



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département De Science De la Nature Et de La Vie

Filière : Science Biologique

N° d'ordre :

N° de série :

MEMOIRE PRESENTE EN VUE DE L'OBSTINATION DU DIPLOME DE MASTER

Option : biochimie Appliquée

THEME

Caractérisations phytochimiques et activités biologiques de Rhamnus alaternus

Présenté par :

- **Chettibi Kaouter**
- **Habchi Samia**
- **Diar Ahlem**

Devant le jury :

Président : Zeghib fouad

MCA Université d'Oum EL Bouaghi

Encadrant : Arhab Rabah

Pr. Université d'Oum EL Bouaghi

Examinatrice : Chaïb Samira

MAB Université d'Annaba

Année universitaire : 2022-2023





REMERCIEMENT :

*Nous remercions dieu le tout puissant de nous avoir enrichies de
volonté et de courage pour qu'à la*

Fin des longues années d'étude le fruit et pu être un cueillit.

*Nos plus vifs remerciements sont adressés à notre encadrant « Arhab
Rabah ».*

*Ne peux manquer aussi d'exprimer notre gratitude à toute l'équipe de
laboratoire de l'université et*

Surtout « chaïb Samira ».

*Et pour n'oublier personne, que tous ceux qui nos aidées de près où de
loin, que par leurs amitiés,*

*Leurs conseils où leurs soutien moral, trouvent dans ces quelques
lignes l'expression de nos profonde*

Reconnaisances.



DEDICACE :

Je dédie ce modeste travail :

À mes Parents qu'ils trouvent ici toute ma gratitude

Pour leur soutien tout le long de mes études

A mes chères sœurs nour el houda et salsabil

A mon mari karim

A mon fils ahmed et mouhamed

A ma princesse miral

A toute ma famille

A mes amies samia et ahlem

KAOUTER



DEDICACE :

Je dédie ce modeste travail :

A Ma chère mère

A L'esprit de mon père

A mes frères : Hachem et Mustapha

A mes sœurs : Hayet, Khaoula, Noussiba et Halla.

A la moitié de mon cœur : mon mari Zohir

A mes enfants : Baraâ, Tasnim, Ranim, et la petite Maysam aryam.

A mes partenaires : Ahlem et Kaouter

SAMIA



DEDICACE :

Je dédie ce modeste travail :

A Ma chère mère

A L'esprit de mon père

A mon frère : Nounou

A mon mari

*A mes enfants : abderrahmane et abdelghafour, younes et
abderrachide*

A mes partenaires : samia et Kaouter

A mes amies sœurs : raounak et ilhem

AHLEM

RESUME

Rhamnus alaternus est un arbuste qui appartient à la famille des Rhamnaceae. C'est une plante médicinale traditionnelle dans le groupe méditerranéen généralement, appelé « mlillesse » en Algérie, utilisé surtout dans les traitements hépatiques. Le rendement d'extraction a été estimé par trempage dans du méthanol pour les feuilles EMF 14% , l'écorce EME 12%,et les racines EMR10% , Pour le rendement en extrait aqueux de feuilles EAF 9% , d'écorces EAE 9% et de racines EAR 6% , Les teneurs en polyphénols totaux dans l'extrait de méthanol ,EMF ; EME ; EMR respectivement 8 mg EAG/g ; 6 mg EAG/g; 7 mg EAG/g ; Et pour la teneur totale en polyphénols dans l'extrait aqueux EAF ,EAE ;EAR respectivement 38 mg EAG/g ;36 mg EAG/g ;18 mg EAG/g , La teneur en flavonoïdes est déterminée par la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl₃), Les teneurs en flavonoïdes totaux dans l'extrait de méthanol ,EMF ; EME ; EMR respectivement 8 mg EQ /g; 18 mg EQ /g; 6 mg EQ /g; Et pour la teneur totale en flavonoïdes dans l'extrait aqueux EAF ,EAE ;EAR respectivement 18 mg EQ /g;20 mg EQ /g;14 mg EQ /g , Les tanins condensés sont déterminés par la méthode de la vanilline en milieu acide , Les teneurs en tanins condensés dans l'extrait de méthanol ,EMF ; EME ; EMR respectivement 21 mg EC /g; 19 mg EC /g; 11mg EC /g; Et pour la teneur totale des tanins condensés dans l'extrait aqueux EAF ,EAE ;EAR respectivement 15 mg EC /g;10mg EC /g;14 mg EC /g , L'activité antioxydante a été réalisée par la méthode test anti radicalaire évalué en utilisant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH.), les concentrations inhibitrices à 50 % (CI50) sont estimées à : Pour l'extrait de méthanol ,EMF ; EME ; EMR respectivement 80 µg/ml; 20 µg/ml; 50 µg/ml ; Et pour l'extrait aqueux EAF ,EAE ;EAR respectivement 63 µg/ml;70 µg/ml;62 µg/ml ; L'activité antibactérienne a été déterminée sur deux souches bactériennes (Gram+ et Gram-) (Echerichia-coli) (staphylococcus aureus). Selon la méthode de diffusion de disque, Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour E.coli, S.aureus est égal à 0,04 mg/ml dans tous les extraits . Nous concluons que dans tous les résultats obtenus, la teneur de l'extrait aqueux est supérieure à celle de l'extrait méthanolique, ce qui indique que la plante de Rhamnus alaternus a un effet significatif lorsqu'elle est trempée dans l'eau.

Mots clés : Rhamnus alaternus L., activité antibactérienne activité antioxydante. Polyphénols, test DPPH.

ABSTRACT:

Rhamnus alaternus. Is a shrub that belongs to the Rhamnaceae family. It is a traditional medicinal plant in the Mediterranean group generally, called "mlillesse" in Algeria, used especially in liver treatments. The extraction yield was estimated by soaking in methanol for the leaves EMF 14%, the bark EME 12%, and the roots EMR10%, For the yield of aqueous extract of leaves EAF 9%, bark EAE 9 % and roots EAR 6%, The contents of total polyphenols in the methanol extract, EMF; EME; EMR respectively 8 mg EAG/g; 6mg EAG/g; 7mg EAG/g; And for the total content of polyphenols in the aqueous extract EAF, EAE; EAR respectively 38 mg EAG/g; 36 mg EAG/g; 18 mg EAG/g, the flavonoid content is determined by the aluminum trichloride method (AlCl₃), The contents of total flavonoids in the methanol extract, EMF; EME; EMR respectively 8 mg EQ /g; 18mg EQ/g; 6mg EQ/g; And for the total content of flavonoids in the aqueous extract EAF, EAE; EAR respectively 18 mg EQ / g; 20 mg EQ / g; 14 mg EQ / g, The condensed tannins are determined by the method of vanillin in an acid medium , The contents of condensed tannins in the methanol extract, EMF; EME; EMR respectively 21 mg EC /g; 19 mg EC/g; 11mg EC/g; And for the total content of condensed tannins in the aqueous extract EAF, EAE; EAR respectively 15 mg EC / g; 10 mg EC / g; 14 mg EC / g, the antioxidant activity was carried out by the anti-radical test method evaluated using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle (DPPH.), the 50% inhibitory concentrations (IC₅₀) are estimated at: For the methanol extract, EMF; EME; EMR respectively 80 µg/ml; 20 µg/ml; 50 µg/ml; And for the aqueous extract EAF, EAE; EAR respectively 63 µg/ml; 70 µg/ml; 62 µg/ml; The antibacterial activity was determined on two bacterial strains (Gram+ and Gram-) (*echerichia-coli*) (*staphylococcus aureus*). According to the disk diffusion method, The minimum inhibitory concentrations (MIC) for *E. coli*, *S.aureus* is equal to 0.04 mg/ml in all extracts. We conclude that in all the results obtained, the content of the aqueous extract is higher than that of the methanolic extract, indicating that the *Rhamnus alaternus* plant has a significant effect when soaked in water.

Key words: *Rhamnus alaternus* L., antibacterial activity antioxidant activity. Polyphenols, DPPH test.

TABLES DES MATIERS

REMERCIEMENTS

DEDICACES

RESUME

TABLES DES MATIERS

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

LISTE DES ABREVIATIONS

Introduction1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Rhamnus alaternus

1) Propriétés botaniques.....4
 1.1. Généralité.....4
 1.2. Classification.....4
 1.3. Description botanique.....5
 1.4. Description de l’habitat6
 1.5. Nomenclature6
2) Compositions Chimiques7
 2.1. Les composés phénoliques7
 2.2. Les flavonoïdes7
 2.3. Les tannins8
3) Usage traditionnel9
4) Propriétés biochimiques10

TABLES DES MATIERS

CHAPITRE II :

ACTIVITES BIOLOGIQUES DE RHAMNUS ALATEENUS

1) Activité antioxydante	12
•Test au DPPH.....	12
2) Activité antibactérienne	12

PARTIE II : EXPERIMENTALE

CHAPITRE III :

MATERIEL ET METHODES

1) Matériel.....	15
1.1. Matériel végétal	15
1.2. Matériels de laboratoire utilisé.....	15
1.3. Réactifs chimiques.....	15
2) Méthodes	16
2.1. Préparation de la matière végétale.....	16
2.2. Préparation de l'extrait	16
2.2.1. Préparation de l'extrait aqueux.....	16
2.2.2. Préparation de Extrait méthanolique	17
3) Analyse chimique	20
3.1. Dosage des polyphénols totaux	20
3.1.1. Principe	20
3.1.2. Mode opératoire.....	20
3.2. Dosage des flavonoïdes.....	20
3.2.1. Principe.....	20
3.2.2. Mode opératoire	21
3.3. Dosage des Tanins condensés	21
4) Activité antioxydante	21

TABLES DES MATIERS

• Test au DPPH.....	21
Mode opératoire	21
5) Activité antibactérienne.....	22
5.1. Micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiennes.....	22
5.1.1. Escherichia coli	22
5.1.2. Staphylococcus aureus.....	22
5.2. Milieux de culture utilisés	23
5.3. Stérilisation du matériel	23
5.4. Préparation des dilutions d'extraits de R. alaternus	23
5.5. Repiquage de la souche bactérienne	23
5.6. Ensemencement et dépôt des disques.....	24
5.7. Lecture des antibiogrammes	24
5.8. Détermination des CMI	24

PARTE III :

RESULTATS ET DISCUSSION

1) Rendements des extractions	26
1.1. La macération	26
2) Dosage des polyphénols totaux.....	26
3) Dosage des flavonoïdes totaux	28
4) Dosage des tanins condensés.....	29
5) L'activité antioxydante	31
5.1. Test anti-radicalaire (Test DPPH)	31
6) L'activité antibactérienne.....	33
6.1. Sensibilité aux extraits bruts.....	33

TABLES DES MATIERS

Conclusion générale

Références Bibliographiques

ANNEXES

LISTE DES TABLEAUX

• LISTE DES TABLEAUX:

Tableau 1 : Classification botanique de <i>Rhamnus alaternus</i> (Yi-ling et Pan-kai, 1982)	4
Tableau 2 : Nomenclature de <i>R alaternus</i> (Bhourri et al., 2012 ; Debeaux, 1984)	6
Tableau 3 : Structure de certains flavonoïdes (Bruneton, 1999)	8
Tableau 4 : Concentrations minimales inhibitrices exprimées pour chaque extrait sur <i>Escherichia coli</i> en mg/ml.....	33
Tableau 5 : Concentrations minimales inhibitrices exprimées pour chaque extrait sur <i>Staphylococcus aureus</i> en mg/ml.....	34
Tableau 6 : Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec <i>Escherichia coli</i> .de extrait méthanolique.....	43
Tableau 7 : Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec <i>Escherichia coli</i> .de extrait aqueux.....	43
Tableau 8 : Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec <i>Staphylococcus aureus</i> d'extrait méthanolique	44
Tableau 9 : Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec <i>Staphylococcus aureus</i> d'extrait aqueux.....	44

LISTE DES FIGURES

• LISTE DES FIGURES :

Figure 1: <i>Rhamnus alaternus</i> L (Penzig, 1902).....	5
Figure 2: Fleure male, b : Fleure femelle <i>R. alaternus</i> (Aronne et Wilcock, 1995).....	6
Figure 3: Feuilles, fruits de <i>Rhamnus alaternus</i> (Aronne et wilcock, 1995).....	6
Figure 4: L'une des structures de base des tannins hydrolysables (Haslam, 2007).....	9
Figure 5 : La structure de base des tannins condensés (Hopkins, 1995).....	9
Figure 6 : La partie aérienne de <i>Rhamnus alaternus</i> L : (a : fraiche ; b : sèche ; c : poudre).....	16
Figure 7 : L'extrait aqueux de <i>R. alaternus</i>	17
Figure 8 : L'extrait méthanolique de <i>R. alaternus</i>	17
Figure 9: Protocole de préparation de l'extrait aqueux (Belhattab et al., 2004).....	18
Figure10: Protocole de préparation de l'extrait méthanolique de la partie aérienne par macération (Belhattab et al., 2004).....	19
Figure 11 : Micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiennes.....	22
Figure 12 : <i>Escherichia coli</i>	23
Figure 13 : <i>Staphylococcus aureus</i>	24
Figure 14: Comparaison des rendements des extraits méthanolique et aqueux de <i>R. alaternus</i> ...	26
Figure 15: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	27
Figure 16 : Teneurs en polyphénols des extraits méthanolique et aqueux de <i>R. alaternus</i>	28
Figure 17 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.....	29
Figure 18: Teneurs en flavonoïdes des extraits méthanolique et aqueux de <i>R. alaternus</i>	29
Figure 19 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour dosage des tannis condonse.....	30
Figure 20 : Teneurs des tannis condonse des extraits méthanolique et aqueux de <i>R. alaternus</i> ...	30
Figure 21 :Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait methanolique.....	32
Figure 22 :Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait aqueux.....	32
Figure 23 : Activité anti-radicalaire des extraits de <i>R. alaternus</i>	33

• LISTE DES ABREVIATIONS

AICI3	trichlorure d'aluminium
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DMSO	diméthyle sulfoxyde
DO	Densité optique
EA	extrait aqueux
EM	extrait méthanolique
EAG	Equivalent en acide gallique
EQ	équivalent de quercétine
EAF	extrait aqueux feuille
EAE	extrait aqueux écorce
EAR	extrait aqueux racine
EMF	extrait méthanolique feuille
EME	extrait méthanolique écorce
EMR	extrait méthanolique racine
E. Coli	Escherichia coli
HCl	Acide chlorhydrique.
ml	millilitre
MF	Matière fraîche
R. alaternus	Rhamnus alaternus
UV	ultra-violet

Introduction

• Introduction

Le monde des végétaux est plein de ressources et de vertus, d'où l'homme puise non seulement sa nourriture mais aussi des substances actives qui procurent souvent un bien fait à son organisme parfois affecté de trouble insidieux (**Baba-Aissa F., 2000**).

L'intérêt pour les plantes médicinales remonte aux origines de l'homme, qui recourait automatiquement aux plantes médicinales pour soulager ses maux et ses douleurs.

Actuellement, cette médecine, via les plantes, connaît un grand regain d'intérêt, et grâce à des études scientifiques basées sur des méthodes analytiques et de nouvelles expérimentations, le monde médical découvre de plus en plus, de bonnes recettes empiriques pour les plantes médicinales (**Lahsissene H.,2009**).

En Algérie, on a longtemps eu recours à la médecine traditionnelle grâce à la richesse et la diversité de sa flore, qui constitue un véritable réservoir phylogénétique, avec environ 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques (**Bouزيد et al., 2006**).

Rhamnus alaternus est une plante utilisée dans le traitement des complications hépatique, contre la jaunisse et certaines affections dermatologiques (**Ait Youssef, 2006**). Cette plante est riche en différents composés phénoliques tels que les flavonoïdes. Ils seraient responsables de ses effets pharmacologiques (**Zaer.,2009**).

Alaternus appartient à la famille des *Rhamnaceae* et généralement appelée "mlilisse". Cette dernière a été largement utilisée en médecine traditionnelle comme hypotenseur, purgatif, laxatif et aussi pour traiter les complications dermatologiques (**Ben Ammar et al., 2007**). Les métabolites secondaires les plus importants chez *R. alaternus* sont les composés polyphénoliques, les flavonoïdes (**Moussi et al., 2015**), les coumarines, les anthocyanes (**Longo et al., 2005**) et les anthraquinones (**Kosalec et al., 2013**). Liée à la présence de telles biomolécules, cette plante est empiriquement utilisée pour ses propriétés biologiques notamment antioxydantes, anti-génotoxiques (**Bhourri et al., 2011**), antihyperlipidémiques (**Tacherfiout et al., 2018**) et antimutagènes (**Ben Ammar et al., 2005**).

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

PARTE I :

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :

RHAMNUS ALATERNUS

1) Propriétés botaniques :

1.1. Généralités :

Rhamnus alaternus. Est un arbuste appartenant à la famille des Rhamnaceae. C'est une plante médicinale largement utilisée en médecine traditionnelle dans le groupe méditerranéen. On le trouve dans les pays d'Afrique du Nord et sur les côtes du sud de l'Europe. En Algérie, elle pousse principalement dans les forêts et les rocailles (Ait Youssef, 2006), Elle contient, 9 espèces végétales appartenant à 3 genres sont répertoriées dans diverses régions et classées selon leurs caractéristiques morphologiques (Quezel et Santa, 1963).

1.2. Classification :

Rhamnus alaternus appartient à la classe des Magnoliopsida-Dicotylédones, à la famille des Rhamnaceae et au genre Rhamnus. La classification complète de la plante est représenté dans le (tableau 1).

Tableau 1 : Classification botanique de Rhamnus alaternus (Yi-ling et Pan-kai, 1982)

Règne	Plantae-Végétal
Domaine	Eukaryota- eucaryote
Classe	Magnoliopsida-Dicotylédones
Sous classe	Rosidae
Famille	Rhamnaceae
Genre	Rhamnus
Espèce	Rhamnus alaternus
Sous espèce	R. alaternus eu-alaternus Maire (Quezel Et Santa, 1963)
Super ordre	Rhamnanae
Ordre	Rhamnales

1.3. Description botanique :

Rhamnus alaternus. Est un arbuste toujours vert, parfois très grande, De 2 à 6 mètres de hauteur, toutes les marées droites (**Izhaki et al., 2002 ; Hemmami et al., 2006 ; Bas et al., 2009**).

Les feuilles luisantes, ovoïdes ou lancéolées, sont alternes, lisses, pétioles (3-6 cent, sur 2-3), à bords cartilagineux et dentées, Elles restent sur l'arbre pendant deux années environne, coriaces, à nervure médiane épaisse, formateurs à la base ; stipules linéaires, caducée ; grappes axillaires plus longues comme pétiole, multiflores ; L'inflorescence est en petite grappe qui réfléchit si elle par rapport aux fleurs mâles, Ou habillez-le comme ça pour les fleurs des femmes. La fleur est généralement dioïque et unisex, petite et de couleur jaunâtre (**Ait Youssef, 2006**). Ses fleurs sont fécondées par les insectes ou avec l'aide du vent (**Bas, J et al 2002 ; Herrera ; 1984**) Cette flore est un produit entre janvier et avril (**Izhaki et al., 2002**). Elle produit des fruits charnus, drupe mûre, sa surface est d'abord rouge, puis devient Noire à la maturité, un fruit de 2 à 5 grains, ce qui signifie une forme triangulaire de 2,5 mm de diamètre. Largeur 4,6 mm de longueur et d'un poids environ 9mg (**Bas et al., 2009**). La maturation s'effectue entre avril et aout (**Aronne et al. Wilcock, 1995 ; Bas et al., 2005**).



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

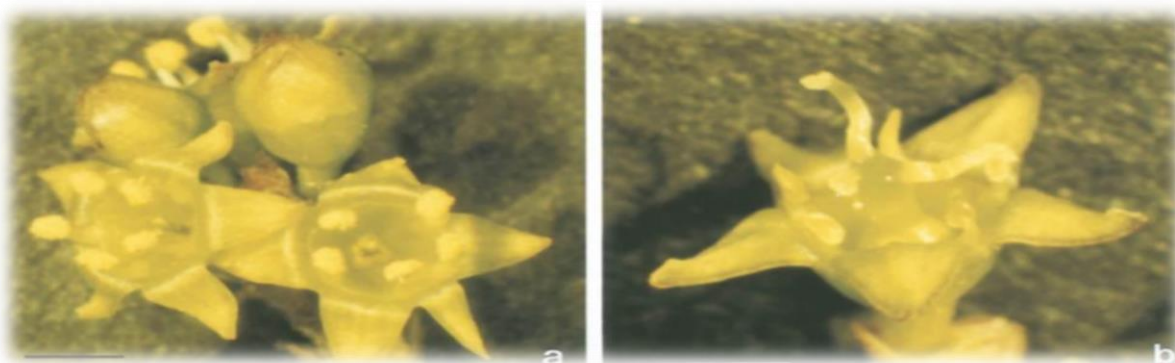


Figure 2: Fleure male, b : Fleure femelle R. alaternus (Aronne et Wilcock, 1995).



Figure 3: Feuilles, fruits de Rhamnus alaternus (Aronne et wilcock, 1995).

1.4. Description de l'habitat :

Rhamnus alaternus est distribué le long du bassin méditerranéen comme l'Asie et Europe (Gulias et al., 2004). Elle se trouve dans les pays d'Afrique du nord : en Algérie, au Maroc ou elle serait commune en Tunisie, et dans les fourrés du littoral méditerranéen (Ait Youssef, 2006).

1.5. Nomenclature :

Nomenclature de Rhamnus alaternus sont indiqué dans le (tableau 2)

Tableau 2 : Nomenclature de R alaternus (Bhourri et al., 2012 ; Debeaux, 1984).

La langue	Nom
En arabe	Am'lile'ce, M'lila, Soitfaïr, Oud El-khir ou bien Safir.

En Kabyl	Ménilés
En anglais	Buckthorn.
En Français	Nerprun alaterne

2) Compositions Chimiques :

2.1. Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires d'origine végétale, qui constituent l'un des groupes les plus abondants des métabolites naturels. L'élément structural de base est un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthyle, ester, sucre...). Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits. Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins (**Boizot et charpentier, 2006 ; Vattermet et al., 2005**). Ils constituent une partie essentielle de l'alimentation humaine, et sont d'un intérêt considérable en raison de leurs propriétés antioxydantes (**Balasundrem et al., 2006**).

2.2. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes (du latin flavus, jaune) sont des substances généralement colorées très répandues chez les végétaux. Plus de 4000 flavonoïdes (plusieurs milliers de molécules décrites) ont été répertoriés. Ils protègent les plantes terrestres des radiations ultraviolettes (**Guignard, 2000**). Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base C6-C3-C6. Ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**). La structure des différents types de flavonoïdes varie par la nature de l'hétérocycle oxygéné (Tableau 3) (**Ribereau Gayon, 1968**).

Tableau 3 : Structure de certains flavonoïdes (Bruneton, 1999).

Flavonoïdes	Structures	Exemples
Flavones		R1=R2 =H Apigénine
Flavonols		R1=OH, R2=H Quercétine
Flavanols		5=7=3'=4'=OH Catéchine
Flavanonols		Taxifoline
Isoflavones		Daidzéine R1=H

2.3. Les tannins :

Les tannins sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 Da, ils ont la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (Bruneton, 1999). Ils sont utilisés depuis l'antiquité par l'homme pour le traitement des peaux d'animaux (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006). Les tannins sont classés en deux groupes principaux différents par leur structure : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Bruneton, 1999).

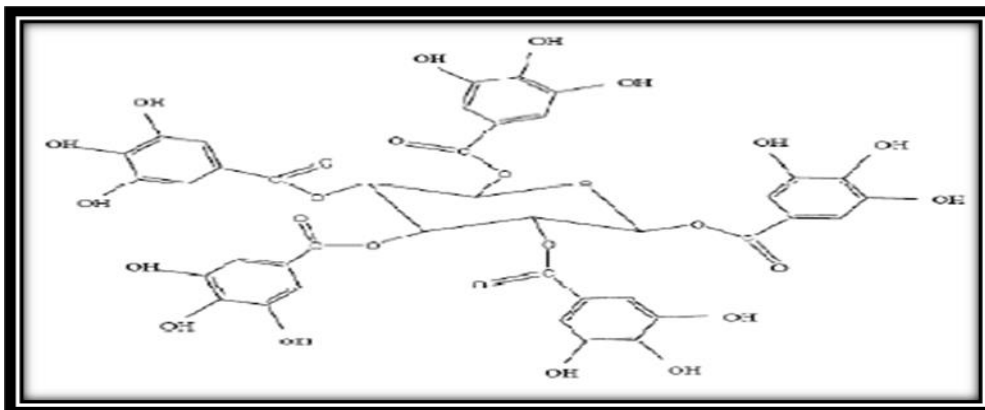


Figure 4 : L'une des structures de base des tannins hydrolysables (Haslam, 2007).

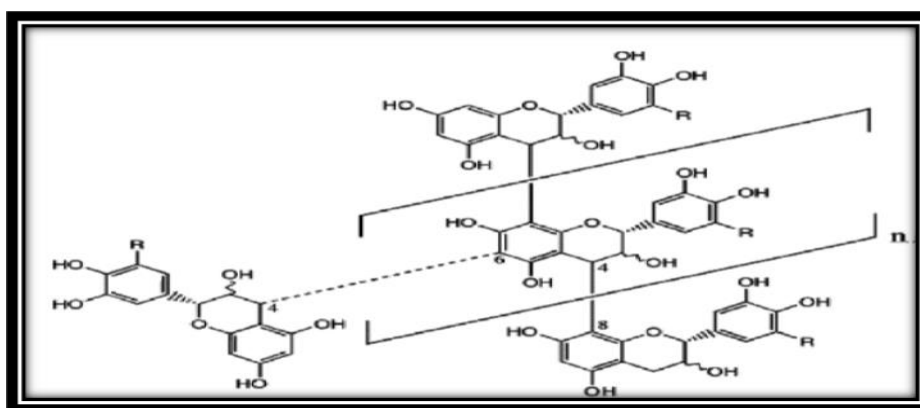


Figure 5 : La structure de base des tannins condensés (Hopkins, 1995).

3) Usage traditionnel :

En médecine traditionnelle *R. alaternus* a été employé en tant que digestif, diurétique, laxatif, hypotensif et pour le traitement des complications hépatiques et dermatologiques (Bhourri et al., 2012) ainsi que les problèmes cardiovasculaires (Calvo et Cavero, 2014), antioxydant, antimutagène, anti-génotoxique (Ben Ammar et al 2008 ; Bhourri et al., 2011), antimicrobien (Kosalec et al., 2013).

Les tiges et les feuilles de *Rhamnus alaternus* sont utilisées en Algérie, contre la jaunisse et les troubles hépatiques provoqué par le paludisme. Le fruit était utilisé comme purgatif doux toujours employé comme laxatif (Ait Youssef, 2006).

4) Propriétés biochimiques :

Rhamnus alaternus est caractérisé d'un point de vue phytochimique par l'abondance des substances phénoliques, particulièrement les tannins, anthraquinones comme l'émodin, chysophanol, alaternin et physcion qui sont les quatre anthraquinones aglycones isolés à partir des parties aériennes de Rhamnus alaternus (**Izhaki et al., 2002 ; Ben Ammar et al., 2007**). Elle contient aussi des flavonoïdes glycosylés tel que kaempferol 3-O-Bisorhamminoside, rhamnocitrin 3-O-B-isorhamminoside et rhamnetin-3-O-B-isorhamminoside (**Ban Ammar et al., 2009**), et des flavonoïdes aglycones comme le kaempferol, quercétine et l'apigénine (**Ben Ammar et al., 2008 ; Ben Ammar et al., 2009**). La pulpe de R. alaternus est composée principalement d'eau (68%), de minéraux (Fe, Zn, Mn, K, Na, Ca, Mg, P, Cu) dont le plus abondant est le K (12.90%), de lipides, protéines et de fibres (cellulose, hemicellulose et lignine). Les fruits relativement volumineux de Rhamnus alaternus contiennent plus d'eau et de Phosphore, les fruits de taille intermédiaire contiennent plus de lipides, Magnésium et de Calcium et les fruits plus petits contiennent plus de protéines, Potassium et zinc. Des données prouvent que la pulpe de fruit contient toujours moins d'émodyne que les feuilles (**Izhaki et al., 2002**).

CHAPITRE II :

ACTIVITES BIOLOGIQUES

DE RHAMNUS

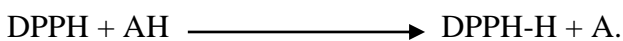
ALATERNUS

1) Activité antioxydante :

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

- **Test au DPPH :**

Le test au 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle (DPPH) est réalisé par la méthode décrite par (**Ammar et al., 2009**) qui permet de mesurer le pouvoir réducteur par le calcul de la IC50 des substances antioxydantes contenues dans un extrait. Le DPPH est un radical libre de couleur violette qui devient jaune quand il est réduit par un donneur de proton H⁺.



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

2)Activité antibactérienne :

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

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

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

PARTIE II :
EXPERIMENTALE

CHAPITRE III :

MATERIEL ET

METHODES

1) Matériel :

1.1. Matériel végétal :

Rhamnus alaternus de la famille des Rhamnacées, appelée localement « melisse » est une plante médicinale utilisée sous forme de décoction pour le traitement de la jaunisse chez l'homme et l'animal.

Le matériel végétal utilisé est constitué des parties aériennes (feuille et écorces) et des racines de rhamnus alaternus récolté dans une forêt située dans, wilaya De Guelma, au cours du mois de fin Février début Mars.

1.2. Matériels de laboratoire utilisé :

- ✓ Verreries et appareils
- ✓ Tubes à essai
- ✓ Éprouvette graduée
- ✓ Flacon
- ✓ Bécher
- ✓ Entonnoir
- ✓ Papier filtre
- ✓ Balance, bain marie
- ✓ Micropipette
- ✓ Agitateur, rota vapeur
- ✓ Plaque chauffante

1.3. Réactifs chimiques :

Plusieurs réactifs produits ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits :

- ✓ Les solvants organiques utilisés dans les différents compartiments de cette étude sont de Grade analytique (Le méthanol, DMSO)
 - ✓ Les différents acides sont : l'acide gallique, acide chlorhydrique (HCl).
 - ✓ Les réactifs chimiques sont le DPPH diphénylpicryl β hydrazyl, le Folin-Ciocalteu (FCR)
- D'autres produits chimiques utilisés : la quercétine, vanilline, AlCl₃, Eau distillée,

2) Méthodes :

2.1. Préparation de la matière végétale :

La partie aérienne de *R. alaternus* constituée de (écorce et feuilles), ainsi que les racines ont été nettoyées des impuretés, puis séchées à température ambiante et à l'ombre pendant quelques jours, jusqu'elles sont devenues sèches, ensuite broyées à l'aide d'un mortier puis dans un robot électrique pour avoir une poudre qui est stockée dans des boîtes fermées, placées dans un endroit à l'abri de la lumière et de la chaleur jusqu'à leur utilisation (figure 6 : a, b, c)



Figure 6 : La partie aérienne de *Rhamnus alaternus* L : (a : fraîche ; b : sèche ; c : poudre).

2.2. Préparation de l'extrait :

2.2.1. Préparation de l'extrait aqueux :

L'extrait aqueux de *R. alaternus* a été obtenu par décoction de 20 g de broyat de la partie aérienne de la plante (tiges et feuilles) ou de racines dans 100 ml d'eau distillée pendant 48 heures sous agitation magnétique. La solution est laissée reposer sur la plaque chauffante pendant 15 minutes, le mélange est d'abord filtré sur une gaze et ensuite sur papier Whatman (n°3). Des aliquotes du filtrat sont placées dans une étuve à 40 °C pendant 24 h pour sécher. L'extrait sec est conservé au réfrigérateur (figure 7 ;9) (**Belhattab et al., 2004 ; Ben Ammar et al., 2007**).



Figure 7 : L'extrait aqueux de *R. alaternus*.

2.2.2. Préparation de Extrait méthanolique :

L'extrait méthanolique de la partie aérienne de *R. alaternus* a été préparé à partir de 30 g de broyat des tiges et des feuilles, qui ont été mis à macérer dans 300 ml de méthanol à la température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 24 heures, avec un maximum d'agitation. Ensuite le mélange est filtré sur la gaze et une deuxième fois sur papier Whatman (n°03) Les filtrats obtenus sont additionnés et évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur à une température de 40 - 50 °C. L'extrait sec est conservé au réfrigérateur (figure 8 ;10) (Belhattab et al., 2004 ; Ben Ammar et al., 2008).



Figure 8 : L'extrait méthanolique de *R. alaternus*.

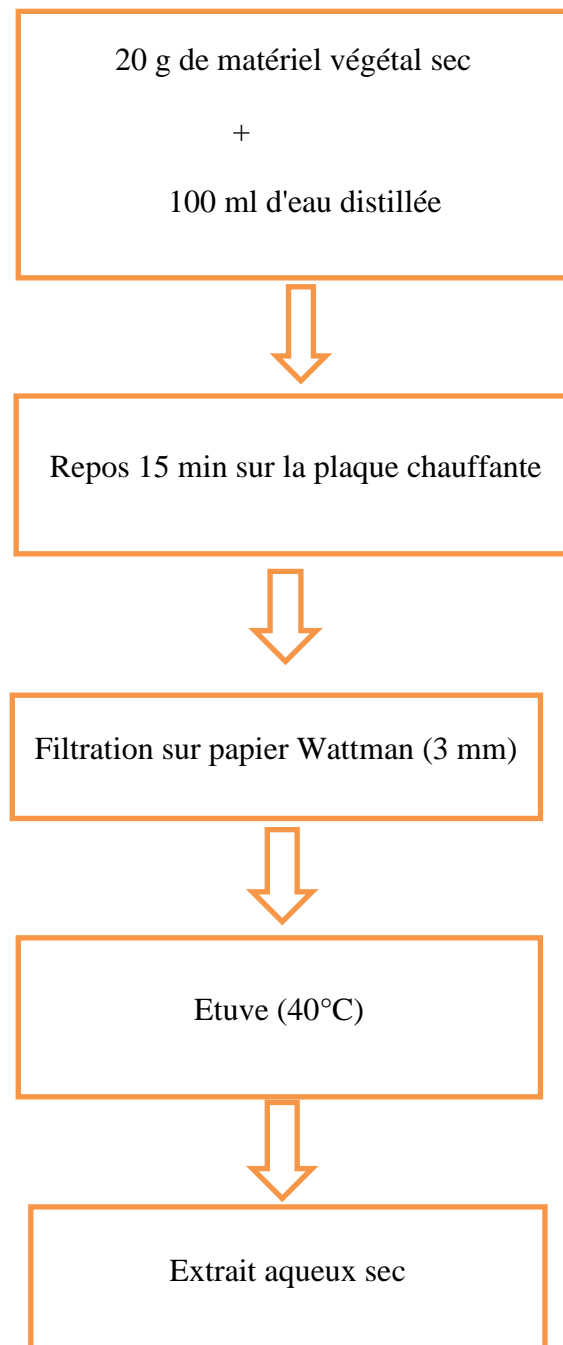


Figure 9 : Protocole de préparation de l'extrait aqueux (Belhattab et al., 2004).

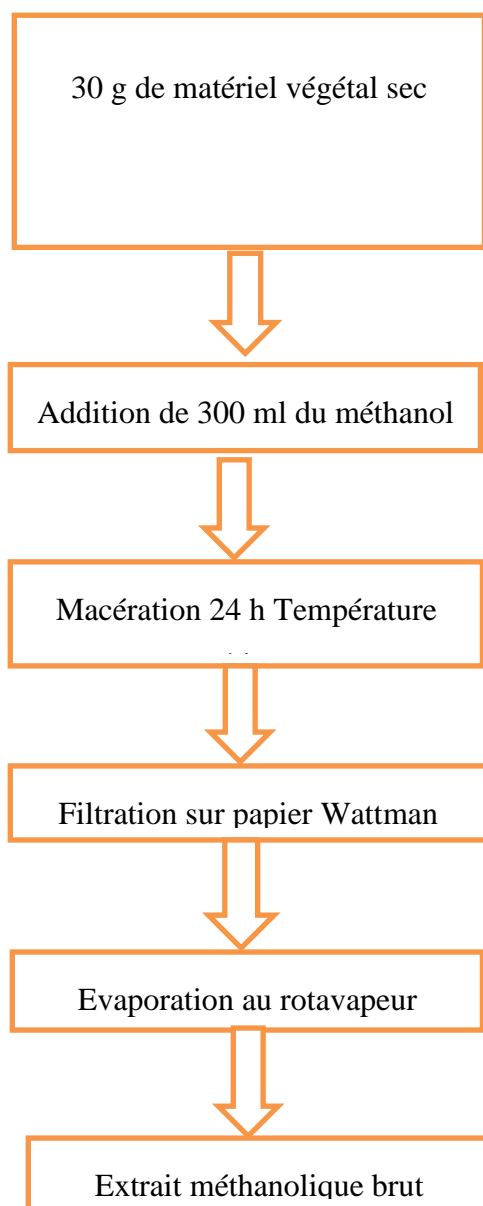


Figure10 : Protocole de préparation de l'extrait méthanolique de la partie aérienne par macération (Belhattab et al., 2004).

Le taux d'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = P1/P0 \times 100$$

P0 : poids de la poudre avant extraction.

P1 : poids de l'extrait sec après extraction

3) Analyse chimique :

3.1. Dosage des polyphénols totaux :

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

3.1.1. Principe :

Les composés phénoliques réagissent avec le Folin- Ciocalteu (mélange jaune) d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique est réduit, lors de l'oxydation des polyphénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue est proportionnelle au taux de composés phénoliques présents dans l'extrait (Ribereau-Gayon *et al.*, 1982).

3.1.2. Mode opératoire :

On prend 200 µl de chaque extrait avec l'ajout de 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué, sous légère agitation et incubation dans l'obscurité pendant 4 minutes à température normale, puis on ajoute 800 µl de solution de carbonate de sodium (7.5%Na₂CO₃) sous agitation puis incubation pour la deuxième fois pendant 2 heures dans l'obscurité à température normale et lecture de l'intensité d'absorbance de l'extrait de couleur bleue dans le spectrophotomètre à la longueur d'onde 765 nm (Singleton *et al.*, 1999).

3.2. Dosage des flavonoïdes :

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

3.2.1. Principe :

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

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

3.2.2. Mode opératoire :

Mettre 1 ml d'extrait de *R. alaternus* dans un tube à essai ; Ajouter 1 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 2 % ; laisser incuber 15 min à température ambiante. Lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible (Spectronic 20 Genysis TM) à 430 nm. Effectuer la même opération pour la quercétine à différentes concentrations en introduisant 1 ml de ces dernières dans une série des tubes et ajout de 1 ml d'AlCl₃ à 2%. Le blanc est représenté par le méthanol additionné à toutes les opérations sont réalisées en triplicata. Les concentrations des flavonoïdes contenus dans les extraits de *R. alaternus* sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard, les résultats sont exprimés en mg équivalent en quercétine/ g de matière fraîche. (**Bahorun et al. 1996**).

3.3. Dosage des Tanins condensés :

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode de la vanilline en milieu acide. Le réactif de vanilline a été préparé en mélangeant à volume égal : HCl à 8 % (v/v), le méthanol à 37 % (v/v) et 4 % de vanilline dans du méthanol (m/v). Le mélange a été maintenu à 30 °C avant le dosage. 200 µl de chaque extrait à analyser ont été ajoutés à 1 000 µl de réactif de vanilline ; le mélange a été agité puis incubé à l'obscurité à 30 °C pendant 20 min. L'absorbance est mesurée à 500 nm par un spectrophotomètre UV.

4) Activité antioxydante :

Test au DPPH :

Mode opératoire :

Une solution de DPPH (4mg dans 100ml de méthanol 80%). Mettre 1ml de chaque dilution de ces extraits dans un tube à essai, ajouter 1ml de solution méthanolique de DPPH, puis laisser incuber 30 min à l'abri de la lumière à température ambiante. Lire l'absorbance à 517 nm contre un blanc qui contient de, méthanol pur.

Le pourcentage de l'activité scavenger du radical DPPH est calculé selon la formule

Suivante :

$$\% \text{ d'activité scavenger du DPPH} = (A \text{ contrôle} - A \text{ extrait}) / A \text{ contrôle} \times 100$$

Le pourcentage d'inhibition est exprimé ensuite par la valeur de la IC50, sachant que IC50 est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH.

5) Activité antibactérienne :

5.1. Micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiens :

5.1.1. Escherichia coli :

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

5.1.2. Staphylococcus aureus :

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

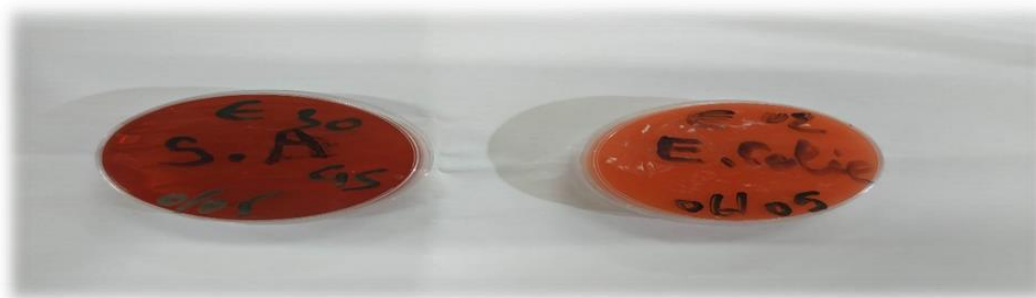


Figure 11 : Micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiens.

5.2. Milieux de culture utilisés :

Les souches bactériennes	Milieux de culture
. Escherichia coli (ATCC 25922)	Hektoen
. Staphylococcus aureus (ATCC 25923)	Chapman

5.3. Stérilisation du matériel :

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

5.4. Préparation des dilutions d'extraits de *R. alaternus* :

Les extraits de *R. alaternus* ont été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives au demi, sachant que la concentration de la solution mère de chaque extrait est de 0,32 mg/ml

5.5. Repiquage de la souche bactérienne :

Nous dissolvons le milieu de culture pour chaque bactérie et le mettons dans une boîte Pétri, et nous cultivons les bactéries spéciales dans chaque milieu et le laissons pendant 24 heures à une température de 37 °C.

Après 24 heures on prend de chaque bactérie avec l'anse de platine et les mettons dans l'eau physiologique déjà préparé et on les compare avec le Mac farland (0,5), jusqu'à atteindre le même Turbidité.

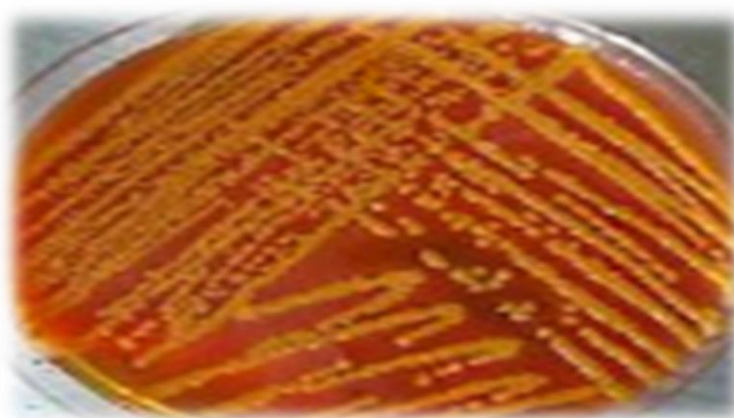


Figure 12 : Escherichia coli.



Figure 13 : Staphylococcus aureus.

5.6. Ensemencement et dépôt des disques :

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri, Nous immergeons l'écouvillon dans la suspension bactérienne et le frottons dans les boîtes en bandes étroites.

Nous répétons le processus 3 fois, et lorsque nous avons fini de vacciner plusieurs boîtes Peter avec la même souche, nous mettons les disques avec des pinces stériles et mettons 10 μ l de chaque extrait sur son disque et les laissons pendant 24 heure.

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

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

5.7. Lecture des antibiogrammes :

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

5.8. Détermination des CMI :

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), correspond à la plus faible concentration D'antimicrobiens qui inhibera la croissance visible des microorganismes après une incubation Durant la 18-24 (**Andrews, 2001**). Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories : "sensible" ; "résistante" ; "intermédiaire" (**Genné and Siegrist Hans, 2003**).

PARTE III :

RESULTATS ET

DISCUSSION

1) Rendements des extractions :

La macération :

L'opération de l'extraction par macération de la poudre feuilles, écorce et des racines de *Rhamnus alaternus* dans du méthanol. Après extraction de 30g de l'échantillon et évaporation du solvant du filtrat, on a obtenu un extrait sec ayant un poids de 4,09g (EMF) ;3,56g (EME) ;2,95g (EMR) qui correspond respectivement au rendement 14% ; 12% ; 10%.

Et dans l'eau distillée, on a obtenu le poids 1,65g (EAF) ;1,97g (EAE) ;1,25g(EAR). Qui correspond respectivement au rendement 9% ; 9% ; 6 %

Les rendements des extraits méthanoliques sont supérieurs par rapport aux extraits aqueux, La différence de rendement entre les extraits est due aux techniques d'extraction utilisées

Dans une étude réalisée par Ben Ammar et *al.* (2008) sur la même espèce originaire de Tunisie, des résultats similaires ont été trouvés.

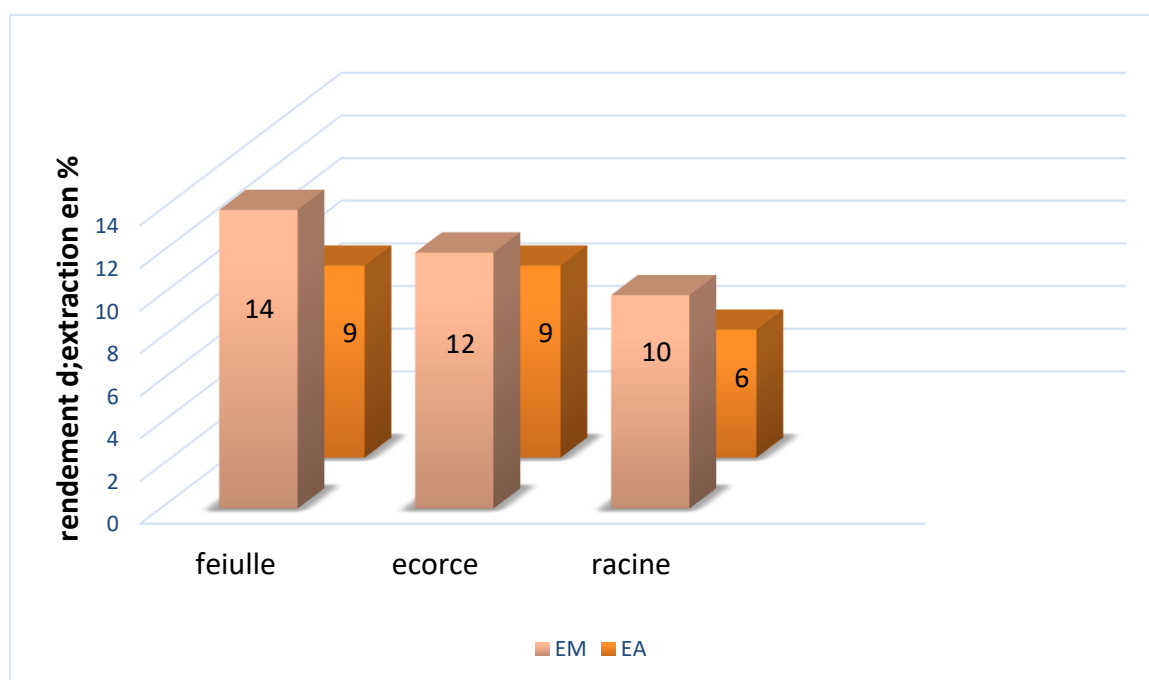


Figure 14 : Comparaison des rendements des extraits méthanolique et aqueux de *R. alaternus*

2) Dosage des polyphénols totaux :

La teneur en polyphénols totaux est déterminée au moyen d'un réactif de Folin-Ciocalteu. Est l'une des méthodes les plus anciennes conçue. En utilisant comme standard l'acide gallique La courbe montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations

PARTE III : RESULTATS ET DISCUSSION

La concentration en polyphénols de chaque extrait a été calculée par l'équation de type $Y=0,001X-0,031$ sachant que $R^2=0,996$ (Figure15) L'absorbance a été mesurée à 765 nm, les teneurs en polyphénols sont exprimées en mg EAG/g d'extrait.

Les teneurs en polyphénols totaux (Figure 16) dans l'extrait de méthanol, EMF ; EME ; EMR respectivement 8 mg EAG/g ; 6 mg EAG/g ; 7 mg EAG/g ; Ces résultats ont été obtenus à partir de l'extrait concentré 30 mg/ml.

Et pour la teneur totale en polyphénols dans l'extrait aqueux EAF, EAE ; EAR ; respectivement 38 mg EAG/g ;36 mg EAG/g ;18 mg EAG/g ; Ces résultats ont été obtenus à partir de l'extrait concentré 30mg/ml.

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits méthanoliques (8 et 6 et 7 mg EAG/g) Moins qu'aux extraits aqueux (38 et 36et 18 mg EAG/g), La différence de teneurs en polyphénols totaux entre les extraits est due aux techniques d'extraction utilisées, à la nature du solvant qui sont totalement différentes et à la composition chimique qui diffère d'un extrait à l'autre.

Les résultats obtenus sont proches de ceux trouvés par Ben ammar *et al.* (2008) sur la même espèce végétale. En effet, ils ont déterminé 7 mg EAG/ g de matière fraîche pour un extraits méthanoliques.

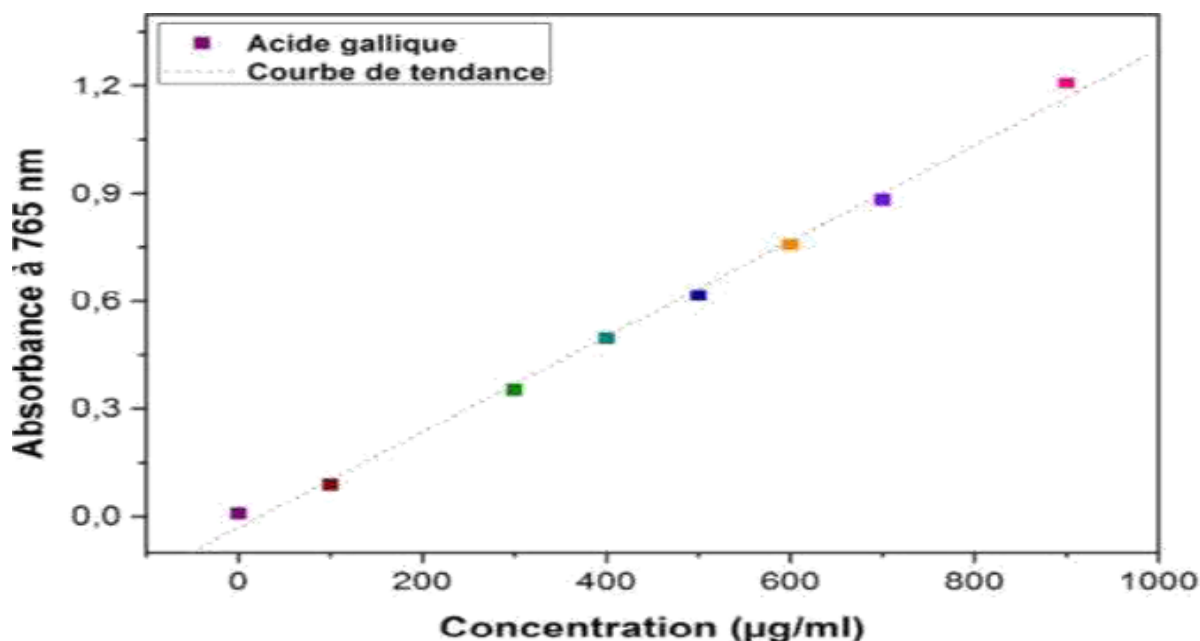


Figure 15 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

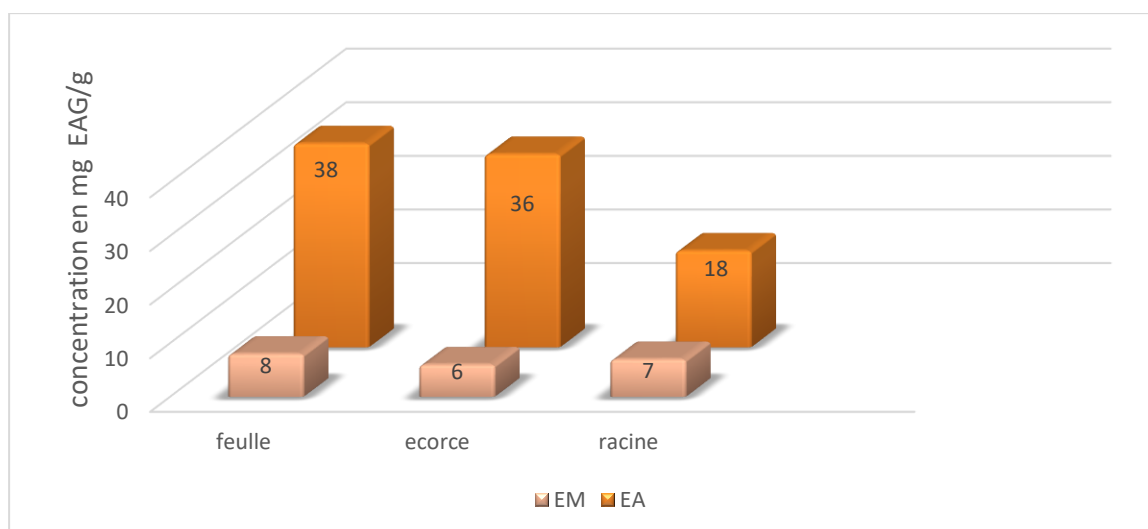


Figure 16 : Teneurs en polyphénols des extraits méthanolique et aqueux de *R. alaternus*

3) Dosage des flavonoïdes totaux :

La teneur en flavonoïdes est déterminée par la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), pour chaque extrait a été rapportée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière fraîche (mg EQ/g de MF). Les résultats de la courbe d'étalonnage de quercétine sont représentés dans la (figure 17)

La concentration en flavonoïdes de chaque extrait a été calculée par l'équation de type $Y = 0,002X + 0,139$ sachant que $R^2 = 0,995$

Les teneurs en flavonoïdes totaux (figure. 18) dans l'extrait de méthanol, EMF ; EME ; EMR respectivement 8 mg EQ /g ; 18 mg EQ /g ; 6 mg EQ /g ; Ces résultats ont été obtenus à partir de l'extrait concentré 30 mg/ml.

Et pour la teneur totale en flavonoïdes dans l'extrait aqueux EAF, EAE ; EAR ; respectivement 18 mg EQ /g ; 20 mg EQ /g ; 14 mg EQ /g ; Ces résultats ont été obtenus à partir de l'extrait concentré 30 mg/ml.

Nous constatons que les résultats que nous avons obtenus sont bien supérieurs à ceux obtenus Djeridane et al. (2007) qui est de 1 mg EQ/ g de MF pour un extrait éthanolique de la même variété de la région de Laghouat De même, ils sont nettement supérieurs aux résultats trouvés par Ben ammar et al. (2007) qui sont respectivement 28 et 21 mg EQ/100g de matière fraîche pour les extraits méthanolique et aqueux des feuilles de la même espèce de la région de la Tunisie Mais presque proche des résultats obtenus par Ben ammar et al (2008) soit des teneurs de 15 et 20 mg EQ/g de matière fraîche pour des extraits méthanoliques des écorces des racines et des feuilles respectivement.

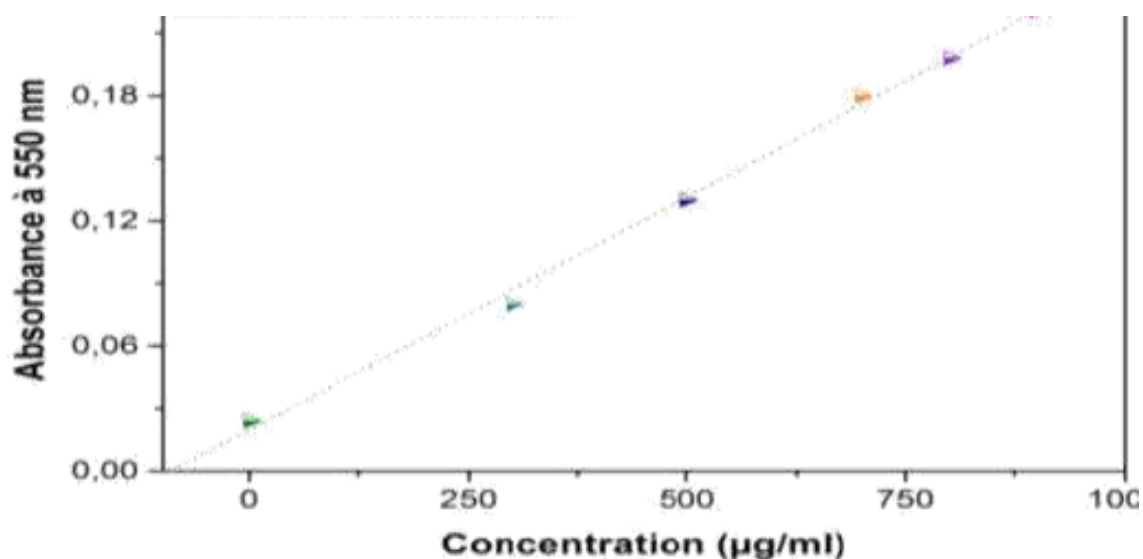


Figure 17 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.

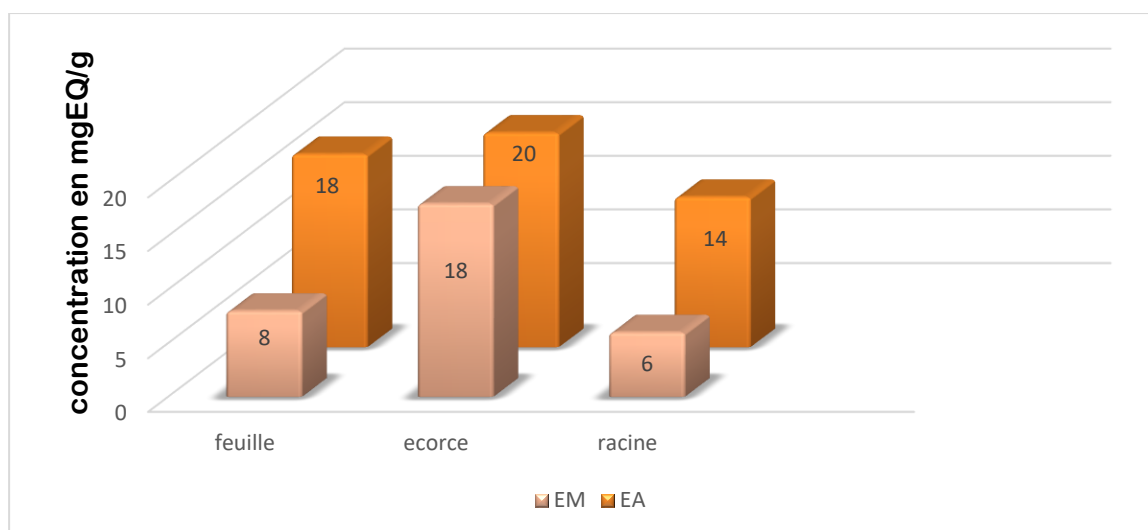


Figure 18 : Teneurs en flavonoïdes des extraits méthanolique et aqueux de *R. alaternus*

4) Dosage des tanins condensés :

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode de la vanilline en milieu acide

La teneur en tanins a été à partir de la courbe d'étalonnage, tracée en utilisant la catéchine comme standard. Les résultats ont été déterminés à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage $Y=0,0002X + 0,019$ sachant que $R^2 = 0,997$ (figure19), et sont exprimés en mg EC/g.

PARTE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Les teneurs en tanins condensés (figure 20) dans l'extrait de méthanol, EMF ; EME ; EMR respectivement 21 mg EC /g ; 19 mg EC /g ; 11mg EC /g ; Ces résultats ont été obtenus à partir de l'extrait concentré 30 mg/ml

Et pour la teneur totale des tanins condensés dans l'extrait aqueux EAF ; EAE ; EAR respectivement 15 mg EC /g ;10mg EC /g ;14 mg EC /g Ces résultats ont été obtenus à partir de l'extrait concentré 30 mg/ml

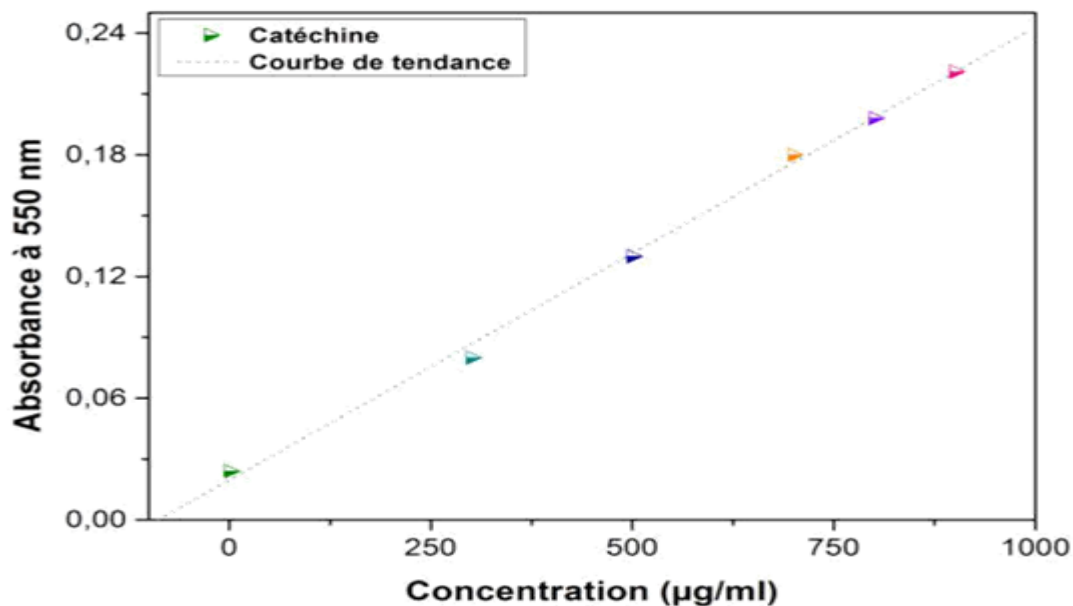


Figure 19 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour dosage des tannins condensés

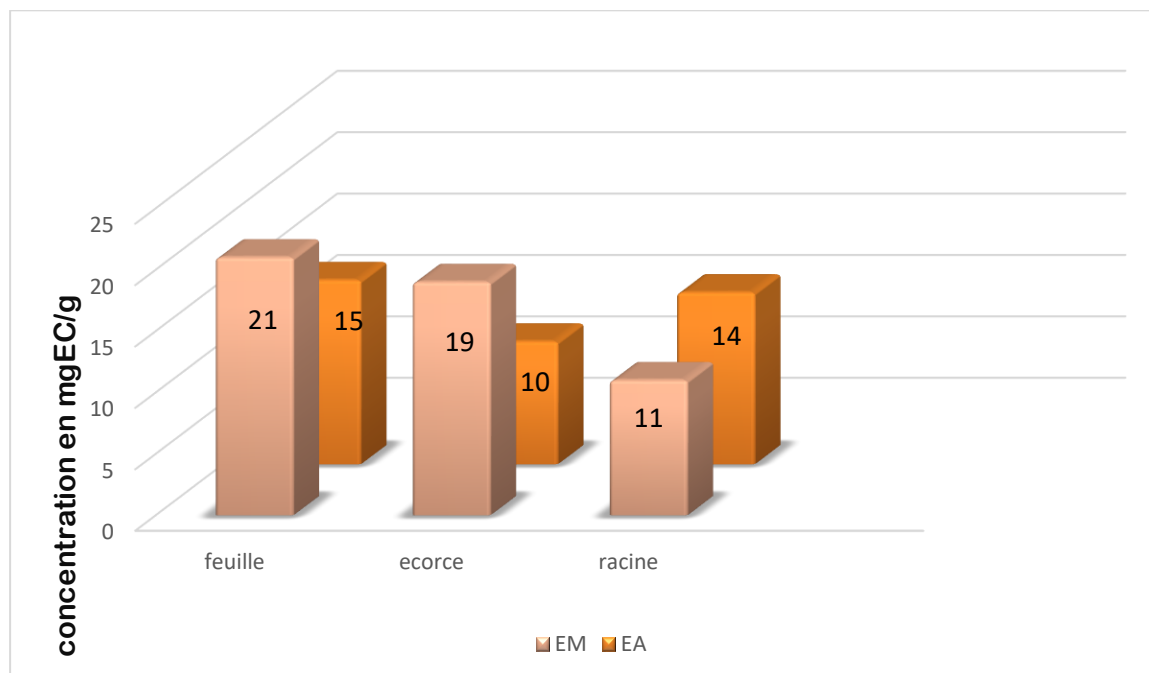


Figure 20 : Teneurs des tanins condensés des extraits méthanolique et aqueux de R. alaternus

5) L'activité antioxydante :

5.1. Test anti-radicalaire (Test DPPH) :

L'activité anti radicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH-H est formée (**Bortolomeazzi et al., 2007**)

L'activité antioxydante des extraits est exprimée en IC50, ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats (**Abdulmajed et al., 2005 ; Ranga et al., 2009**), il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH. Ces IC50 sont déterminées à partir des graphes (figure 21 ;22) dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait brut et l'ordonné l'activité antioxydante en pourcentage

Pour l'extrait de méthanol, EMF ; EME ; EMR respectivement 80 µg/ml ; 20 µg/ml ; 50 µg/ml Ces résultats ont été obtenus à partir de l'extrait concentré 30 mg/ml.

Et pour l'extrait aqueux EAF, EAE ; EAR ; respectivement 63 µg/ml ;70 µg/ml ;62 µg/ml Ces résultats ont été obtenus à partir de l'extrait concentré 30 mg/ml.

Une étude menée par Ben ammar et *al.* (2008) sur la même espèce de plante de la Tunisie a montré des IC50 de 7 et 19 µg/ml des écorces des racines et des feuilles respectivement, lorsque l'extraction a été menée par le méthanol. Nous en remarquons que les valeurs obtenues dans notre étude sont bien supérieures à ces valeurs.

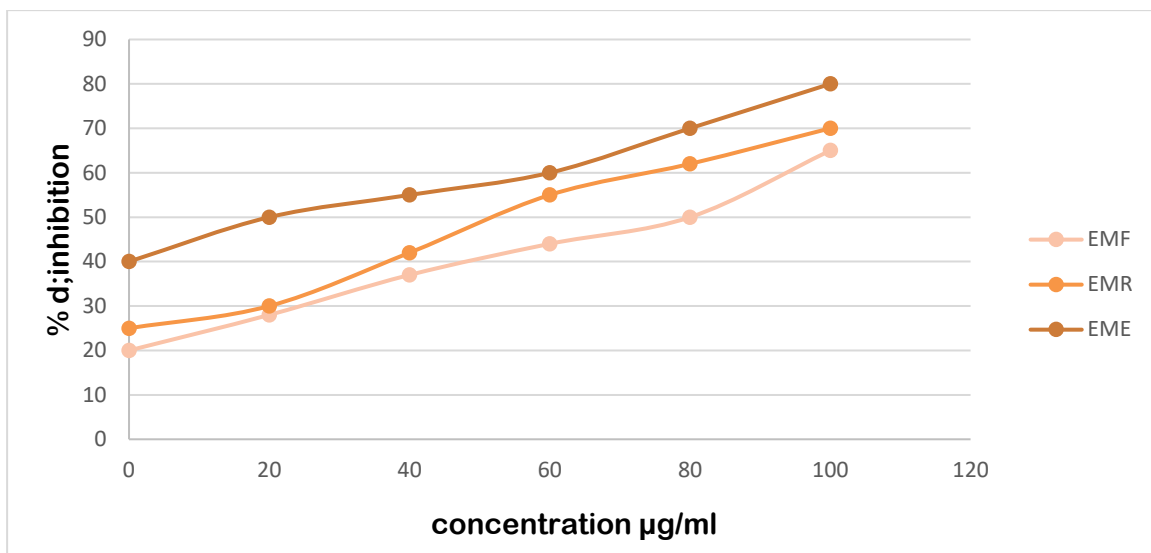


Figure 21 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique

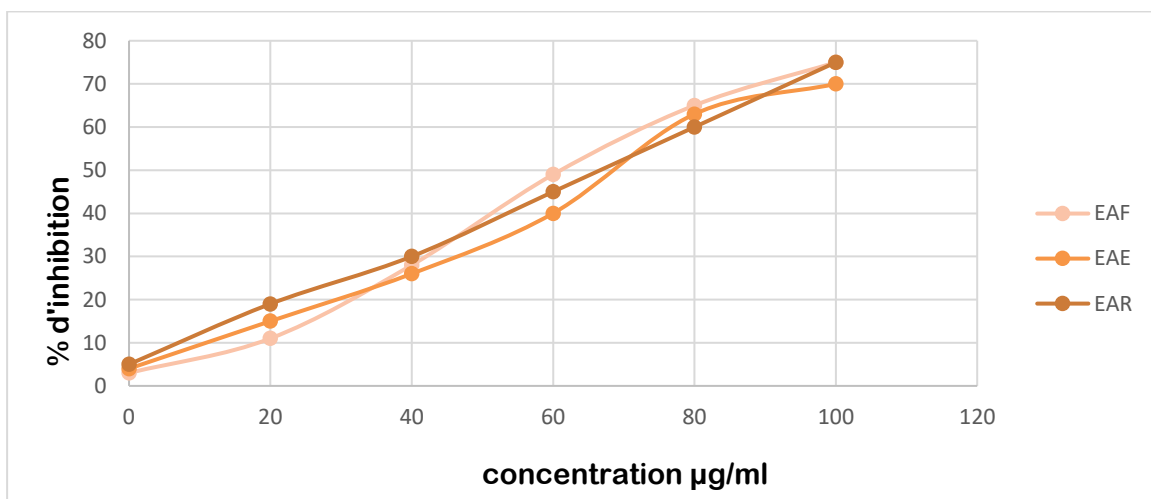


Figure 22 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait aqueux

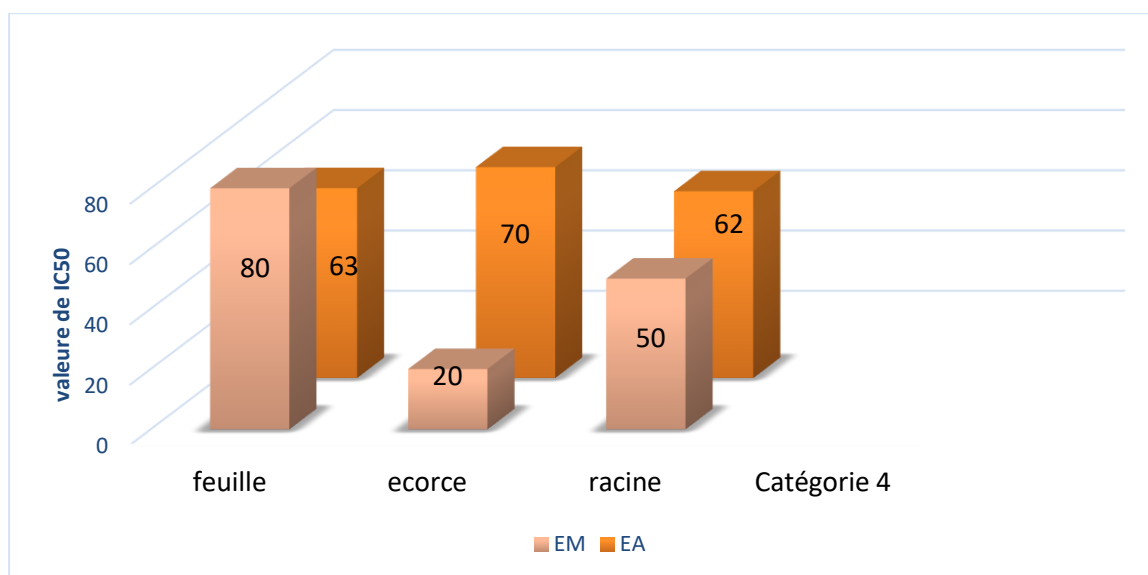


Figure 23 : Activité anti-radicalaire des extraits de R. alaternus

6) L'activité antibactérienne :

Nous avons étudié in vitro le pouvoir antimicrobien des extraits isolés de R. alaternus par la méthode de diffusion des disques sur un Milieu Chapman (staphylococcus aureus), Milieu Hektoen (echerichia-coli)

L'activité antimicrobienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de Deux bactéries Gram + et Gram - (echerichia-coli) (staphylococcus aureus).

6.1. Sensibilité aux extraits bruts :

Les effets bactéricides d'inhibition de la croissance des extraits sont résumés dans les tableaux (Annexe2)

Tableau 4 : Concentrations minimales inhibitrices exprimées pour chaque extrait sur Escherichia coli en mg/ml.

	EMR	EAE	EAR
CMI	0,04	0,04	0,04

PARTE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 5 : Concentrations minimales inhibitrices exprimées pour chaque extrait sur *Staphylococcus aureus* en mg/ml

	EME	EMR	EAR
CMI	0,04	0,04	0,04

La concentration minimale inhibitrice (CMI) exprimée par les extraits sur les souches testées était de 0,04mg/ml pour *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

Ben ammar et al. (2008) ont trouvés des valeurs de CMI d'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus tunisienne* égale à 6,25 mg/ml avec les souches de *E.coli*, *S.aureus*.

Conclusion générale

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés antioxydantes, une plante appartient à la famille des Rhamnacées, employée en Algérie grâce à ses propriétés thérapeutiques.

Quantitativement, la teneur en polyphénols totaux est évaluée en adoptant une méthode de Détection de Folin-ciocalteu où nous avons obtenu les résultats suivants : dans l'extrait de méthanol ,EMF ; EME ; EMR respectivement 8 mg EAG/g ; 6 mg EAG/g; 7 mg EAG/g ; Et pour l'extrait aqueux EAF ,EAE ;EAR respectivement 38 mg EAG/g ;36 mg EAG/g ;18 mg EAG/g , nous avons également mesuré les flavonoïdes par la méthode AlCl₃ ce qui nous amène à conclure que cette plante contient une quantité importante de flavonoïdes qui sont estimés dans l'extrait de méthanol ,EMF ; EME ; EMR respectivement 8 mg EQ /g; 18 mg EQ /g; 6 mg EQ /g; Et dans l'extrait aqueux EAF ,EAE ;EAR respectivement 18 mg EQ /g;20 mg EQ /g;14 mg EQ /g, Les tanins condensés sont déterminés par la méthode de la vanilline en milieu acide où nous avons obtenu les résultats suivants : dans l'extrait de méthanol ,EMF ; EME ; EMR respectivement 21 mg EC /g; 19 mg EC /g; 11mg EC /g; Et dans l'extrait aqueux EAF ,EAE ;EAR respectivement 15 mg EC /g;10mg EC /g;14 mg EC /g .

Le potentiel anti radicalaire des extraits a été déterminé par la méthode de DPPH, les concentrations inhibitrices à 50 % (CI50) sont estimées à : Pour l'extrait de méthanol, EMF ; EME ; EMR respectivement 80 µg/ml ; 20 µg/ml ; 50 µg/ml ; Et pour l'extrait aqueux EAF, EAE ; EAR respectivement 63 µg/ml ;70 µg/ml ;62 µg/ml A travers les résultats obtenus, nous concluons que ces extraits ont une bonne activité, donc cette plante contient Des molécules qui sont des agents antioxydants de premier ordre et peuvent être utilisées dans des applications thérapeutiques sachant que les antioxydants contribuent Un moyen très efficace de prévenir des maladies telles que le cancer et les maladies cardiaques Les vaisseaux sanguins. Au cours d'étude nous avons réalisée également un test antimicrobien de deux bactéries, (Gram+ et Gram-) (Escherichia-coli) (staphylococcus aureus). Selon la méthode de diffusion de disque Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour E. coli, S. aureus est égal à 0,04 mg/ml dans tous les extraits.

A travers les résultats obtenus dans notre étude de la plante, nous avons conclu que cette plante est riche en nombreux composés phénoliques et a un bon effet anti oxydant. Elle peut également être utilisée dans le traitement des complications hépatiques contre la jaunisse et certaines maladies de la peau. Nous espérons mener d'autres études scientifiques approfondies sur cette plante pour en savoir plus sur ses effets thérapeutiques.

Références Bibliographiques

❖ A

- ✓ Abdelly, C (2008). phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and thier biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331,372-379.
- ✓ Ait yousef, M (2006). Les plantes médicinales de kabylie ; Edition Ibis press 278-279.
- ✓ Aronne, G., & Wilcock, CC (1995). Labilité reproductive dans la biologie de pré-dispersion de *Rhamnus alaternus*L (Rhamnaceae). *Protoplasma*, 187 (1), 49-59.
- ✓ Andrews, J.M., 2001. Determiration of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy* 48, 5-16.

❖ B

- ✓ Bortolomeazzi, R., Sebastianutto, N., Toniolo, R. et Pizzariello, A. (2007). Évaluation comparative de la capacité antioxydante des phénols aromatisants de fumée par inhibition du blanchiment de la crocine, piégeage des radicaux DPPH et potentiel d'oxydation. *Chimie alimentaire*, 100 (4), 81481-1489.
- ✓ Baba Aissa, F. (2000). Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. Ed Librairie moderne Rouiba, 368.
- ✓ Bas Lay, JM, Gómez López, C., & Pons Ferrán, P. (2002). Caracterización morfológica y structural de los frutos del aladierno (*Rhamnus alaternus* L.) en el noreste de la Península Ibérica 89–103.
- ✓ Bhourri, W., Boubaker, J., Kilani, S., Ghedira, K., & Chekir-Ghedira, L. (2012). Flavonoïdes de *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) : le kaempférol 3-O- β -isorhamninoside et la rhamnocitrine 3-O- β -isorhamninoside protègent contre les dommages à ; ADN dans les cellules lymphoblastoïdes humaines et améliorent ; activité antioxydante. *Revue sud-africaine de botanique*, 80, 57-62.
- ✓ Ben Ammar, R., Kilani, S., Bouhlel, I., Ezzi, L., Skandrani, I., Boubaker, J., & Ghedira, K. (2008). Activités antiprolifératives, antioxydantes et antimutagènes des extraits enrichis en flavonoïdes de (tunisien) *Rhamnus*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- alaternus L. : combinaison avec la composition phytochimique. *Toxicologie des médicaments et des produits chimiques*, 31 (1), 61-80.
- ✓ Bas, JM, Oliveras, J., & ; Gómez, C. (2009). Myrmécochorie et devenir à court terme des graines de *Rhamnus alaternus*: espèces de fourmis et caractéristiques des graines. *Acta Oecologica*, 35 (3),1-5.
 - ✓ Bas, JM, Gómez, C., & ; Pons, P. (2005). Production de fruits et chute des graines avant la dispersion et prédation chez *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae). *Acta Oecologica*, 27 (2), 115-123.
 - ✓ Bhourri, W., Sghaier, MB, Kilani, S., Bouhleb, I., Dijoux-Franca, MG, Ghedira, K., & ; Ghedira, LC (2011). Evaluation de ; activité antioxydante et antigénotoxique de deux flavonoïdes de *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) : Kaempférol 3-O- β -isorhamninoside et rhamnocitrine 3-O- β isorhamninoside. *Toxicologie alimentaire et chimique*, 49 (5), 1167-1173.
 - ✓ Ben Ammar, RB, Bouhleb, I., Valenti, K., Sghaier, MB, Kilani, S., Mariotte, AM, ... & ; Chekir-Ghedira, L. (2007). Réponse transcriptionnelle de gènes impliqués dans le système de défense cellulaire dans des cellules humaines stressées par H₂O₂ et prétraitées avec des extraits (tunisiens) de *Rhamnus alaternus* : Combinaison avec des composés polyphénoliques et des tests in vitro classiques. *Interactions chimico-biologiques*, 168 (3), 171-183.
 - ✓ Ben Ammar, R., Bhourri, W., Ben Sghaier, M., Boubaker, J., Skandrani, I., Neffati, A., & ; Bouhleb, I. kilani S., Mariotte AM, Chekir-Ghedira L., Dijoux-Franca MG et Ghedira K. (2009): Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L (Rhamnaceae): A structureactivity relationship study. *Food Chemistry*. In press, 9-22.
 - ✓ Ben Ammar, RB, Sghaier, MB, Boubaker, J., Bhourri, W., Naffeti, A., Skandrani, I., ... & ; Chekir-Ghedira, L. (2008). Activité antioxydante et inhibition de la mutagénicité induite par ; aflatoxine B1, le nifuroxazide et ; azoture de sodium par des extraits de *Rhamnus alaternus* L. *Chemico-Biological Interactions*, 174 (1), 1-10.
 - ✓ Boizot, N., & ; Charpentier, J. P. J. P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de;INRA*, 79-82..

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ✓ Balasundram, N., Sundram, K. et Samman, S. (2006). Composés phénoliques dans les plantes et les sous-produits agro-industriels : activité antioxydante, présence et utilisations potentielles. *Chimie alimentaire*, 99 (1), 191-203.
- ✓ Bruneton J. (1999) : pharmacognosie. *Phytochimie. Plantes médicinales*. 3^e édition. TEC et DOC : Lavoisier, paris. ISBN 2-7430-0315-4 :227-387.
- ✓ BOUKEROUIS, D. (2008). Caractérisation pouvoir antioxydant des extraits de *fraxinus angustifolia* et *pistacia lentiscus* (Thèse de doctorat, Université de Béjaia-Abderrahmane Mira).
- ✓ Bruneton, J. (1999). *Plantes toxiques et végétaux dangereux pour l'homme et les animaux* » p,153. Editions Tec et Doc. Paris.
- ✓ Billing, J., & Sherman, PW (1998). Fonctions antimicrobiennes des épices : pourquoi certains ; aiment chaud. *La revue trimestrielle de biologie*, 73 (1), 3-49.

❖ C

- ✓ Calvo, MI, & Cavero, RY (2014). Plantes médicinales utilisées pour les maladies cardiovasculaires en Navarre et leur validation à partir de sources officielles. *Journal ; ethnopharmacologie*, 157, 268- 273.
- ✓ Cowan, MM (1999). Produits végétaux comme agents antimicrobiens. *Revue de microbiologie clinique*, 12 (4), 564-582.

❖ D

- ✓ Debeaux, JO (1984). 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. Klincksieck, Paris, 81-82.
- ✓ Dworkin, MM and Falkow, S (2006). *Proteobacteria, Gamma subclass*. Springer, New York, NY,1248.
- ✓ Desai, MR, & Ghosh, SK (2003). Exposition professionnelle aux champignons en suspension dans ; air chez les travailleurs des rizeries, avec une référence particulière aux souches ; *A. flavus* productrices ; aflatoxines. *Annales de médecine agricole et environnementale*, 10 (2).

❖ F

- ✓ Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C. (2008). Composition phénolique des organes de *Cynara cardunculus* L. et leurs activités biologiques. *Comptes rendus biologies*, 331 (5), 372-379.

❖ G

- ✓ Gulias, J., Traveset, A., Riera, N., & Mus, M. (2004). Étapes critiques du processus de recrutement de *Rhamnus alaternus* L. *Annals of Botany*, 93 (6), 723-731.
- ✓ Genné, D., Siegrist Hans, H., 2003. De l'antibiogramme à la prescription d'un antibiotique. *Forum Med Suisse*, pp. 464-468.

❖ H

- ✓ Hemmami, I., Allagui, MB, Chakroun, M., Gazzah, ME (2006). *Rhamnus lycioides* en Tunisie est un nouvel hôte écidien de la rouille couronnée de ; avoine. *Revue européenne de pathologie végétale*, 115, 357-361.
- ✓ Herrera, CM (1984). Une étude des frugivores aviaires, des plantes dispersées par les oiseaux, et de leur interaction dans les garrigues méditerranéennes. *Monographies écologiques*, 54 (1), 1-23.
- ✓ Haslam, E (2007). *Revue Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime*.
- ✓ Hopkins W.G (1995). *Physiologie végétale*. 2édition. DeBoeck, Bruxelles : 278-280
- ✓ Hennebelle T (2006). *Investigation chimique et chimiotaxonomique et Pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants. Marrubium peregrinum, Ballota larendana, Ballota Pseudodictamnus (Lamiacées) et Lippia alba (Verbenacées)*. Thèse de Doctorat en Chimie Organique et Macromoléculaire. Université des Sciences et Technologique de Lille.

❖ I

- ✓ Izhaki, I., Tsahar E., Irena P. et Jacob F (2002). Within population variation and interrelationships between morphology, nutritional content, and secondary compounds of *Rhamnus alaternus* fruits. *New Phytologist*, 156: 217-223.

❖ K

- ✓ Krishnan, S. Manavathu, E.K. and Chandrasekar P. H (2009). *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. *Mycoses*; 52: 206-222.
- ✓ Kaufmann SHE (1997). Host response to intracellular pathogens. Ed. Springer; R.G. Landes, New York; Austin, 345.
- ✓ Kosalec I., Kremer D., Locatelli M., Epifano F., Genovese S., Carlucci G., Randić M & Zovko Končić M. (2013). Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial activity of bark extracts of *Rhamnus alaternus*, *R. fallax*, *R. intermedia* and *R. pumila*. *Journal of Food Chemistry* 136, 335–341.

❖ L

- ✓ Lahsissene, H., Kahouadji, A., & Hseini, S. (2009). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc Occidental). *Lejeunia*, revue de botanique.

❖ M

- ✓ Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires; importance économique. PPUR presses polytechniques. 4-5.

❖ P

- ✓ Percival, SL (2004). *Microbiology of waterborne diseases*. Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston, 480.

❖ Q

- ✓ Quezel, P and Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Centre nationaux de la recherche scientifique, Paris, 617-620.

❖ R

- ✓ Richardson, J. E., Fay, M. F., Cronk, Q. C., Bowman, D., & Chase, M. W. (2000). A phylogenetic analysis of Rhamnaceae using rbcL and trnL-F plastid DNA sequences. *American Journal of Botany*, 87(9), 1309-1324.
- ✓ Ribereau-Gayon, P. (1968). Notions generales sur les composes phenoliques, methodes generales d'etudes des composes phenoliques. Les composés phénoliques des végétaux. 105-133.
- ✓ Rasooli, I., & Abyaneh, M. R. (2004). Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food control*, 15(6), 479-483.

❖ S

- ✓ Sarni-Manchado, P and Cheynier, V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec &Doc, Paris,2-10.
- ✓ Stocker, P., Yousfi, M., Djerridane, O., Perrier, J., Amziani, R., El Boustani, S., & Moulin, A. (2004). Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie*, 86(12), 919-925.

❖ T

- ✓ Takahashi, H., Kamimura, H., & Ichinoe, M. (2004). Distribution of Aflatoxin-Producing *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in Sugarcane Fields in the Southernmost Islands of Japan. *Journal of food protection*, 67(1), 90-95.

❖ V

- ✓ Van Delden, C., & Iglewski, B. H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging infectious diseases*, 4(4), 551.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ✓ Vatter, D. A., Ghaedian, R., & Shetty, K. (2005). Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 14(2).

❖ Y

- ✓ Yao, K., De Luca, V., & Brisson, N. (1995). Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*. *The Plant Cell*, 7(11), 1787-1799.
- ✓ Yi-ling, C, et Pan-Kai, C. (1982). Rhamnaceae. In: Chen Yi-ling, ed *Fl. Reipubl Popularis Sin.* 48(1) ,1-169.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Préparation des solutions :

HCL (1%)

AlCl₃ (2%) : 2g dans 100 ml méthanol à 80%

DPPH : 4mg dans 100 ml méthanol à 80%

Folin-Ciocalteu (10%) : 1 ml de Folin-Ciocalteu + 9 ml eau distillée

Annexe 2

Tableau 6 : Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec *Escherichia coli* d'extrait méthanolique

Concentration extrait	0,32 mg/ml	0,16mg/ml	0,08mg/ml	0,04mg/ml
EMF	8	7	7	7
EME	9	8	8	7
EMR	9	9	8	6

Tableau 7 : Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec *Escherichia coli* d'extrait aqueux

Concentration Extrait	0,32mg/ml	0,16mg/ml	0,08mg/ml	0,04mg/ml
EAF	10	8	8	7
EAE	10	9	7	6
EAR	10	8	7	6

Tableau 8 : Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec *Staphylococcus aureus* d'extrait méthanolique

Concentration Extrait	0,32mg/ml	0,16mg/ml	0,08mg/ml	0,04mg/ml
EMF	10	9	8	7
EME	10	8	8	6
EMR	9	8	7	6

Tableau 9 : Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec *Staphylococcus aureus* d'extrait aqueux

Concentration Extrait	0,32mg/ml	0,12mg/ml	0,08mg/ml	0,04mg/ml
EAF	10	9	8	7
EAE	10	9	8	7
EAR	10	8	8	6