grâce à un évaporateur rotatif (Appendice E₂) ;
- Le ballon contenant l'extrait méthanolique sec est pesé avant et après extraction afin de déterminer la teneur de la fraction polaire.

✓ Rendement d'extraction

Une fois les extraits ont été obtenus, nous avons déterminé leurs caractéristiques organoleptiques et le rendement (Rdt) de l'extrait méthanolique par rapport à la quantité initiale de la poudre sèche :

$$Rdt = \frac{M_{\text{extrait}}}{M_{\text{poudre}}} \times 100$$

M extrait : La masse de l'extrait

M poudre : La masse de la poudre de la plante (M poudre = 20 g)

2.2.5 Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

2.2.5.1 Polyphénols totaux

La teneur en phénols totaux de l'extrait de la plante a été déterminée par la méthode de SINGLETON ET ROSSI [84] ET SINGLETON et *al.*, [85] utilisant le réactif de Folin–Ciocalteu (FC).

✓ Principe

Le réactif de FC est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène [86]. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

✓ mode opératoire

- Les solutions utilisées pendant le dosage sont :
 - Réactif de FC,
 - Solution de Na_2CO_3 à 7%,
 - Solution standard d'acide gallique (25-50–100–125–150–200 $\mu\text{g/ml}$) préparé en utilisant du méthanol à 80%.

- Afin de réaliser ce dosage, nous avons suivi les étapes suivantes:
 - 250 μl de FC sont ajoutés à 50 μl de l'extrait ou solution standard d'acide gallique,
 - le mélange est laissé au repos à la température ambiante et à l'obscurité pendant 5 min,
 - un volume de 750 μl Na_2CO_3 est ajouté au mélange,
 - ce mélange est complété avec 5 ml d'eau distillée pure,
 - ensuite, le mélange est incubé pendant 120 min à une température ambiante et à l'obscurité,
 - le blanc est préparé en remplaçant 50 μl de l'extrait par du méthanol à 80%,
 - l'absorbance est mesurée à 760 nm utilisant un spectrophotomètre UV,
 - La teneur en polyphénols totaux est déterminée et calculée à partir d'une courbe d'étalonnage établit avec différentes concentrations d'acide gallique. Elle est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme (g) d'extrait méthanolique (mg EAG/ g extrait).

2.2.5.2 Flavonoïdes

La détermination des flavonoïdes totaux a été effectuée selon la méthode décrite par DEHPOUR et *al.*, [87].

✓ Mode opératoire

- 500 μl de l'extrait à analyser sont ajoutés à 1500 μl de méthanol à 95 %, 100 μl de AlCl_3 à 10 % (m/v), 100 μl d'acétate de sodium 1 M et 2,8 ml d'eau distillée,
- Le mélange est agité puis incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 min,

- Le blanc est réalisé par remplacement de l'extrait par du méthanol à 95 % et l'absorbance est mesurée à 415 nm en utilisant un spectrophotomètre UV.

Les résultats sont calculés à partir d'une courbe d'étalonnage établit avec de la quercétine. Ils sont exprimés en mg d'équivalent de la quercétine par g d'extrait méthanolique (mg EQ/ g extrait).

2.2.6 Etude des activités biologiques

Dans cette partie, nous aborderons l'étude de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique ainsi que l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique et de l'infusé à 10%.

2.2.6.1 L'activité antioxydante

La mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* de l'extrait a été réalisée par la méthode de piégeage du radical libre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle (DPPH).

✓ Principe

La méthode de DPPH, est une méthode simple, rapide et facile à réaliser. Le DPPH est un radical libre et stable. Il possède une coloration violette foncée. Lorsqu'il est réduit, la coloration devient jaune pâle. Il possède une bande d'absorbance à 517 nm. La méthodologie est basée sur la décroissance de l'absorbance d'une solution méthanolique de DPPH suite à l'addition de l'antioxydant [88].

✓ Mode opératoire

Nous avons suivi la méthode de SAHA et *al.*, [89].

➤ Préparation de l'extrait de DPPH

- 2 mg de DPPH sont solubilisés dans 50 ml de méthanol absolu ensuite sont conservé à l'abri de la lumière.

➤ Préparation de l'extrait

- Une solution mère est préparée en dissolvant 1 mg d'extrait méthanolique dans 1 ml de méthanol absolu (1 mg/ml). A partir de cette solution, nous réalisons une série de dilution de l'ordre du microgramme par ml.
 - Dans des tubes à essais secs et stériles, un volume de la solution mère (50 µl, 100 µl, 200 µl, 300µl, 400µl, 500µl) est ajusté à 1 ml de méthanol, ensuite 2 ml de la solution de DPPH sont ajoutés dans chaque tube,
 - les tubes sont laissés incuber pendant 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière,
 - Le contrôle positif est représenté par une solution d'antioxydants standards : (quercétine et rutine) dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon test,
 - La lecture de la densité optique se fait à 515 nm.
- ✓ Expression des résultats
- ✓ Calcul des pourcentages d'inhibitions :

Nous calculons ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante :

$$I (\%) = [(Abs\ blanc - Abs\ test) / Abs\ contrôle] \times 100$$

Abs blanc : absorbance du blanc

Abs test : absorbance de l'échantillon

- Le blanc : est composé par 1 ml de méthanol et 2 ml de la solution de DPPH.
 - Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois mesures \pm écart type.
- ✓ Calcul des IC50

La concentration IC50 ou concentration inhibitrice est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH*.

Les IC50 sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés. Les pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

✓ Étude statistique

Pour chaque essai, 3 mesures ont été réalisées. L'étude statistique a été établie sur Statistica 7.0 de Statsoft Inc, Tulsa, USA et PASW Statistics 17.0 d'IBM Company, Chicago, Illinois, USA. Le test utilisé est le test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

2.2.6.2 L'activité antimicrobienne

Cette méthode consiste à évaluer et à mettre en évidence l'activité antimicrobienne de deux échantillons :

1/ Nous avons testé l'extrait méthanolique dilué dans le DiMéthyle SulfOxyde (DMSO),

2/ nous avons testé un infusé à 10% de la plante.

Le test de susceptibilité a été effectué selon la méthode de diffusion des disques sur gélose décrite par DULGER ET GONUZ [90], PAREKH ET CHANDA [91] et ROTA et *al.*, [92]. Elle consiste à déposer un disque stérile, imbibé de l'extrait, sur un tapis bactérien en début de croissance et de mesurer la zone où les bactéries n'ont pas pu se développer. Le diamètre de la zone d'inhibition (ZI), qui traduit l'activité antibactérienne des extraits, est ainsi déterminé.

Selon MEENA ET SETHI [93] et ELLA et *al.*, [94] l'activité antimicrobienne est exprimée en ZI comme suit :

- Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la ZI est > 28 mm.
- Modérément inhibitrice lorsque : $28 \text{ mm} > \varnothing \text{ ZI} > 16 \text{ mm}$
- Légèrement inhibitrice lorsque : $16 \text{ mm} > \varnothing \text{ ZI} > 10 \text{ mm}$
- Non inhibitrice lorsque : $\varnothing \text{ ZI} < 10 \text{ mm}$

➤ Les milieux de culture

1- La gélose Muller Hinton (MH) pour les bactéries.

2-La Gélose de Dextrose de Sabouraud (GDS) pour la levure.

➤ Coulage des boîtes de Pétri

La gélose de M H et GDS stérile prête à l'usage sont coulées dans des boîtes de Pétri stériles.

➤ Repiquage des espèces bactériennes

Les bactéries et la levure sont repiquées en stries, afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum. Ensuite, les bactéries sont incubées à 37 °C pendant 24 heures et la levure à 25°C pendant 48 heures.

➤ Préparation de l'inoculum

2 à 3 colonies sont prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile et homogénéisées dans une eau physiologique stérile. Elles sont incubées pendant (18-24) heures à 37°C pour les bactéries et 48 heures à 25° pour la levure.

La densité optique de chaque suspension doit être comprise entre 0,08 et 0,1 à la longueur d'onde de 625 nm. Lorsque la valeur de la transmittance observée se situe dans cet intervalle la concentration de la suspension est optimale. En l'occurrence elle contient 10^7 à 10^8 germes/ml,

➤ 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,

- De même les antibiogrammes réalisés avec des disques : contenant des antibiotiques (témoin positif) appropriés sont prêts à l'emploi. Ils ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des extraits testés.

Les antibiotiques utilisés sont :

- Acide fusidique (10 mcg)
- Acide pipemidique (20 mcg)
- Chloramphénicol (30 mcg)

et des disques Wattman imprégnés de DMSO (témoin négatif),

- Ensemencement

Les boîtes de Pétri stériles préalablement coulées, sontensemencées à l'aide d'un râteau stérile. Cet ensemencement assure une distribution homogène des bactéries et de la levure,

- 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 préalablement,

- L'incubation

Les boîtes de Pétriensemencées par les bactéries sont incubées à une température de 37°C pendant 24 heures. Et cellesensemencées par la levure sont incubées 48 heures à une température de 25° C.

- Lecture

La lecture se fait par la mesure des ZI autour des disques à l'aide d'un pied à coulisse,

- Pour chaque essai, 3 mesures ont été réalisées avec \pm écart type.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Résultat de l'étude microscopique

Afin de détecter ou de localiser des structures particulières (de réserve ou de sécrétion), des coupes transversales ont été effectuées au niveau des feuilles et des tiges de *Rhamnus alaternus* L.

3.1.1 Structure de la tige

- La tige de *Rhamnus alaternus* L. (Figures 3.1 et 3.2) est une tige de dicotylédone. Ainsi, elle peut présenter des structures secondaires.

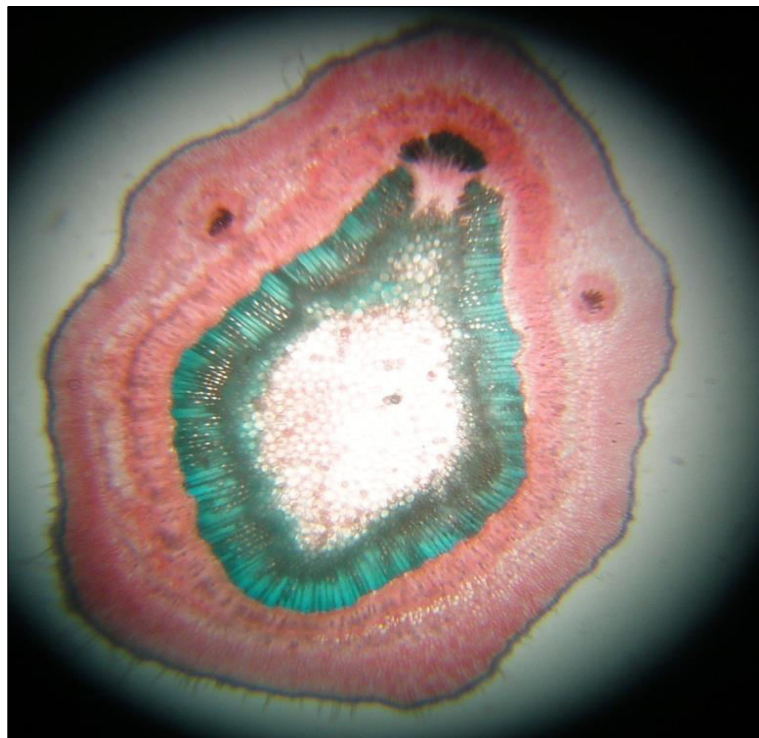


Figure 3.1 : Vue d'ensemble de la coupe transversale de la tige de *Rhamnus alaternus* L. vue au MP Gx10 après double coloration (Original)

Les coupes transversales ont montré les différents tissus qui la constituent. Ainsi, de l'extérieur vers l'intérieur, nous observons (Figure 3.2) :

- La cuticule striée imprégnant vers l'extérieur les cellules épidermiques,
- Un épiderme, constitué de cellules épidermiques. L'épiderme est suivi du collenchyme, qui est un tissu de soutien vivant. Les membranes des cellules présentent des épaisissements de nature cellulosique,
- Les tissus secondaires sont abondants et sous forme d'un anneau continu. On observe la production de bois qui est un tissu conducteur secondaire. Il conduit la sève brute. La sève élaborée est conduite par le liber qui est aussi un tissu conducteur secondaire. Ces structures secondaires sont le fonctionnement d'une année de l'assise génératrice libéro-ligneuse ou cambium,
- Le bois est constitué de vaisseaux, de fibres et du parenchyme : Il est donc hétéroxylé,
- Un parenchyme médullaire, on l'observe au centre de l'organe végétal.

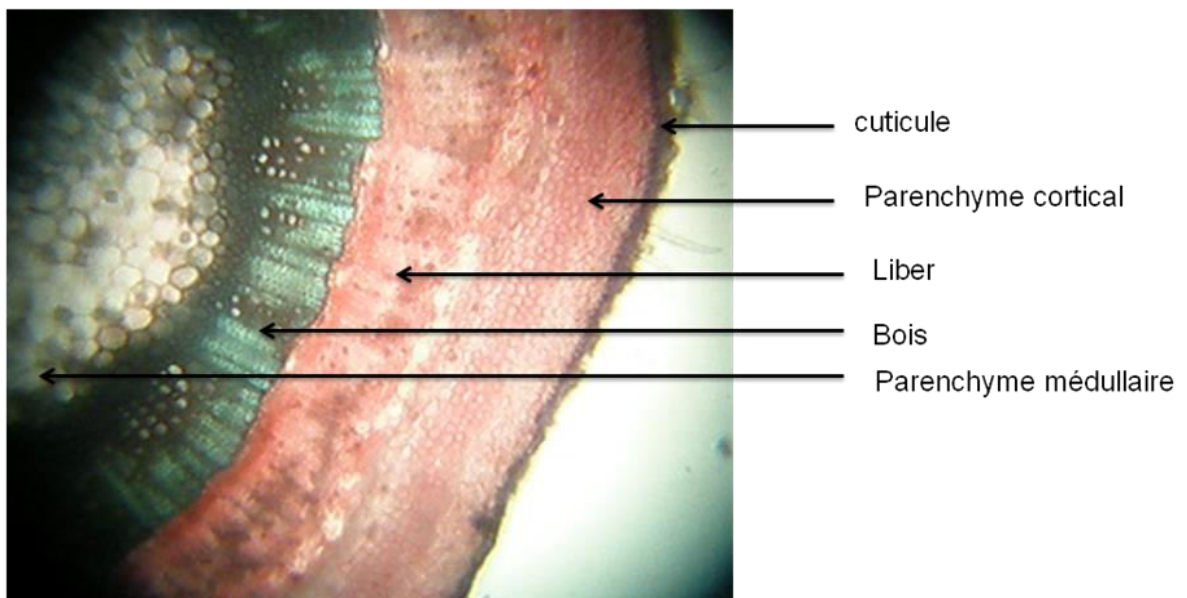


Figure 3.2: Coupe transversale de la tige de *Rhamnus alaternus* L. vue au MP Gx 40 après double coloration (Original)

Certaines cellules de l'épiderme se prolongent vers l'extérieur pour donner des poils épidermiques. Il s'agit de poils tecteurs (Figure 3.3).

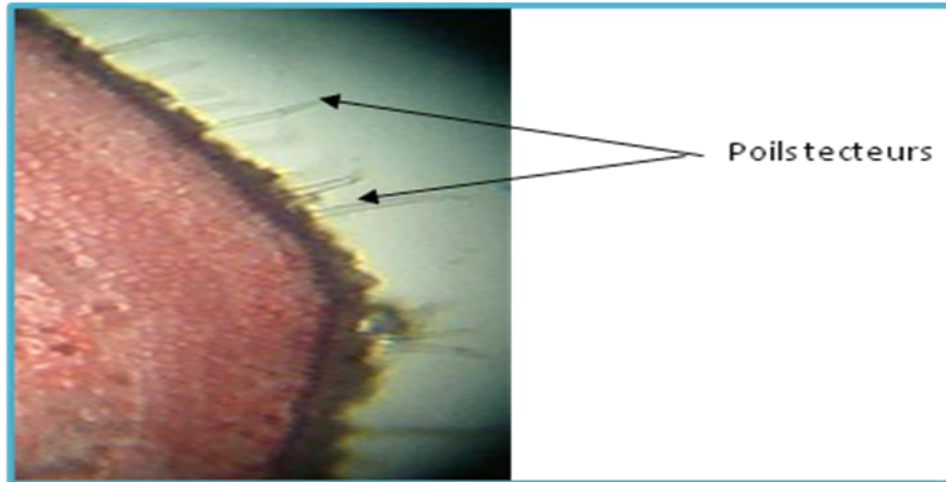


Figure 3.3: Poil épidermique tecteur de la tige de *Rhamnus alaternus* L. vue au MP Gx 40 après double coloration (Original)

3.1.2 Structure de la feuille

La coupe transversale (Figure 3.4) montre que la feuille se compose des tissus suivants :

- La cuticule qui enveloppe vers l'extérieur les cellules épidermiques. Son rôle est de protéger ce tissu.
- L'épiderme supérieur constitué par une assise de cellules,
- Un début de parenchyme lacuneux,
- Une nervure principale qui renferme les éléments conducteurs secondaires :
 - Le liber
 - Le bois
- Dans la feuille, nous observons aussi des cristaux. On les appelle aussi mâcles, ils présentent une forme « d'oursin ». Ils sont le résultat d'une cristallisation de l'acide oxalique et du calcium.

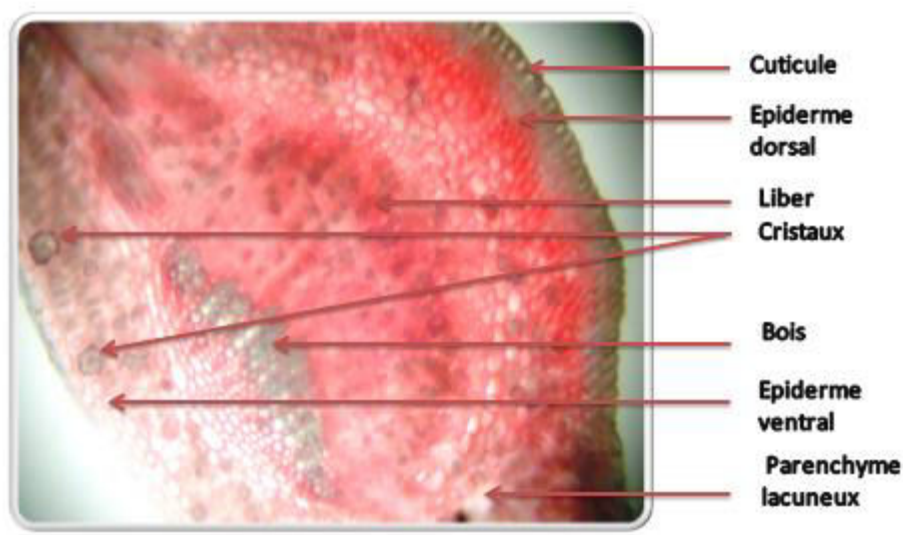


Figure 3.4 : Coupe transversale de la feuille de *Rhamnus alaternus* L. vue au MP Gx 40 après double coloration (Original)

Au terme de l'étude microscopique de *Rhamnus alaternus* L., nous n'avons pas pu observer de cellule sécrétrice, de poches ou de canaux excréteurs aussi bien au niveau des tiges que des feuilles.

3.2 Résultat des analyses phytochimiques

3.2.1 La teneur en eau

Le tableau 3.1 comporte les valeurs des pesées après dessiccation pendant 48 H.

Tableau 3.1 : Résultats des pesées de la teneur en eau après dessiccation pendant 48H

Masse fraîche (g)	1,0064 ± 0,0033
Masse sèche (g)	0,4136 ± 0,0045
Teneur en eau (%)	58,9017 ± 0,4319

La figure 3.5 représente la teneur en eau et en matière sèche des feuilles.

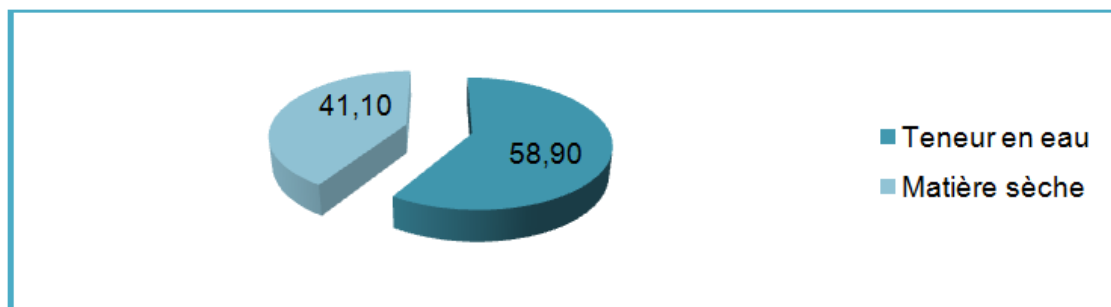


Figure 3.5 : Teneur en eau

D'après le tableau 3.1 et la figure 3.5, nous constatons que la teneur en eau contenue dans la plante représente approximativement la moitié de son poids total. HAMADOU [95] a observé une teneur en eau de 51,18 % dans les feuilles de *Rhamnus alaternus* L. récoltées dans la région d'El Harrach à Alger. On constate que la teneur en eau diffère légèrement chez les deux espèces.

3.2.2 Le taux humidité de la poudre

Le tableau 3.2 comporte les valeurs des pesées après dessiccation pendant 72 H.

Tableau 3.2: Résultats des pesées du taux d'humidité après dessiccation pendant 72H

Masse drogue essai (g)	0,974 ± 0,038
Masse sèche (g)	0,901 ± 0,04
Taux d'humidité (%)	7,49 ± 0,68

Dans notre étude nous avons obtenu un taux d'humidité de 7,49%. On parle habituellement d'un maximum de 10 % d'humidité. Le taux d'humidité, nous donne une idée sur la dégradation des principes actifs de la plante. Il ne doit subsister aucune trace d'humidité qui provoquerait des moisissures et rendrait la récolte impropre à la consommation. Les feuilles de la plante peuvent être conservées longtemps en raison de leur faible taux d'humidité.

3.2.3 Les cendres

Les valeurs moyennes de la teneur en cendres de *Rhamnus alaternus* L. sont rapportées dans le tableau 3.3 et la figure 3.6.

Tableau 3.3 : Teneur en cendres de *Rhamnus alaternus* L.

Masse de la drogue essai (g)	Masse des cendres	Teneur en cendres en %
1	0.1234 ± 0.0032	12.34 ± 0.32

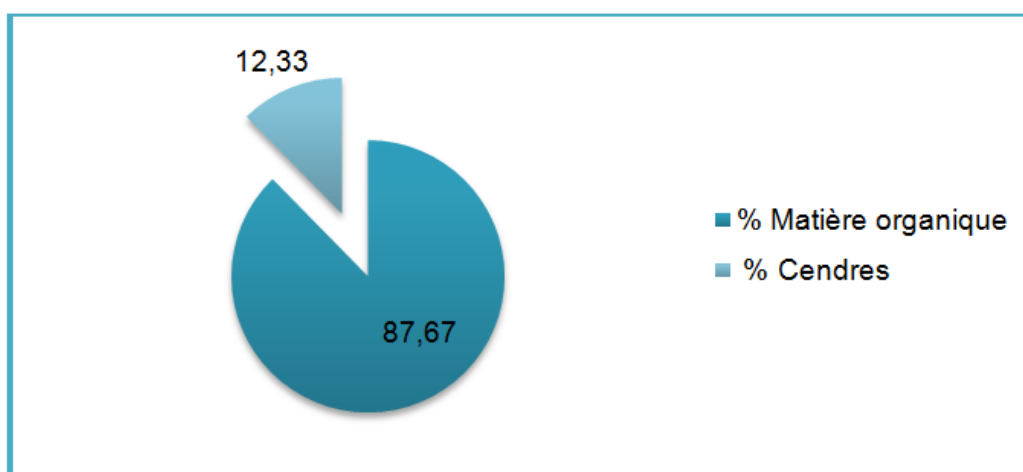


Figure 3.6 : Le taux des cendres

Le taux de cendres représente la quantité totale en sels minéraux présents dans la feuille. Nous avons obtenu des cendres de couleur clair. Nous constatons selon le tableau 3.3 et la figure 3.6 qu'elles représentent 12.33 %. Cette valeur correspond à celle rapportée par la pharmacopée européenne en 2002 qui est de 10 à 12%.

3.3 Résultat du screening phytochimique

3.3.1 Groupes chimiques caractérisés

La mise en évidence des différentes familles de métabolites secondaires constituant une plante, nous permet d'avoir une bonne idée sur ses activités pharmacologiques.

Ces analyses sont en relation avec l'intensité du précipité et de turbidité où la coloration est proportionnelle à la quantité de la substance recherchée. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.4.

Ainsi :

- Une réaction franchement positive est représentée par : +++
- Une réaction moyennement positive est représentée par : ++
- Une réaction faiblement positive est représentée par : +
- L'absence de la substance est représenté par : -

Dans le tableau: les Dérivés anthracéniques combinés sont symbolisés par :

- O: pour les O-hétérosides
- C: pour les C- hétérosides
- G: pour les O- hétérosides à génines réduites.

Tableau 3.4 : Groupes chimiques rencontrés dans les feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

Constituants		Résultats	Interprétation		
Composés phénoliques	Tanins	Tanins	Bleu noirâtre précipité rouge	+++ -	
		Galliques	Bleu noirâtre	+++	
	Flavonoïdes	Flavonones et Flavanonols			-
		Flavones	Rouge orangée	+++	
		Flavanones		-	
		Leucoanthocyanes		-	
		Catéchols		+	
		Anthocyanes		-	
	Dérivés Anthracéniques	Libres	Rouge	+	
		Combinés	O	Rouge	+++
C			Rouge	+++	
G			Rouge	++	
Composés azotés	Alcaloïdes		Précipité	+	
	Saponosides		Indice de mousse	+ IM= 111.11	

D'après le tableau 3.4, les analyses réalisées nous ont permis de constater la présence de cinq familles de métabolites secondaires à savoir : les tanins, les flavonoïdes, les saponosides, les dérivés anthracéniques ainsi que les alcaloïdes. Ces résultats ont révélé la richesse de cette plante en flavonoïdes, tanins et dérivés anthracéniques.

En ce qui concerne les tannins, nous les avons détectés au moyen d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 1%. L'apparition d'une coloration bleu-noire dénote la présence de tanins galliques, alors que les tanins catéchiques seraient absents. (Appendice G₁)

Les feuilles sont très riches en flavonoïdes (flavones). Nous notons tout de même l'absence totale des flavonoïdes sous forme d'anthocyanes et leucoanthocyanes (Appendice G₁).

Elles sont riches en dérivés anthracéniques essentiellement les dérivés anthracéniques combinés O-hétérosides (anthraquinones) et les C-hétérosides. Cette présence pourrait expliquer la prescription de la plante étudiée comme laxative ou purgative [26].

Ces résultats corroborent avec ceux obtenus par BEN AMMAR et *al.*, [96] (Tunisie). Ces derniers ont rapporté la présence des tanins, des anthraquinones ainsi que des flavonoïdes au niveau des feuilles de la même plante à savoir *Rhamnus alaternus* L.

Selon LI et *al.*, [97], les composés phénoliques comme les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins sont considérés comme les contributeurs majeurs à la capacité antioxydante des plantes. Ces composés possèdent aussi diverses activités biologiques telles que les activités anti-inflammatoire, antibactérienne, antivirale et antiallergique [58].

3.4 Résultat de l'extraction au soxhlet

3.4.1 Caractéristiques organoleptiques des extraits

Les caractéristiques organoleptiques des extraits, méthanolique et étheré obtenus par l'extraction au soxhlet sont représentées dans le tableau 3.5.

Tableau 3.5 : Caractéristiques organoleptiques des concrètes des feuilles *Rhamnus alaternus* L.

Feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.		
Caractéristique	Ether de pétrol	Méthanol
Solvant		
Couleur	Vert foncé	Vert foncé à noir
Odeur	Forte	Forte
Aspect	Solides pâteux	Solide, pâteux et collant

3.4.2 Rendement de l'extraction

Le rendement de l'extraction des substances non volatiles miscibles dans le solvant polaire est de 20 %. Dans l'étude réalisée par HARRAR [98] sur la même espèce originaire de Sétif, le rendement obtenu était de 12%.

Le rendement de l'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, le contenu de chaque espèce en métabolites et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction et de sa polarité [99].

3.5 Résultats du dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

3.5.1 Les polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux est déterminée à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage (Figure 3.7). Elle est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait méthanolique (mg EAG/ g extrait).

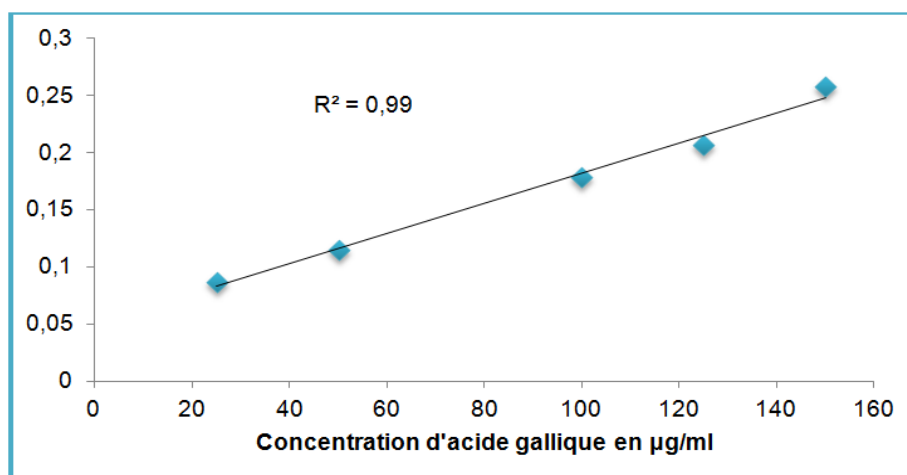


Figure 3.7 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

La teneur en polyphénols totaux est de $664,100 \pm 8.89$ mg EAG/g d'extrait méthanolique. Ce résultat montre que l'extrait méthanolique est riche en polyphénols. En comparaison à d'autres travaux, nous remarquons que cette teneur est supérieure à celle obtenue par:

- BEN AMMAR et *al.*, [96] (Tunisie). Ces derniers ont obtenu une valeur de 295 ± 23 mg EAG/ g d'extrait méthanolique ;
- les travaux dirigés par BOUSSAHEL et *al.*, [100] (Bordj-Bou-Arirdj) montrent une valeur de $33,655 \pm 2.503$ mg EAG/g extrait ;
- une autre étude menée par KRIMAT et *al.*, [101] (Sétif) a montré que l'extrait méthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. contient une teneur de $107,95 \pm 6,58$ mg EAG/g extrait,
- KOSALEC et *al.*, (Italie) [102] ont obtenu une valeur de 38.4 ± 1.56 mg EAG/ g dans l'écorce de *Rhamnus alaternus* L.

Ces résultats décalés résultent vraisemblablement de:

- ✚ La faible spécificité du réactif de F C. Il est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique car le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tout les groupes d'hydroxyles des composés phénoliques, de certains sucres et des protéines [103] ; [104],

- ✚ le solvant d'extraction piège des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants. Ces derniers peuvent interférer pendant toute l'évaluation phénolique [105],
- ✚ la solubilité des polyphénols est en fonction du type de solvant utilisé, leur degré de polymérisation ainsi que leur interaction avec d'autres constituants et la formation de complexes insolubles [106],
- ✚ la teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques. Les facteurs extrinsèques sont les conditions climatiques (la température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité), les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage ainsi que les différentes maladies pouvant affecter la plante [106] ; [107].

3.5.2 Les flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Nous avons utilisé la quercétine comme étalon. Le taux des flavonoïdes de l'extrait a été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage (Figure 3.8) avec $R^2 = 0,99$.

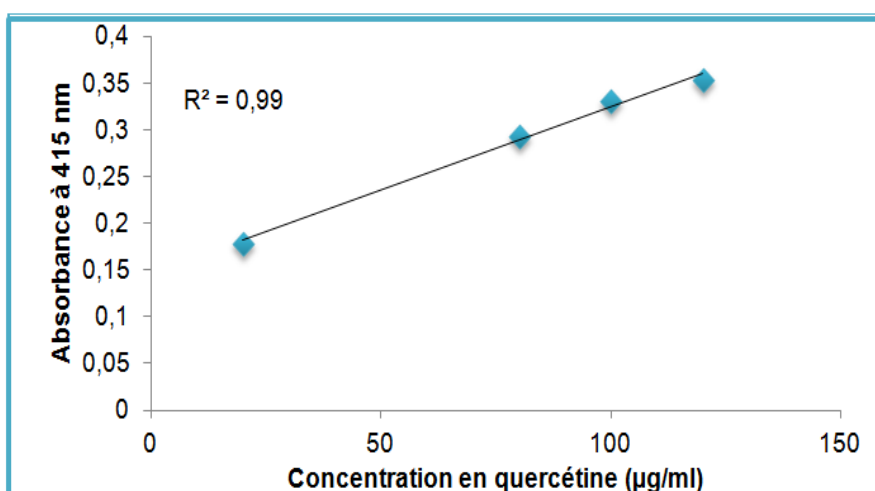


Figure 3.8 : Courbe étalonnage de la quercétine

La teneur en flavonoïdes contenue dans notre extrait méthanolique est de $158,07 \pm 3,57$ mg EQ/g extrait méthanolique :

- Le taux de flavonoïdes obtenu par BEN AMMAR et *al.*, [96] (Tunisie) est élevé par rapport à notre résultat. Il est de 423 ± 19 mg EQ/ g d'extrait méthanolique,

Nous avons obtenu un résultat plus élevé en flavonoïdes par rapport à :

- KRIMAT et *al.*, [101] dont le taux est de l'ordre de 26.84 ± 1.18 mg EQ/g extrait, et BOUSSAHEL et *al.*, [100] dont le taux est 61.127 ± 1.217 mg EQ/g extrait,
- D'autres résultats obtenus par KOSALEC et *al.*, [102], sur la même espèce au niveau de l'écorce, ont trouvé un taux de $33,4 \pm 1.50$ mg EQ/ g extrait.

Cette différence peut être due au temps et aux saisons de la récolte, aux conditions climatiques et aux méthodes d'extraction et dosage. Selon RAWEL et ses collaborateurs [108], les méthodes de conservation et d'exposition à la lumière des plantes peuvent affecter la teneur en flavonoïdes. En effet, les flavonoïdes sont sensibles à l'oxydation.

3.6 Résultats de la mise en évidence de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante de l'extrait, de la quercétine et de la rutine vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement. La réduction de ce radical s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 515 nm.

À partir des figures 3.9, 3.10 et 3.11, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition. Nous avons déterminé graphiquement les IC 50. La IC 50 et l'activité antioxydante de l'extrait testé sont inversement proportionnelles.

La figure ci-dessous (Figure 3.9) montre les résultats de mesure du pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de concentration de l'extrait méthanolique.

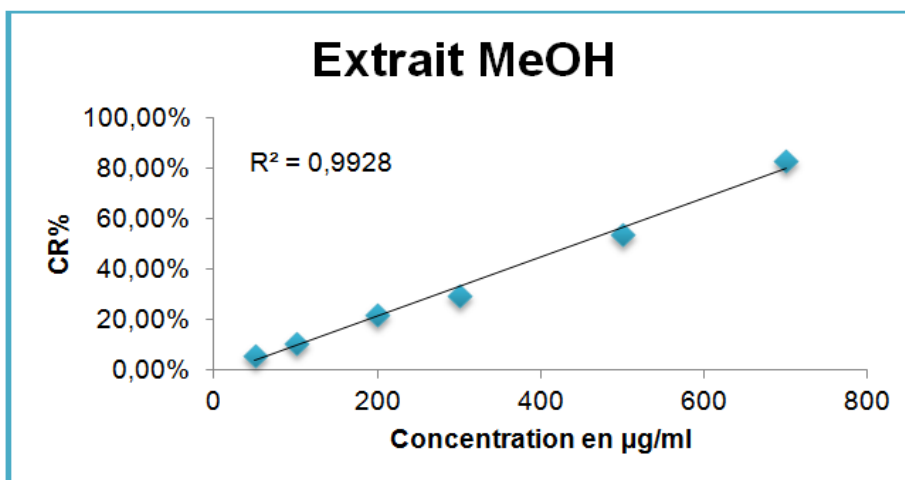


Figure 3.9 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* L.

D'après la figure 3.9, nous remarquons que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait méthanolique testé. Ces résultats révèlent que l'extrait a présenté un pourcentage d'inhibition égale 58.96%.

Les résultats de ce test ont montré également que 50% des radicaux libres ont été éliminées par les polyphénols totaux de l'extrait à partir d'une concentration de IC50 : $0.435 \pm 8,04$ mg/ml.

L'activité antioxydante de la rutine, un flavonoïde glycosylé, et celle de son homologue aglycone, la quercétine, a été évaluée. Une représentation graphique est représentée dans les figures 3.10 et 3.11.

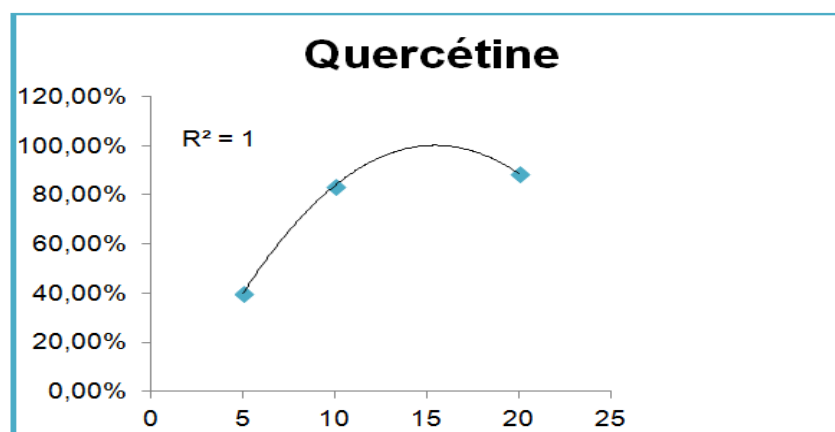


Figure 3.10 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour la quercétine

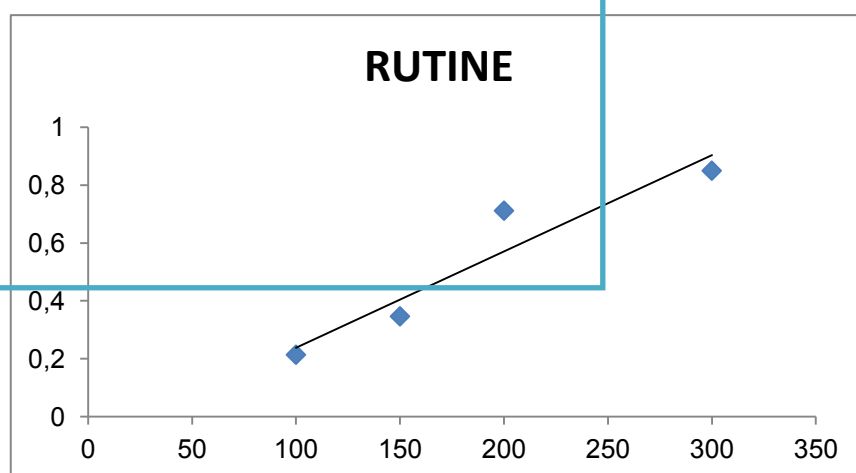


Figure 3.11: Pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour la rutine

Pour

comparer l'activité antioxydante, entre la forme glycosylée et la forme aglycone, nous avons calculé le pourcentage d'inhibition ainsi que la IC50 de chacune des deux à partir des courbes de régression. Les valeurs de l'IC50 sont données dans le tableau 3.6.

Tableau 3.6 : Pourcentage d'inhibition et les IC50 obtenus

Extrait	pourcentage d'inhibition (%)	IC50 (µg/ml)
MeOH	58,96	434,50 ± 8,04
Quercétine	88,7	3,95 ± 0,036
Rutine	84,01	180,05 ± 0,036

D'après les résultats obtenus, il semble que l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique est proche de celle de la rutine. Le test de Kruskal-Wallis (Appendice I) révèle l'absence de différence significative entre l'activité de l'extrait et de celle de la rutine avec un ($p > 0.05$).

Au contraire, le test de Kruskal-Wallis a révélé une différence significative entre l'extrait méthanolique et la quercétine avec un ($p < 0.05$). Cette même étude statistique a révélé une différence non significative entre la quercétine et la rutine (Appendice I).

Ce test de Kruskal-Wallis confirme que les témoins positifs possèdent une activité antioxydante plus forte que l'extrait.

Il est clairement établi que la quercétine qui est un aglycone possède un pouvoir anti-DPPH plus important que celui de la rutine qui est glycosylé. Ceci

pourrait prouver le rôle de la fonction hydroxyle ; lorsque celle-ci est libre, elle contribue à la potentialisation de l'effet biologique de la quercétine, tandis que lorsque cette même fonction est bloquée par le sucre (dans la structure de la rutine) l'activité diminue [109].

Une étude des IC₅₀ de l'extrait méthanolique en comparaison avec d'autres travaux ([101] ; [100] ; [98] ; [110]) est représentée dans le tableau 3.7. Elle nous a permis de constater que la valeur IC₅₀ obtenue est supérieure aux autres. Cette activité antioxydante est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques de l'extrait méthanolique [31].

Tableau 3.7 : Comparaison de la IC 50 de MeOH avec d'autres travaux

Espèce	Extrait	Région de récolte	Valeurs IC 50 (mg/ml)	Références
<i>Rhamnus alaternus</i> L.	MeOH	Blida	0.434	Original
		Sétif	0.054 ± 0.80	KRIMAT et al., [101]
		Bourdj-Bou-Arridj	0.082 ± 0.006	BOUSSAHEL et al., [100]
		Sétif	0.071	HARRAR [98]
		Tunisie	0.019	BEN AMMAR et al., [110]

3.7 Résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne

L'évaluation *in-vitro* de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la technique de diffusion sur milieu solide. Elle est déterminée par le diamètre de la ZI (en mm).

✓ Les bactéries Gram négatif

Les résultats de l'étude qualitative de l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique et de l'infusé à 10% sur les bactéries Gram - sont illustrés dans le tableau 3.8.

Tableau 3.8 : Diamètres des ZI (mm) obtenus dans le cas des bactéries Gram -

Les souches	Extrait	Diamètres ZI				
		Disque 1 mm	Disque 2 mm	Disque 3 mm	Moyenne mm	Control négatif (DMSO)
<i>Echerichia coli</i>	MeOH	14	14.5	14.5	14.33±0,29	< 9
	Infusé	< 9	< 9	< 9	< 9	< 9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MeOH	< 9	< 9	< 9	< 9	< 9
	Infusé	< 9	< 9	< 9	< 9	< 9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MeOH	< 9	< 9	< 9	< 9	< 9
	Infusé	< 9	< 9	< 9	< 9	< 9
<i>Salmonella typhimurium</i>	MeOH	< 9	< 9	< 9	< 9	< 9
	Infusé	< 9	< 9	< 9	< 9	< 9
<i>Citrobacter freundii</i>	MeOH	14	13	12.5	13,17±0.76	< 9
	Infusé	< 9	< 9	< 9	< 9	< 9

Selon l'échelle citée par MEENA ET SETHI [93] et ELLA et *al.*, ([94] nous pouvons déduire que :

- L'extrait méthanolique a montré une activité légèrement inhibitrice sur *Echerichia coli* et *Citrobacter freundii*,
- Les souches *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Salmonella typhimurium* sont remarquablement résistantes. Aucune ZI n'a été observée autour des disques.
- L'infusé à 10% s'est montré inactif sur l'ensemble des souches Gram - testées.

✓ *Les bactéries Gram positif*

Les résultats de l'étude qualitative de l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique et de l'infusé à 10% sur la bactérie Gram⁺ sont illustrés dans le tableau 3.9.

Tableau 3.9 : Diamètres des ZI (en mm) obtenus dans le cas de la bactérie Gram+

Les souches	Extrait	Diamètres ZI				
		Disque 1 mm	Disque 2 mm	Disque 3 mm	Moyenne mm	Control négatif (DMSO)
<i>Staphylococcus aureus</i>	MeOH	14	14.5	14	14.17±0,29	< 9
	Infusé	< 9	< 9	< 9	< 9	< 9

Selon l'échelle citée MEENA ET SETHI [93] et ELLA et *al.*, [94] nous pouvons déduire que :

- La croissance de *Staphylococcus aureus* a été légèrement influencée par l'extrait méthanolique.
- *Staphylococcus aureus* s'est montrée insensible à l'infusé de 10%.

Le résultat des ZI obtenus sur les bactéries Gram⁺ et Gram⁻ sensibles est représenté par la figure 3.12.

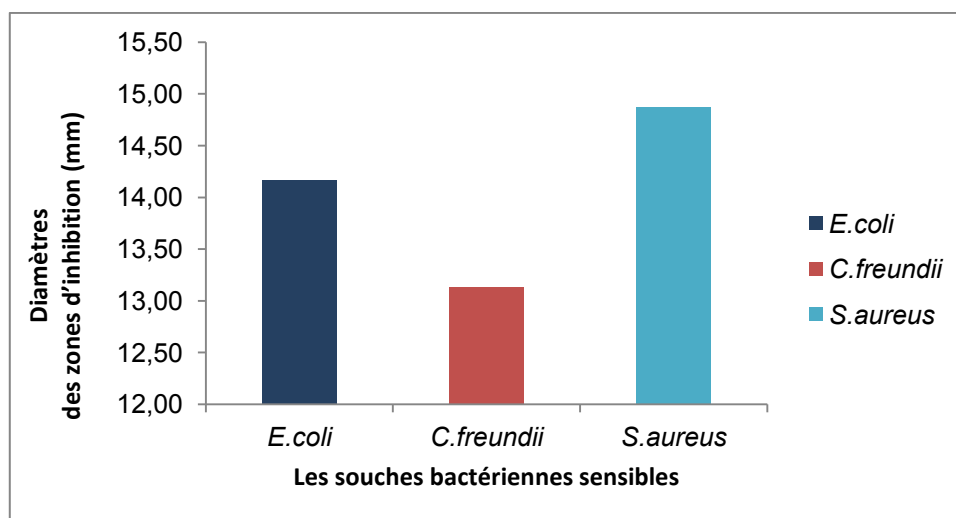


Figure 3.12 : Diamètres des zones d'inhibition des bactéries sensibles au MeOH

La figure 3.13 montre l'effet de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* L. sur les bactéries testées. Les résultats sont notés après 24 heures d'incubation pour les bactéries testées.

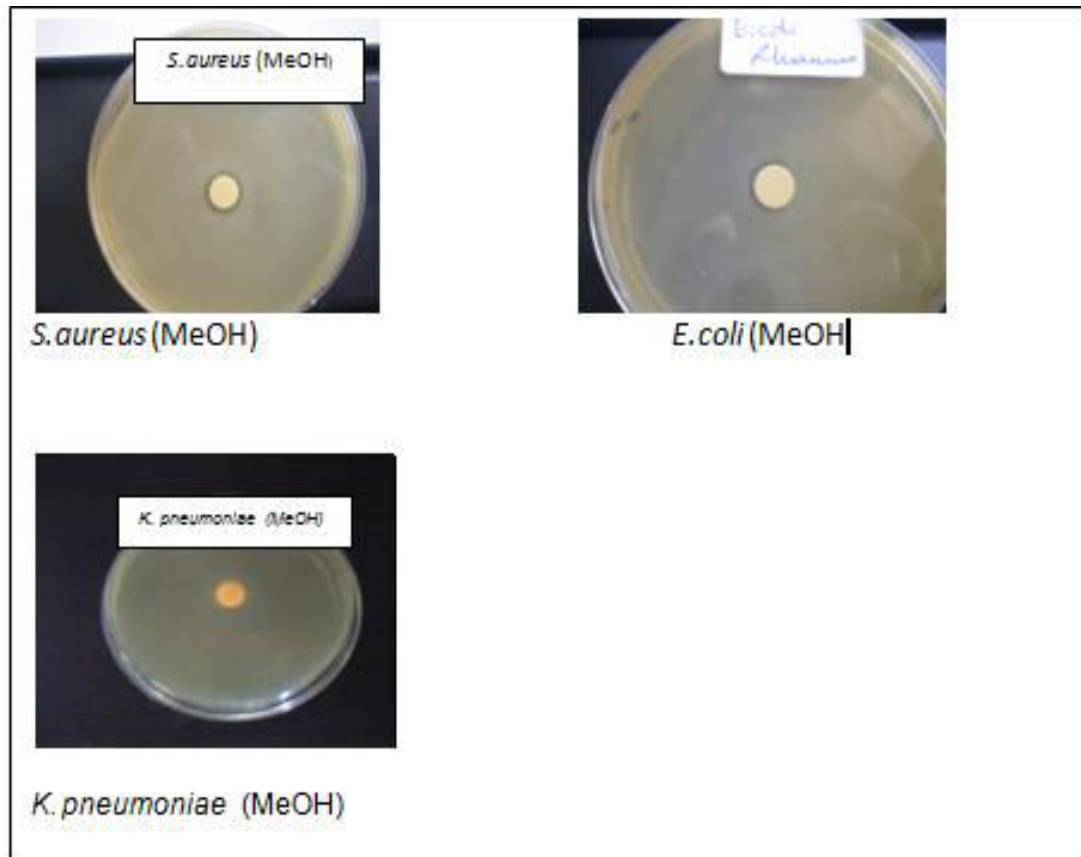


Figure 3.13 : Les différentes ZI de croissance de MeOH et de l'infusé sur quelques souches bactériennes testées (Original)

✓ Les antibiotiques

L'antibiogramme a pour but de prédire la sensibilité d'un microorganisme vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques. Les antibiotiques testés sont : le chloramphénicol (Ch) (10 mcg), l'acide pipémidique (PI) (20 mcg) et l'acide fusidique (FA) (30 mcg). Les mesures de celles-ci sont présentées dans le tableau 3.10 et figure 3.14.

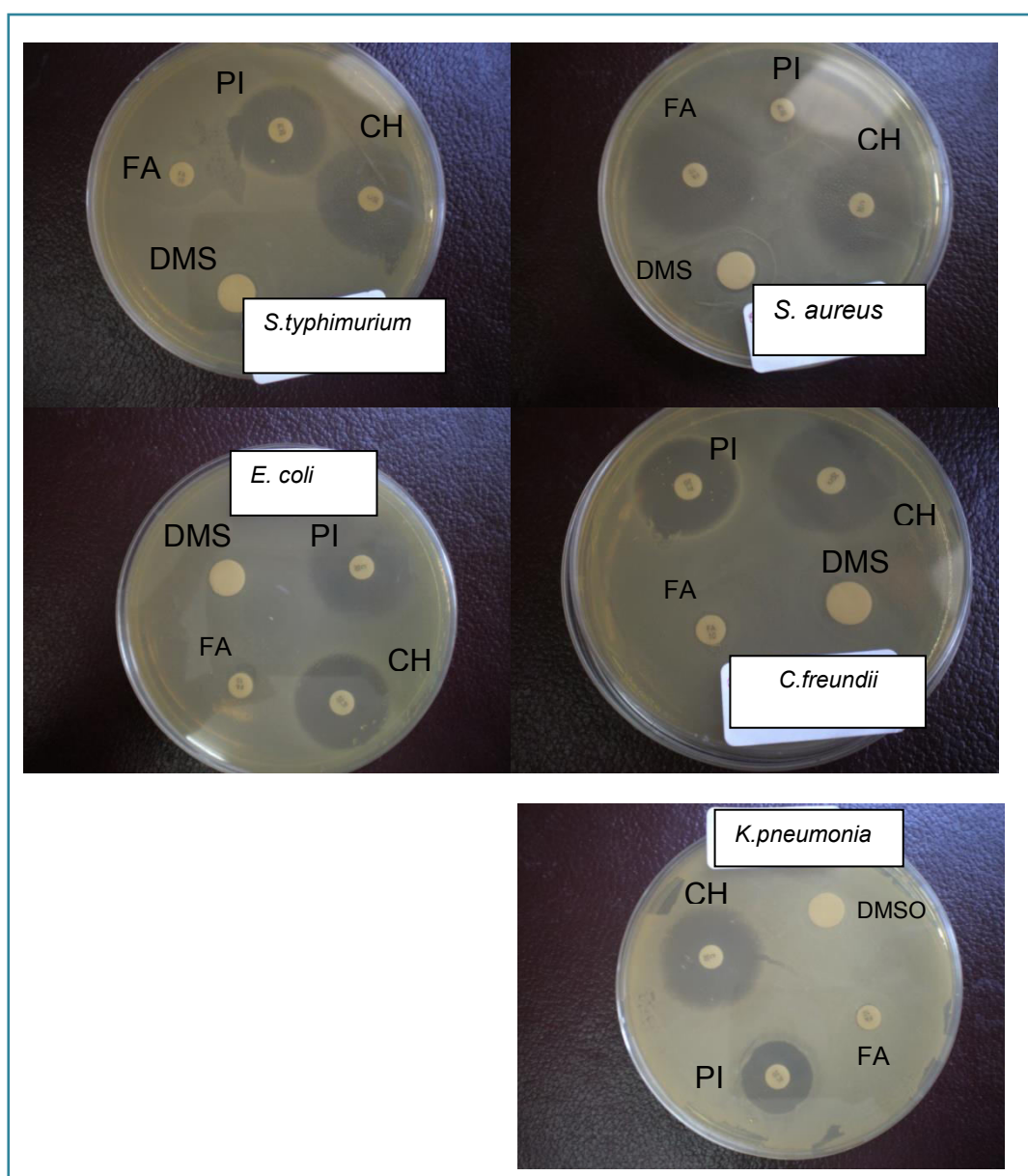


Figure 3.14 : Effet des antibiotiques et du DMSO sur les bactéries étudiées

Tableau 3.10 : Diamètres de la ZI en mm en présence des antibiotiques

Les souches	CH	PI	FA
<i>Staphylococcus aureus</i>	26.45 ± 0.015	9.86 ± 0.01	29.88 ± 0.05
<i>Salmonella typhimurium</i>	26.93 ± 0.015	22.1 ± 0.1	6.15 ± 0.02
<i>Citrobacter freundii</i>	26.1 ± 0.1	23.85 ± 0.05	7.95 ± 0.005
<i>Escherichia coli</i>	27.53 ± 0.01	23.7 ± 0.17	7.96 ± 0.01
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25.49 ± 0.34	17.13 ± 0.05	6.5 ± 0.005

La figure 3.15 résume l'effet des antibiotiques sur les bactéries étudiées.

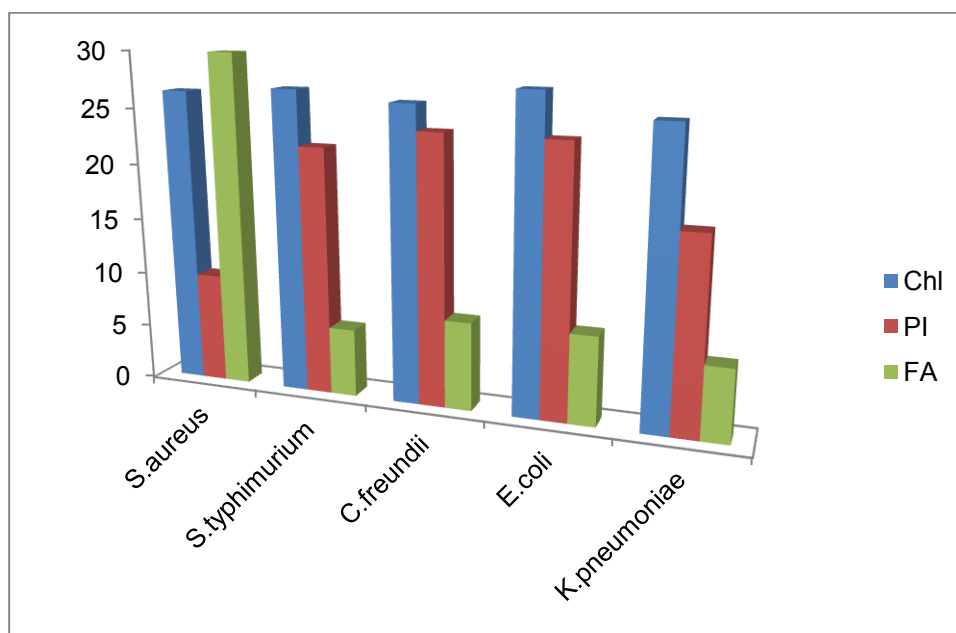


Figure 3.15 : Effet des antibiotiques sur les bactéries étudiées

- ✚ Nos résultats révèlent que l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* L. a montré une activité légèrement inhibitrice sur trois souches bactériennes à savoir *S.aureus*, *E.coli* et *C.freundii* (Figuer 3.12). Cette activité demeure faible par rapport à celle du chloramphénicol, de l'acide pipémidique et de l'acide fusidique utilisés comme antibiotiques de référence :
- ✚ *S.aureus* s'est montrée sensible à l'action de l'acide fusidique et du chloramphénicol. Elle est insensible à l'action de l'acide fusidique.
- ✚ l'acide pipémidique et le chloramphénicol ont donné une activité modérément inhibitrice avec *C.freundii* et *E.coli*.
- ✚ Le diamètre d'inhibition du **chloramphénicol** est compris entre 27.53 et 25.49 mm pour les 5 souches bactériennes testées. Cela permet de les classer parmi les microorganismes sensibles à cet antibiotique.

- ✚ Par ailleurs, l'**acide pipémidique** a donné une activité modérément inhibitrice avec *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*. Le diamètre d'inhibition est compris entre 17.13 et 23.85 mm. L'activité d'un extrait est probablement due à la présence de synergie entre un nombre de composants. Cela est interprété par le fait que les plantes produisent une variété énorme de petites molécules antibiotiques ayant un large spectre de structures telles que les terpénoïdes, les glycostéroïdes, les flavonoïdes et les polyphénols. Cependant, la plupart de ces petites molécules ont une faible activité antibiotique par rapport aux antibiotiques communs produits par des micro-organismes (bactéries et champignons) ou de synthèse chimique [111].
- ✚ D'après la figure 3.14 le DMSO utilisé comme solvant est approprié et ne présente aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes. L'infusé à 10 % n'a cependant produit aucun effet inhibiteur vis-à-vis de toutes les souches bactériennes testées.
- ✚ La méthode d'extraction aqueuse ainsi que la quantité d'extrait mise dans les disques pourraient être à l'origine de ces résultats. Plusieurs études ont rapporté que les extraits aqueux de certaines plantes ne présentent aucune activité antibactérienne, alors que les extraits organiques et les huiles essentielles de ces plantes inhibent très significativement la croissance des souches testées [112]. Selon CANDAN et ses collaborateurs [112], les substances hydrosolubles exercent un effet plus faible comparé à celui des substances non hydrosolubles. Cela réfère probablement à la capacité des molécules liposolubles de s'insérer dans les membranes des cellules bactériennes et les endommager.
- ✚ Nos résultats ne concordent pas avec ceux de HARRAR [98] qui affirme que l'extrait méthanolique des feuilles et des tiges de *Rhamnus alaternus* L. ne présente aucune sensibilité sur les mêmes bactéries testées.
- ✚ Il a été montré par KRIMAT et ses collaborateurs [101] que l'extrait méthanolique a un effet modérément inhibiteur sur *S.aureus* avec un diamètre de 14 mm. La souche *E.coli* s'est montrée résistante et *P.aeruginosa* s'est montrée sensible avec un diamètre de 19.5 mm.

- ✚ La sensibilité de la souche *S.aureus* à l'extrait méthanolique peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries Gram + aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH et les extraits naturels dus à l'absence de la membrane externe [113].
- ✚ D'après GARRETT ET GRISHAM [114], la plupart des bactéries Gram - sont généralement plus résistantes que celles à Gram +. Ces résultats pourraient être dus à la composition de la membrane des bactéries Gram -. En effet, ces dernières possèdent une membrane qui présente une perméabilité sélective; la surface des lipopolysacharides contient des charges négatives, qui empêchent la diffusion des molécules hydrophobes et des porines qui bloquent le passage des molécules à haut poids moléculaire. *P.aeruginosa* contient dans sa membrane des porines de faibles perméabilités.
- ✚ La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne influe aussi sur les résultats. NATARAJAN et *al.*, [115] et FAZELI et *al.*, [116] ont constaté que la méthode de diffusion à partir des puits sur gélose est plus adaptée pour étudier l'activité des extraits aqueux et organiques que la méthode de diffusion en milieu gélosé.
- ✓ La levure *Candida albicans*

Une activité modérément inhibitrice a été observée vis-à-vis de *Candida albicans* à l'action de l'infusé de 10%. La valeur moyenne de leur halo d'inhibition est supérieure à 15 mm de diamètre. Tandis que l'extrait MeOH s'est montré inactif sur la même levure testée.

CONCLUSION

Le présent travail avait pour objectif de déterminer la composition chimique de *Rhamnus alaternus* L., très utilisée en Algérie, et d'en connaître éventuellement le ou les principes actifs lui conférant des propriétés thérapeutiques.

Pour ce faire, nous avons au préalable effectué un screening préliminaire des différentes familles de métabolites secondaires contenues dans les feuilles de *Rhamnus alaternus* L.. Il a démontré sa richesse en métabolites secondaires, notamment en composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les tanins et les composés anthracéniques. Cependant, il y a moins de saponines et d'alcaloïdes.

L'utilisation du procédé d'extraction par le soxhlet a permis de séparer et de les molécules polaires et apolaires. Ainsi, nous avons obtenu un extrait méthanolique avec un rendement moyen de 20% en composés polaires.

La quantification par des méthodes spectrophotométriques nous a permis de déterminer les teneurs en phénols totaux contenus dans l'extrait méthanolique par le réactif du Folin-Ciocalteu et en flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium. Les résultats obtenus nous ont révélé que la plante étudiée constitue une source prometteuse en polyphénols ($664,10 \pm 8,89$ mg EAG/g d'extrait). La teneur en flavonoïdes est de $158,07 \pm 3.57$ mg EQ/ g d'extrait.

L'activité antioxydante de l'extrait méthanolique a été évaluée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH. Elle a montré une concentration inhibitrice de $0,435 \pm 8.04$ mg/ml.

L'étude de l'activité antimicrobienne a révélé que l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* L. témoigne d'une activité légèrement inhibitrice envers les souches *Echerichia coli*, *Citrobacter freundii* et *Staphylococcus aureus*.

Le présent travail nous a permis de contribuer à la valorisation de *Rhamnus alaternus* L. par le biais de l'étude phytochimique et de l'activité antioxydante et antibactérienne. Cette étude mérite d'être complétée par un certain nombre de travaux. Ainsi, on se propose de :

- faire des études plus poussées, en utilisant des techniques de pointes pour l'identification des structures de nos composés tel que: l'H.P.L.C couplée à la masse et la R.M.N ;
- réaliser d'autres études pour évaluer le potentiel antioxydant in vitro,
- Élargir l'étude du spectre de l'activité biologique de la plante étudiée (contre d'autres bactéries, contre les insectes, contre les champignons).

REFERENCES

- 1 OMS (Organisation Mondiale de la Santé)., " Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle". WOH/TRM/2000.1. annexe II, 2000, pp. 31-35.
- 2 Mwambete, K. D., "The in vitro antimicrobial activity of fruit and leaf crude extracts of *Momordica charantia*: a tanzania medicinal plant", H. Sci, Éd., 2009, pp. 34-39.
- 3 FELIDJ, M., BOUAZZA, M. et FEROUANI T., "Note sur le cortège floristique et l'intérêt de la plante médicinale *Ammoides pussila* (verticillata) dans le Parc national des Monts de Tlemcen (Algérie occidentale)", Geo-Eco-Trop, 2010, p. 147 – 154.
- 4 Bruneton, J. "Pharmacognosy: phytochemistry and medicinal plants", Lavoisier éd., 1999, p. 1119.
- 5 Gazengel, A. et Orecchioni, J., "Le préparateur en pharmacie, Guide thérapeutique et pratique". 2eme Ed., Lavoisier, 2013, 1761P: 1251,1255, 1257..
- 6 Elqaj, M., Ahami, A., et Belghyti, D, "La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires, Maroc: Journée scientifique" . ressources naturelles et antibiotiques, 2007.
- 7 Macheix, J.J., Fleuriet, A ., Jay-Allemand, C., "Les composés phénoliques des végétaux: Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique", Presse polytechnique et universitaire romandes collection biologie, 2005, p. 192.
- 8 HARTMANN, T., "From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism.", Phytochemistry, 2007, p. 68:2831–2846.
- 9 Fardet, A., Rock, E., Rémésy, C., "Is in vitro antioxidant potential of whole grain cereals and grain cereals and cereals products well reflected in vivo", Journal of Cereal Science, 2008, pp. 258-276.

- 10 Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A. et Fernández-Gutiérrez, A., "Phenolic-compound extraction systems for fruit and vegetable samples molecules", 2010, pp. 8813-8826.
- 11 Collin, S. et Crouzet J., "Les polyphénols de la pomme. Impact des procédés cidricoles", Paris: Lavoisier TEC & doc, 2011, pp. 103-158.
- 12 Chira, K., Suh, J., Saucier, C. et Teissède, P., "Les polyphénols du raisin. Phytothérapie", 2008, pp. 75.
- 13 Ghedira, K., "Les flavonoides : Structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique". Phytothérapie, 2005, pp. 162-169.
- 14 Harborne, J. B., "The flavonoids Advances.", Chapman et Hall, London, 1993, pp. 617-652
- 15 Carroll, K. K ., Guthrie, N ., So, F. V . et Chambers, A. F., "Anticancer properties of flavonoids with emphasis on citrus flavonoids. Flavonoids in Health and Disease", Marcel Dekker Inc: NewYork, 1998, pp. 437.
- 16 Hagerman Ann E., "Tannin Handbook.", Miami University, 2006.
- 17 Guignard, J., "Biochimie végétale", 2ème édition Dunod., 2000, p. 188
- 18 Guingard, J., "Biochimie végétale", Paris : Lavoisier, 1999, pp. 175-192 .
- 19 Leclercq, B. et Larbier, M., "Nutrition et alimentation des volailles", 1992, p. 355.
- 20 Bruneton, J., "Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales". 4e Ed, Paris: Lavoisier, 2009, p. 1269.
- 21 Nascimento, M. S., Santana., A.; Maranhão, C. A ., Oliveira, L. S. et Bieber, L, "Phenolic Extractives and Natural Resistance of Wood Agricultural and Biological Sciences", Biodegradation - Life of Science, 2013.
- 22 Hennebelle, P., Whitworth, A ., Cha, S.-H ., Goodwin, S., "Monthly Notices of the Royal Astronomical Society", 2004, pp. 340-870.
- 23 Kansole, M., "Etude Ethnobotanique, phytochimique et atcivités biologiques de quelques lamiaceae du Burkinafaso", Mémoire de Diplôme d'Etude, 2009.
- 24 Zhang, W. J. et Bjorn, L., "The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants". Fitoterapia., 2009, pp. 207-

218.

- 25 Danoun, G., "Développement de nouvelles stratégies de synthèses d'alcaloïdes basées sur la métathèse d'oléfines hétérosubstituées". Thèse de doctorat de l'université de Grenoble, 2011, p. 8.
- 26 Catier, O., "Botanique, pharmacognosie, phytothérapie", France: Wolters Kluwer, 2007, p. 64.
- 27 Bouhadjera, K., "contribution a l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana* R.Br. et *Aristida pungens* L.", Thèse de doctorat de l'université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, 2005, p. 37.
- 28 Cardon, D. et du Chatenet, G., "Le guide des teintures naturelles", Paris: Delachaux et Niestlé, 1990.
- 29 Cardon, D., "Le monde des teintures naturelles", Paris, 2003.
- 30 Derickx, L. et Antunes, P. M. "A guide to the identification and control of exotic invasive species in Ontario's hardwood forests", Algoma University, 2013, p. 294.
- 31 Beloued, A., "Plantes médicinales de l'Algérie", 2005, pp. 28-216.
- 32 Rameau, C., Mansion, J., Dumé D. et Gauberville C., "Flore forestière française" (guide écologique illustré), tome 3 : Région méditerranéenne, Institut pour le Développement Forestier, 2008, p. 2426 .
- 33 Couplan, F., " Les plantes et leurs noms: Histoires insolites", Quae, 2012, p. 223 .
- 34 Debeaux, J., "Flore de la Kabylie du Djurdjura, ou, Catalogue méthodique et raisonné de toutes les plantes vasculaires et spontanées observées jusqu'à ce jour dans cette contrée", Paris: Ed. P. Klincksieck, 1984, pp. 81-82.
- 35 Baba Aissa, F., "Encyclopédie des plantes utiles" (Flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique, d'orient et d'occident), Rouiba, Algérie: EDAS-Librairie, 2000, p. 45.
- 36 Gubb, A., "La flore algérienne, naturelle et acquise", Alger: A. Jourdan, 1913, pp. 16-17.
- 37 Botineau, M., "Botanique systématique appliquée des plantes à fleurs",

- France: Lavoisier, 2010, p. 1403 .
- 38 Boullard, B., "Plantes médicinales du monde: croyances et réalités", De Boeck Secundair, 2001, p. 957.
- 39 Jauzein, P. et Nawrot O., "Flore d'Île-de-France: Clés de détermination, taxonomie", statuts, Quae, 2013, p. 392.
- 40 Sullivan, M., "The Trees of San Francisco", Wilderness Press, 2013, p. 42.
- 41 Tassin, C., "Paysages végétaux du domaine méditerranéen", IRD, 2012, p. 97.
- 42 Kovganko, N.V., Kashkan, Z.N ., Borisov, E.V; Batura, E.V, "¹³C NMR spectra of β -sitosterol derivatives with oxidized rings A and B". Chem. Nat. Compd., 2000, pp. 646-649.
- 43 Schoeb, J ., Sc., B., Truax, B., D, Ph. et Gagnon, D ., Le nerprun bourdaine un envahisseur à la conquête des forêts du sud du Québec, 2012.
- 44 Boukef, M., "Médecine traditionnelle et pharmacopée, les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne"., Tunis: Agence de coopération culturelle et technique, 1986, p. 350.
- 45 Jauzein, P., Nawrot, O., "Flore d'Île-de-France: Clés de détermination, taxonomie, statuts.", Editions Quae, 2013, p 392.
- 46 Small E. et Catling, P. M., "Les cultures médicinales canadiennes", NRC Research Press, 2000, p. 158.
- 47 Jacques, B. et A. R, Biochimie métabolique, Paris: Ellipses, 2004, pp. 217-219.
- 48 Kocchlin-Ramonatxo, C., "Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation of another way of nutrition in respiratory diseases". Nut Clin Metabo., 2006, pp. 165-177.
- 49 Lehucher-Michel, M.P ., Lesgards, J.F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P. et Prost, M., "Stress oxydant et pathologies humaines", La Presse médicale, 2001, pp. 1076-1081.
- 50 Della, G. M., Previtera, L., Temessi F. et A. Carreli, "Lowmolecular-weight components of olive oil mill waste-waters", Phytochem. Analys, 2004, pp. 184-

188.

- 51 Boyd, B., Ford, C., Koepke, M.C., Gary K., Horn, E., McAnalley, S et McAnalley, B., Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé, *Glycoscience & Nutrition.*, 2003, p. 7.
- 52 Halliwell, B. et Gutteridge, J. M. C., "Free Radicals in Biology and Medicine", 4e édition éd., Oxford: Oxford University Press, 2007.
- 53 Tang, S. Y. et Halliwell, B., "Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies". *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 2010, pp. 1-5.
- 54 Vergely C. et Rochette, L., "Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire ", *Médecine thérapeutique Cardiologie*, vol. 1, 2003, pp. 131-139.
- 55 Hu, F. B., "Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview", *American Journal of Clinical Nutrition*, 2003, pp. 544-551.
- 56 Halliwell, B., " Free radicals and antioxidants: A personal view", *Nutrition Reviews*, 1994, pp. 253-265.
- 57 Ketsawatsakul, U., Whiteman, M. et Halliwell, B., " A reevaluation of the peroxynitrite scavenging activity of some dietary phenolics", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, pp. 692-699..
- 58 Gulcin, I., Huyut, Z., Elmastas M. et Aboul-Enein, H. Y., "Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid", *Arabian Journal of Chemistry*, 2010, pp. 43-53.
- 59 Sandhar, H. K., Kumar, B., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan M. et Sharma P., "A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids", *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 2011, pp. 25-41.
- 60 Le, K., Chiu F. et Ng, K., "Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*", *Food Chemistry*, 2007, pp. 353-363.
- 61 Verdan, A. M., Wang, H. C., García, C. R., Henry W. P. et Brumaghim, J., Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal

- binding sites., JoUrnal of Inorganic Biochemistry, 2011, pp. 1314-1322.
- 62 Ekoumoun, C., "Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite", thèse de doctorat de l'université de Bamako, 2003.
- 63 Diallo, A., "Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd (Myrtaceae)" These pour obtenir le Grade de Docteur en Pharmacie, UNIVERSITE DE BAMAKO, 2005, pp. 38-42.
- 64 Yala, D., Merad, A., Mohamedi, D. et Ouar Korich, M. N., "Classification et mode d'action des antibiotiques", Revue : médecine du Maghreb, 2001.
- 65 Elghozi, J. et Duval, D., "Pharmacologie 2ème Ed : Médecine Flammarion", Paris, 1992, p. 289.
- 66 Cohen, Y. et Jacquot, C., "Pharmacologie", 5ème Ed, Paris: Masson, 2001, p. 350.
- 67 Billing, J. et Sherman, P. W., "Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot", Rev. Biol, 1998, pp. 3-49.
- 68 Cowan, M. M., "Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin, Microbiol" Rev., 1999, pp. 564-582.
- 69 Riffel, A., Medina, L.-F., Stefani, V., Santos, R.-C., Bizani, B., "In vitro antibacterial Activity of a new series of 1, 4- naphtaquinones".Brazilian journal of medical and biological research, 2002, pp. 811-818.
- 70 Benidicte F. et Hooper D., "Effect of mutation in GRIA of topoisomerase IV, from staphulococcus aureus on quinplene", 1998, pp. 2109- 2112.
- 71 Benkiki, N., " Etude phytochimiques des plantes médicinales Algérienne : *Ruta montana*, *Matricaria pubescences* et *Hypericum perforiatum*" Thèse de Doctorat, Université de BATNA., 2006.
- 72 Alan L. et Miller N., "Antipxydant flavonoïdes, fonction and clinical usage", Alternative Medecine, Review, 1996, pp. 4-10 .
- 73 Marfak, A., "Radiolyse gamma des flavonoïdes . étude de leur réactivité avec les radlcaux issus des alcools : formation des depsides" ; these de Doctorat,

Université de Limoges, 2003, pp. 23-25.

- 74 Moroh J.L. A., "Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de *Morinda morindoides*", UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE, France, 2013, pp. 23-24-25.
- 75 Zerrad, W., Hillali, S., Mataoui, M., El antris, B. S. et Hmeyem, A., "Etude comparative des mécanismes biochimiques et moléculaires de résistance au stress hydrique de deux variétés de blé dur". Laboratoire de biochimie et d'environnement., Maroc, 2006.
- 76 Treche, S . Agbor, E.T., « Composition minérale des ignames cultivées au Cameroun », Rev. Sc. Tech, 1986, pp 38-55.
- 77 Nganguem, M., "Approche physico-chimique du pouvoir conservateur du sel: Cas du salage de *Pseudotolithus senegalensis*", Maitrise professionnelle de biotechnologie dans IAA., Université d'Abomey-Calavi, 2007.
- 78 N'Guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G., Traoré, D. et Aké-Assi, NL., "Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire)", Sci Nat, 2009, p. 15.
- 79 Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Idrissi Hassani, L. et Badoc, N. B., " Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *Thymelaea lythroides*", Soc. Pharm, Bordeaux, vol. 142, 2003, pp. 61-78.
- 80 Luque de Castro, M. et García-Ayuso, L., "Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future", vol. 369, Analytica Chimica Acta, 1998, pp. 1-10.
- 81 Calvet, R., Barriuso, E., Bedos, C., Benoit, P., Charnay M.-P. et Coquet, Y., "Les pesticides dans le sol, Conséquences agronomiques et environnementales", Catégorie : Biologie, France agricole, 2005, p. 637 .
- 82 Kaloustian, J. et Hadji-Minaglou, F., « La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie: Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée », Springer Science & Business Media, 2013, p. 226.
- 83 Amrani, O., "Valeur nutritive du Chardon marie (*Silybum marianum*)", Mémoire de magistère agronomie, université de batna, 2006, p : 81.

- 84 Singleton, V.L. et Rossi, J., "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents," American Journal of Enology and Viticulture, 1965, p. 144–158.
- 85 Singleton, V. L., Orthofer, R. et Lamuela-Raventós, R. M., "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent," Methods in Enzymology, vol. 229, 1998, p. 152–178.
- 86 Ribereau, G. P., "Les composés phénoliques des végétaux", Paris : Dunod, 1968, p. 254.
- 87 Dehpour, M. A., Ibrahimzadeh, N., Fazel, S. et Seyed, M., Antioxydant activity of the methanol extract of *Ferulaas safoetida* and its essential oil composition. Grasas Y Aceites, vol. 60, 2009, pp. 405-412.
- 88 Bernardi, A. P. M., López–Alarcón, C., Aspee, A., Rech, S., L, Von Poser, G., Bride, R. et Lissp, E., "Antioxidant activity of flavonoids isolated from *Hypericum ternum*". Journal of the chilean chemical Society, 2007, pp. 1326-1329.
- 89 Saha, M.R., Hasan, S.M.R., Akter, R., Hossain, M.M, Alam, M.A. et Mazumder, M. "In vitro free radical scavenging activity of methanol extract of the leaves of *Mimusops elengi* Linn", vol. 6(2), Bangl.J.Vet.Med, 2008, pp. 197-202 .
- 90 Dulger, B. et Gonuz, A., "Antimicrobial activity of some turkish medicinal plants", Pakistan journal of biological sciences, 2004, pp. 1559-1562.
- 91 Parekh, J. et Chanda, S. V., "In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plant", Turkish journal of biology, 2007, pp. 53-58.
- 92 Rota, M. C., Herrera, A., Martinez, R. M., Sotomayor, J. A. et Jordán, M. J., "Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils". Food control, 2008, pp. 681-687.
- 93 Meena, M. et Sethi, V., "Antimicrobial activity of the essential oils from spices", J., Food. Sci. and Tech, Mysore, 1994, pp. 68-70.
- 94 Ella, M., El-Shaer, N. et Ghanem, N., "Antimicrobial and chromatographic analysis of some essential and fixed oils", Pharmacie, 1996, pp. 993-995.
- 95 Hamadou, S., "Caracéristiques physico-chimique de *Rhamnus alaternus* L. et

- ses effets toxiques et thérapeutiques". Mémoire Ingénieur d'état en biologie, Université de Blida, 2007, pp. 48-49.
- 96 Ben Ammar, R., Kilani, S., Bouhlel, I., Skandrani, I., Naffeti, A., Boubaker, J., Ben Sghaier, M., Bhourri, W., Mahmoud, A., Chekir-Ghedira, L. et Ghedira, K., "Antibacterial and cytotoxic activities of extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae)", *Mic*, 2007, pp. 453-460.
- 97 Li, H. B., Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan, K. W., Chen, F. et Jiang, Y., "Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae", *Food Chemistry*, 2007, pp. 771-776.
- 98 Harrar, A., "Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L.", Mémoire de Magister, Université Ferhat Abbas, Sétif, 2012, pp 31-46.
- 99 Mohammedi, Z., "Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région du Tlemcen", Thèse de magistère, Université-Abou Bakr Belkaid-Telemcen , 2005, pp 89.
- 100 Boussahel, S., Dahamna, S., Giuseppe, R., Siracusa, L. et Harzallah, D., "Phytochemical Study and Antioxidant Activities of Leaves Extracts from *Rhamnus alaternus* L.", *Pharmacognosy Communications*, 2013, pp. 43-56.
- 101 Krimat, S., Dob, T., Lamari, L., Boumeridja, S. et Chelghoum, C. M. H., "Antioxidant and antimicrobial activities of selected medicinal plants from Algeria", *Journal of Coastal Life Medicine*, 2014, pp.478-483.
- 102 Kosalec, L., Kremer, D., Locatelli, M., Epifano, F., Genovese, S., Carlucci, G., Randić, M. et Zovko Končić, M., "Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial activity of bark extracts of *Rhamnus alaternus*, *Rhamnus fallax*, *Rhamnus intermedia* and *Rhamnus pumila*", *Food Chem*, 2012, pp.335-41.
- 103 Vuorela, S., "Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics", Helsinki, 2005.
- 104 Gomez-Caravaca, A., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A. et Fernandez-Gutierrez, A., " Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees", *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, pp. 1220-1234.
- 105 Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Vidal, N., Lesgards, J. F. et

- Stocker, P., "Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity", *Eur, Food Res, Technol*, 2007, pp. 801-809.
- 106 Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M. et Abdelly, C., "Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities", *C.R. Biol*, 2008, pp. 372-379.
- 107 Podsedek, Natural antioxidants and antioxidant capacity of *brassica* vegetables: A review, *LWT-Food Sci. Technol.*, 2007, pp. 40: 1-11.
- 108 Rawel, H., Meidtnr, K. et Kroll, J., "Binding of selected phenolic compounds to proteins", *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2005, pp. 53:4228-4235.
- 109 Sokol-letowska, A., Oszmiansk, J. et Wojdylo, A., "Antioxydant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap", *Food Chem*, 2007, pp. 103: 853-859.
- 110 Ben Ammar, R., Kilani, S., Bouhlel, I., Ezzi, L., Skandrani, I., Boubaker, J., Ben Sghaier, M., Naffeti, A., Mahmoud, A., Chekir-Ghedira, L. et Ghedira, K., "Antiproliferative, Antioxidant, and Antimutagenic Activities of Flavonoid-Enriched Extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L. : Combination with the Phytochemical Composition", *Drug. Chem. Toxicol*, vol. 31, 2008, pp. 61-80.
- 111 Sarker, S.D., Latif, Z. et Gray, A., "Natural Product Isolation", Humana Press (Totowa), 2005, pp. 1-23.
- 112 Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A. et Akpulat, H.A., "Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae)", *Journal of Ethnopharmacology*, 2003, pp. 215-220.
- 113 Balentine, C., Crandall, P., O'Bryan, C., Duong, D. et Pohlman, F., "The preand post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef ", *Meat Science*, 2006, pp. 73: 413-421.
- 114 Garrett, R.H. et Grisham, C. M., "Les transports membranaires". In *Biochimie*, Ed DeBoeck, 2000, p. 314.

- 115 Natarajan, D., John Britto, S., Srinivasan, K., Nagamurugan, N., Mohanasundari, C. et Perumal, G., "Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*-A rare medicinal herb", J. Ethnopharmacol, 2005, pp. 123-126.
- 116 Fazeli, M. R., Amin, G., Ahmadian-Attari, M. M., Ashtiani, H., Jamalifar, H. et Samadi, N., "Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria". Food Control, 2007, pp. 646-649.

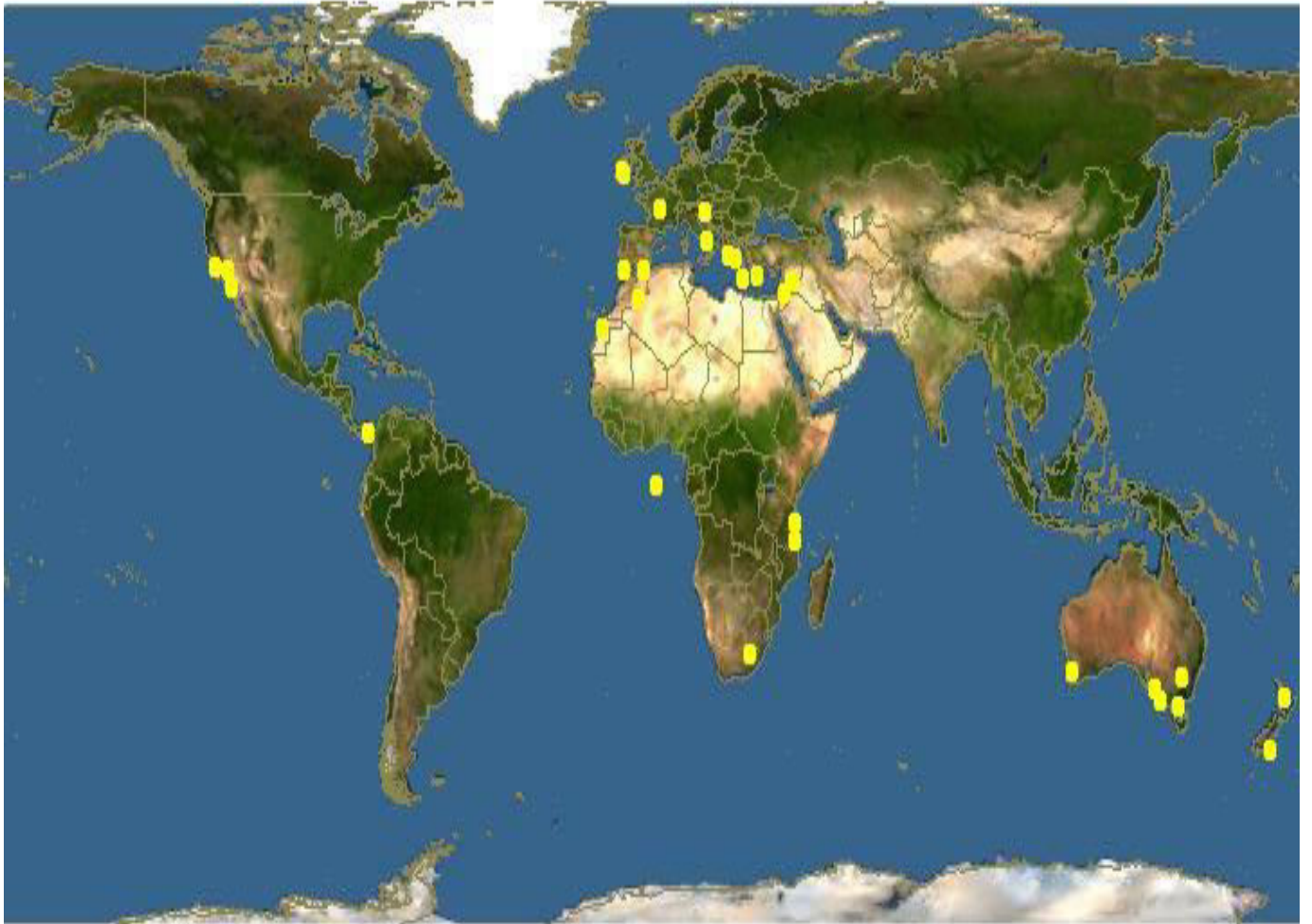
APPENDICE A

Liste des abréviations

DMSO	: Dimethylsulfoxyde
DPPH	: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
ERO	: Espèce Réactive de l'Oxygène
FC	: Folin Ciocalteu
Gx	: Grossissement
HPLC	: Chromatographie Liquide à Haute Pression
IC50	: Concentration Inhibitrice 50 %
IM	: Indice de Mousse
M	: Masse
Mf	: Masse fraîche
MH	: Muller-Hinton
Ms	: Masse sèche
Mo	: Microorganismes
MP	: Microscope Photonique
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
Rdt	: Rendement
T	: Teneur en eau
TH	: Taux d'Humidité
ZI	: Zone d'Inhibition

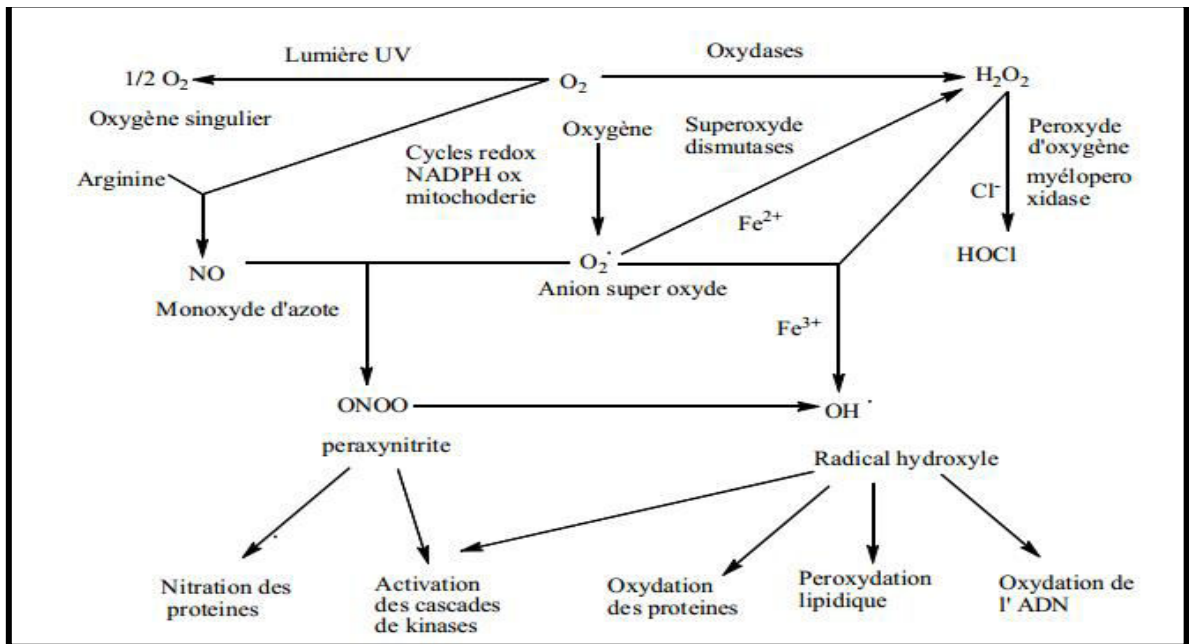
APPENDICE B

Répartition géographique de *Rhamnus alaternus* L. dans le monde



APPENDICE C

Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie



Espèces réactives oxygénées (ERO)	
Radicalaires	Non radicalaires
OH* Radical hydroxyle	H₂O₂ Peroxyde d'hydrogène
RO* Radical alkoxy	ROOH Peroxyde organique
ROO* Radical peroxy	HOCl Acide hypichloreux
O₂⁻ Anion superoxide	O₂¹ oxygène singulet
NO* Radical oxynitrique	ONOO* Peroxynitrite

APPENDICE D

Les souches microbiennes

Nom de la souche	Gram	Famille	Principales infections causées
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Micrococcaceae	Gastro-entérites ; infections urinaires ; l'ostéomyélite et l'arthrite
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	Entérobacteriaceae	infections respiratoires (pneumonies, abcès pulmonaires, pleurésies); infections nosocomiales.
<i>Escherichia coli</i>	-	Entérobacteriaceae	Infections urinaires ; infections abdominales ; diarrhées infectieuses.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Pseudomonadaceae	Infections pulmonaires ; infections du tractus urinaires ; infections du sang (bactériémie et/ou septicémie)
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	Enterobacteriaceae	toxi-infections alimentaires collectives
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Enterobacteriaceae	Diarrhées ; une gastroentérite sévère suivie parfois d'un syndrome hémolytique urémique
<i>Candida albicans</i> (levure)		Cryptococcaceae	Lésions cutanées ; Infections œsophagiennes; Infections génitales

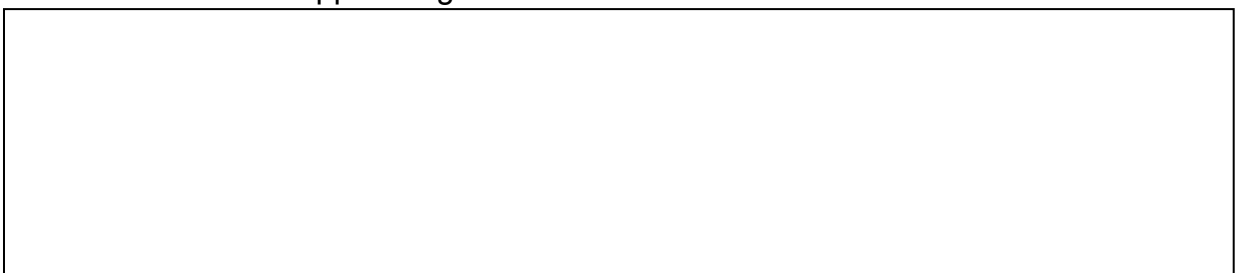
APPENDICE E

Appareillages

E1. Liste des appareillages

- Four à moufle
- Balance de précision
- Etuve ventilée
- Plaque chauffante
- Chauffe ballon
- Bain marie
- Evaporateur rotatif
- Hotte chimique
- Porte plaque
- Autoclave
- Etuve bactériologique
- Bec benzène
- Loupe binoculaire avec caméra
- Microscope photonique
- Spectrophotomètre de biochimie
- Spectrophotomètre UV
- Vortex
- Centrifugeuse de paillasse

E2. Photos de l'appareillage





Vortex



étuve de microbiologie



Autoclave



Évaporateur rotatif



Four à moufle

APPENDICE F

Verrerie et consommable

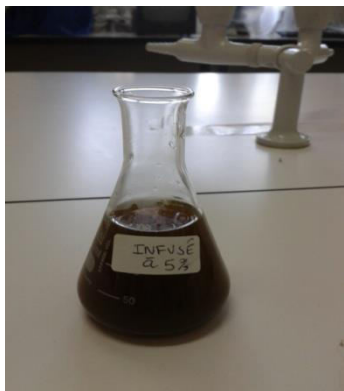
F₁.Liste de la verrerie

- Entonnoirs
- Bechers : 100 ml, 250 ml, 500 ml
- Erlenmeyer 100 ml, 250 ml
- Ballon à fond plat à col rodé
- Ampoules à décanter
- Tubes à essai
- Pipettes graduées stériles
- Lames en verre et lamelles
- Pipettes Pasteurs
- Tubes De Prélèvement Secs

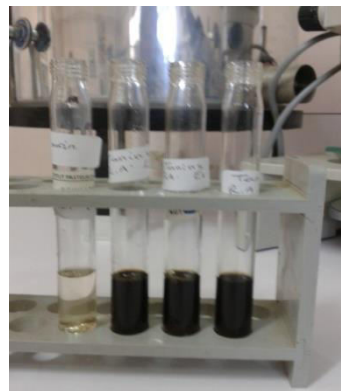
F₂.Liste du matériel consommable

- Anse de platine
- Boîtes de pétri stériles de 90 mm de diamètre
- Disques d'antibiogramme Stériles de 0,6 cm de diamètre (Sensi-Disc™)
- Lames de rasoir
- Papier filtre WHATMAN
- Portoirs
- Disques de 0.9 mm de diamètre

G₁. Photos du screening phytochimique



Infusé à 5% de *R. alaternus* L.
chlorure ferrique



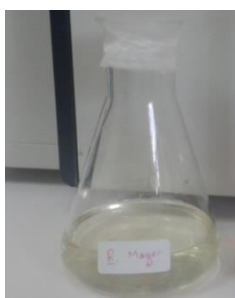
Caractérisation des tanins par le



Absence des anthocyanes
positive (Aucun virage)



Réaction de cyanidine



Réactif de Mayer



Réactif de Wagner

G₂ : Composition des réactifs de caractérisation des alcaloïdes

Réactif de MAYER :

Chlorure de mercure.....1,36 g

Iodure de potassium.....5 g

Eau distillée.....100 ml

Réactif de WAGNER :

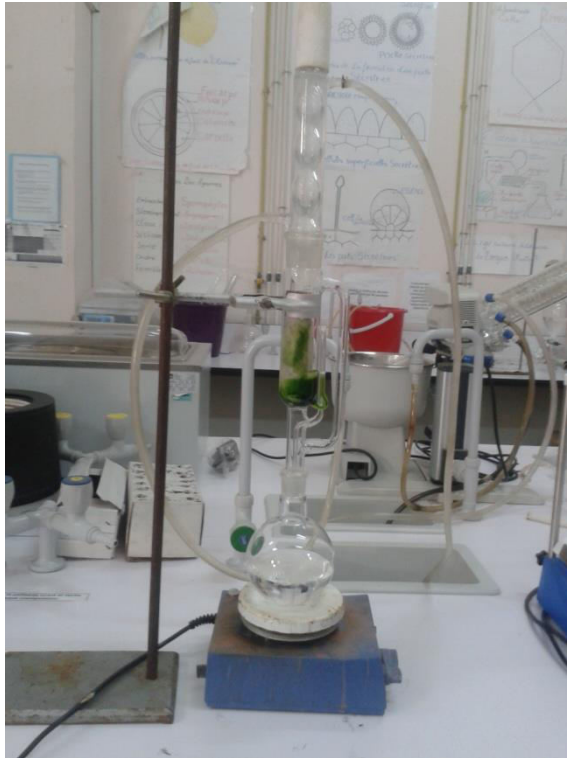
Iodure de potassium.....2 g

Iode.....1,27 g

Eau distillée..... 100 ml

APPENDICE H

Photo de l'extraction au soxhlet



APPENDICE I

I₁. Etude statistique du dosage des polyphénols et des flavonoïdes

✓ Statistiques descriptives (Polyphénols)

Variable	Descriptive Statistics (Spreadsheet1)							
	Valid N	Mean	Confidence -95,000%	Confidence 95,000	Minimum	Maximum	Std.Dev.	Standard Error
Taux polyphénols	3	1664,100	1642,027	1686,173	1653,840	1669,230	8,885	5,130000

✓ Statistiques descriptives (Flavonoïdes)

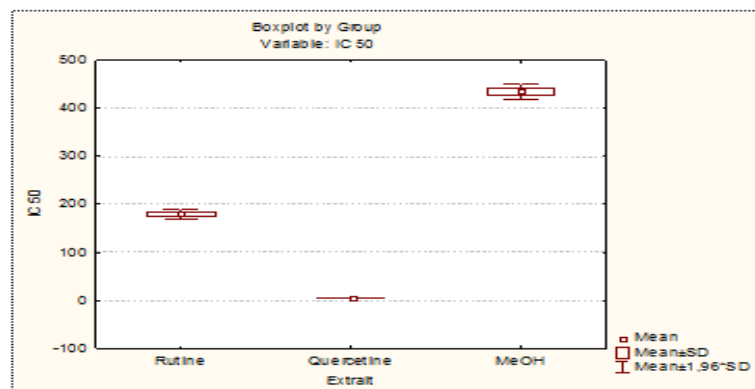
Variable	Descriptive Statistics (Spreadsheet1)							
	Valid N	Mean	Confidence -95,000%	Confidence 95,000	Minimum	Maximum	Std.Dev.	Standard Error
Taux des flavonoïde	3	158,0700	149,2062	166,9338	154,0000	160,6600	3,568151	2,060073

I₂. Étude statistique de l'activité antioxydante

✓ test de Kruskal-Wallis (non paramétrique)

Depend.: IC 50	Multiple Comparisons p values (2-tailed); IC 50 (Spreadsheet1) Independent (grouping) variable: extrait Kruskal-Wallis test: H (2, N= 9) =7,200000 p =,0273		
	MeOH R:8,0000	Rutine R:5,0000	Quercetine R:2,0000
MeOH		0,539137	0,021871
Rutine	0,539137		0,539137
Quercetine	0.021871	0.539137	

✓ Comparaison des valeurs des IC 50 obtenues



Appendice J

Glossaire

- **Antiallergique** : Qui est utilisé dans le traitement ou la prévention des allergies.
- **Antifongique** : Médicament utilisé dans le traitement des mycoses (infections par des champignons microscopiques).
- **Anti-inflammatoire** : Qui fait dégonfler, et diminuer l'irritation. La plupart des anti-inflammatoires sont aussi des antidouleurs.
- **Antispasmodique** : Substance qui permet de lutter contre les spasmes, agit généralement en empêchant la contraction musculaires de l'intestin et des voies urinaires.
- **Antithrombotique** : Contre la thrombose.
- **Antiviral** : Médicament utilisé dans le traitement des maladies virales
- **Arbrisseau** : plante ligneuse à tiges ramifiées dès la base. Sa forme est dite « buissonnante ».
- **Astringent** : qui resserre et raffermi les tissus.
- **Calice** : Enveloppe extérieure d'une fleur, formée des sépales, libres ou soudés, généralement de couleur verte, très rarement colorés.
- **Diurétique** : qui favorise l'élimination de l'urine.
- **Drogues végétales** sont essentiellement des plantes ou des parties de plantes (voire des algues, des champignons ou des lichens) qui sont utilisées dans un but thérapeutique. Les plantes ou parties de plantes sont utilisées entières ou coupées, le plus souvent après avoir été séchées, plus rarement à l'état frais.
- **Étamine** : Organe reproducteur mâle d'une fleur ; elle est composée d'une anthère habituellement à deux loges fixée à un filet.

- **Expectorant** : Fluidifiant bronchique facilitant l'expectoration des sécrétions produites par les voies respiratoires inférieures (trachée, bronches, alvéoles pulmonaires).
- **Glomérules** : inflorescence contractée, ayant la structure d'une cyme mais dont les axes sont très courts.
- **Infusions** : L'infusion est une méthode d'extraction des principes actifs ou des arômes d'un végétal par dissolution dans un liquide initialement bouillant.
- **Laxatif** : qui purge légèrement.
- **Pétale** : partie de la fleur située entre les sépales et les organes reproducteurs. Les pétales composent la corolle. Ils sont fixés au calice par un onglet.
- **Pharmacopée traditionnelle** : Une pharmacopée traditionnelle est une pharmacopée (une liste de produits thérapeutiques) décrivant des produits utilisés avant l'apparition des médicaments synthétiques modernes.
- **Phytothérapie**, étymologiquement le traitement par les plantes, est une méthode thérapeutique qui utilise l'action des médicinales. On peut distinguer deux types de phytothérapie : Une pratique traditionnelle, parfois très ancienne basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement. Une pratique basée sur les avancées scientifiques qui recherche des extraits actifs des plantes.
- **Principe actif** : est la molécule qui dans un médicament ou dans une plante possède un effet thérapeutique.
- **Purgatif** : Se dit d'une substance à l'action laxative puissante et rapide.
- **Sépale** : chacune des pièces formant le calice d'une fleur. Moins apparents que les pétales, les sépales sont généralement de couleur verte ou brune. On les remarque surtout quand la fleur est en bouton.

