

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique



Mémoire de Master

Filière: Sciences biologiques

Option: pharmacologie moléculaire

Thème

*Etude de l'activité antibactérienne des extraits de *Rhamnus alaternus* L.*

Présenté par : BOUSSAA Karima & IZERAREN Leila.

Soutenu le : **16 juin 2016.**

Devant le jury composés de :

Mme KADJI H.	MCB	Président
Mr TACHERFIOUT M.	MAA	Promoteur
Mme ZEMOURI S.	MAA	Examineur

Année universitaire : **2015/2016**

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique



Mémoire de Master

Filière : Sciences biologiques

Option : pharmacologie moléculaire

Thème

*Etude de l'activité antibactérienne des extraits de *Rhamnus alaternus* L.*

Présenté par : BOUSSAA Karima & IZERAREN Leila.

Soutenu le : **16 juin 2016.**

Devant le jury composés de :

Mme KADJI H.	MCB	Président
Mr TACHERFIOUT M.	MAA	Promoteur
Mme ZEMOURI S.	MAA	Examineur

Année universitaire : **2015/2016**

Remerciements

Avant toute chose, on tient à remercier Dieu le tout puissant, de nous avoir donnée la force, la patience et le courage pour réaliser ce travail.

On exprime d'abord nos profonds remerciements à notre encadreur Monsieur TACHERFIOUT M. pour l'honneur qu'il nous a fait de nous encadrer, pour son soutien, son attention, ses bons conseils et pour ses qualités humaines. Pour tout cela on tient à lui exprimer toute notre gratitude.

Nous tenons à remercier Mme KHADJI H. de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de notre soutenance.

Nos remerciements s'adressent aussi à Mme ZEMOURI S. d'avoir accepté d'examiner notre travail

Nous tenons à remercier également Dr DJAMA L. de nous avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Nous exprimons nos sincères remerciements aussi et notre profonde gratitude à monsieur Mr BOUKHALFA F. pour le temps précieux et l'intention qu'il nous a consacré en dépit de ses nombreuses tâches.

A l'équipe de l'animalerie : SAIDA, HABIBA, pour leur aide Précieuse.

En fin nous tenons à remercier tous nos ami (e) s pour leurs Soutiens tout au long de l'élaboration de ce mémoire.

KARIMA ET LEILA

Dédicace

C'est avec un grand honneur que je dédie ce modeste travail aux deux personnes qui se sont sacrifiées pour que je grandisse avec un savoir faire et qui m'ont appris à ne jamais baissé les bras....

A mes chers parents, de votre affection et de tous les efforts que vous avez déployés durant toute ma vie j'espère que ce travail soit l'expression de ma pleine gratitude et de mon profond respect

Je dédie ce travail également :

A mes chers frères : Abde aziz, Abde rahmane et Daoud

A mes chères sœurs : Sonia, Kahina et Tassaidit

A toute ma famille et mes amis « es »

*pour leur présence et le soutien de tous les instants qu'ils m'ont apportés,
avec toute mon affection et ma reconnaissance*

A mon cher binôme Leila ainsi toute sa famille

A tous ceux qui me sont chers

Que dieu les protège tous

Karima Boussaa

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Mon très cher père pour tous ce qu'il a fait pour moi durant toutes mes années d'étude, pour ses encouragements et ses orientations.

Ma très chère mère pour son sacrifice, son aide, ses conseils et sa patience.

Mes très chers frères et sœurs « Mouloud, Zahir, Farid, Nassima, Safia, Hakima, Chafiaa »

Mes beaux frères et belles sœurs «lhafid,mourad,yanis,reda,ourida , fahima »

Mes chères neveux et nièces « moukrane, lyliya, amine, ziad, inasse, ilham, nihal, mohand, nylia, réda,

Myriame »

Mon cher binôme Karima avec qui j'ai partagé mes bons moments, sans oublier sa famille.

Mes très chère ami(e)s en particulier « Fouzia, Mima, Safia, Hanane » En témoignage de l'amitié sincère qui nous a liées et des bons moments passés ensemble, je vous dédie ce travail en vous souhaitons un avenir radieux.

Mes enseignants qui m'ont suivi tout au long de mon cursus universitaire.

A tous mes collègues de la promotion 2015 pharmacologie moléculaire.

IZERAREN LEILA

Liste des abréviations

Abs : Absorbance.

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

AE :éthyl acétate

AFB1 : Aflatoxine B1.

AlCl₃ : Chlorure d'Aluminium.

ATCC : Américain Type Culture Collection.

BUT : Butanol.

BSA : Bovine Sérum Albumine.

CCE : Commission des Communautés Européennes.

Chl :chloroforme .

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

EAG : Equivalent en Acide Gallique.

EAT : Equivalent Acide Tannique.

EMB : Eosine bleu de méthylène.

EQ : Equivalent Quercitrine.

ERO : Espèce Réactive de l'O₂.

FeCl₃ : Chlorure Ferrique.

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène.

Na₂CO₃ : Bicarbonate de Sodium.

NaCl : Chlorure de sodium.

NaOH : Hydroxyle de Sodium.

OMS : Organisation Mondiales de la Santé.

PM : Poids Moléculaire.

SDS : Dodecyl Sulfate de Sodium.

SEM : standard Error Means.

TBS :Tryptic Soy broth.

TEA : Triéthanolamine.

UFC : Unité From Colonie.

UV :Ultrat-Violet.

Liste des tableaux

N°	Titre	page
Tableau I	les noms vernaculaires de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	4
Tableau II	Classification botanique de <i>Rhamnus alaternus</i> .	5
Tableau III	principales classes des composés phénoliques.	10
Tableau IV	Les principales familles de flavonoïdes.	13
Tableau V	Référence des souches bactériennes testées.	26
Tableau VI	Classification de souches bactériennes testées.	26
Tableau VII	Nomination et concentration des fractions de l'extrait méthanolique étudiées.	27
Tableau VIII	Nombre d'UFC/ml correspond à la longueur maximale de chaque souche avec une absorbance égale à 0,5.	28
Tableau IX	les pourcentages d'extraction des extraits des feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> .	33
Tableau X	Diamètre de zone d'inhibition (en mm) obtenu avec <i>E coli</i> et <i>S aureus</i> .	40

Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure 01	fruits, feuilles et graines de <i>Rhamnus alaternus L</i> (a: les feuilles et les fruits, b: la graine).	4
Figure 02	La structure chimique des flavonoïdes.	6
Figure 03	La structure chimique des anthraquinones glycosidés de <i>Rhamnus alaternus</i> .	7
Figure 04	principaux acides hydroxybenzoïque.	11
Figure 05	Principaux acides hydroxycinnamiques.	11
Figure 06	structure de base des flavonoïdes.	12
Figure 07	la structure chimique d'anthocyane.	14
Figure 08	Un exemple de stilbénes (resvératrol).	15
Figure 09	Structure chimique des lignines.	16
Figure 10	Structure chimique d'un tannin hydrolysables (Gallotannins (1), Ellagitannins (2)).	17
Figure 11	Structure générale des proanthocyanidines.	18
Figure 12	Les feuilles (fraîches, sèches) et poudre de <i>Rhamnus alaternus L</i> (a: les feuilles fraîches, b: les feuilles sèches, c: la poudre).	20
Figure 13	Macération, filtration et récupération de filtrat (filtrat 1+filtrat 2) et évaporation du méthanol dans un évaporateur rotatif (a: macération, b: filtration, c: filtrat, d: évaporation d'extrait).	21
Figure 14	Extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter	21
Figure 15	Protocole de préparation des quatre extraits de <i>rhamnus alaternus L</i> .	22
Figure16	Les étapes de dosage des tanins.	25
Figure 17	Elevage des souris Swiss albinos au sein de l'animalerie de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia.	29

Figure 18	Teneurs en polyphenols totaux des quatre fractions.	34
Figure 19	Teneurs en flavonoïdes des quatre fractions.	36
Figure 20	Teneurs en tannins des quatre extraits de <i>R. alaternus</i> .	37
Figure 21	Effet antibactériens des quatre fractions vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i> a différentes concentration.	42
Figure 22	Effet antibactériens de quatre fractions vis -à-vis <i>Escherichia coli</i> à différentes concentration.	43
Figure 23	taux des triglycerides.les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM.	46
Figure 24	taux de cholestérols total.les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM.	47

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	01

Chapitre I : Partie bibliographique

I-Généralités sur <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	03
I.1-Description et caractéristiques	03
I.2- Les noms vernaculaires de <i>Rhamnus alaternus</i>	04
I.3- Classification botanique de <i>Rhamnus alaternus</i>	04
I.4-Usage traditionnel	05
I.5-Composition biochimique.....	05
I.6-Activités biologiques	07
I.6.1-Activité antimutagène	07
I.6.2-Activités antioxydants	07
I.6.3-Activité antigénotoxique.....	08
I.6.4-Activités anti-enzymatique.....	08
I.6.5-Activité anti-inflammatoire	08
II-Généralités sur les composés phénoliques.....	09
II.1-Définition	09
II.2-Classification	09
II.2.1-Acides phénols simples.....	10
II.2.1.1-acide hydroxybenzoïque.	10
II.2.1.2-acide hydroxycinnamique	11
II.2.2-Flavonoïdes	11
II.2.3-Anthocyanines.....	14
II.2.4-Stilbènes.....	14
II.2.5-Lignines.....	15
II.2.5.1-Tanins.....	16
II.2.5.2-Tanins hydrolysables	16
II.2.6-Tanins condensés.....	17

II.3-Activité antimicrobienne des polyphénols	18
II.3.1-Activité antimicrobienne des flavonoïdes.....	18
II.3.2-Activité antimicrobienne des tanins.....	19
II.3.3-Activité antimicrobienne des acides phénoliques	19

Chapitre II: Matériel et méthodes

II.1-Préparation du matériel végétal.....	20
II.2- Extraction.....	20
II.3-Fractionnement de l'extrait méthanolique.....	21
II.4-Analyses phytochimiques.....	22
II.4.1-dosages des polyphénols totaux.....	23
II.4.2-Dosages des flavonoïdes.....	23
II.4.3-dosage des tanins.....	24
II.5-Etude de l'activité antibactérienne.....	26
II.5.1-Définition de l'activité antibactérienne.....	26
II.5.2- Les souches bactériennes testées.....	26
II.5.3-Tests d'évaluation de l'effet antibactérien.....	27
II.5.3.1- Standardisation des inocula bactériens.....	27
II.5.3.2-Repiquage et purification des souches.....	27
II.5.3.4-Préparation des dilutions des extraits.....	27
II.5.3.5-Antibiogramme	27
II.6-Evaluation de l'effet des fractions de l'extrait méthanolique de <i>Rhamnus alaternus L.</i> sur l'hyperlipidémie induite par triton WR-1339 (Tyloxapol).....	28
II.6.1-Matériel animal.....	29
II.6.2-Etude de l'effet anti- l'hyperlipidémique	30
II.6.2.1-Induction de l'hyperlipidémie.....	30
II.6.2.2-Protocole expérimentale	30
II.6.3-Dosages des paramètres lipidiques sanguins.....	30
II.6.3.1-Dosage du cholestérol total.....	30
II.6.3.2-Dosage des triglycérides.....	31

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1- Taux d'extraction.....	33
-------------------------------	----

III.2- Analyse phytochimique.....	34
III.2.1- Teneur en polyphénols totaux	34
III.2.2- Teneur en flavonoïdes	35
III.2.3- Teneur en tannins.....	36
III-3-Activités antimicrobienne.....	38
III-3-1- Antibiogramme à l'égard des souches étudiées.....	38
III.3.1.1- Antibiogramme à l'égard de <i>S. aureus</i> (Gram positif).....	41
III.3.1.2- Antibiogramme à l'égard d' <i>E. Coli</i> (Gram négatif).....	41
III.4-Dosage du cholestérol total et des triglycérides plasmatiques.....	46
Conclusion et perspectives.....	48
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

Les plantes supérieures produisent des centaines de milliers de composés chimiques divers avec différentes activités biologiques et rôles écologiques importants. Dans de nombreux cas, ces substances ou composés servent de mécanisme de défenses chimiques contre les insectes, herbivores et micro-organismes.

Les infections humaines causées par des champignons et des bactéries sont augmentées considérablement dans les dernières années (**Fiori et al., 2013**). Des études *in vitro* et épidémiologiques suggèrent que la consommation des aliments riches en composés phénoliques pourraient diminuer de manière significative le risque de certains problèmes de santé en raison de leurs propriétés antioxydants et propriétés antibactériennes (**Alves et al., 2013**).

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des végétaux. Permettant de résister aux diverses agressions. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés. D'un point de vue thérapeutique, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales (**Macheix et al., 2005**).

Le rôle des composés phénoliques est reconnu dans différents aspects de la vie de la plante. Ils peuvent en effet intervenir dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance...), dans les critères de qualité (couleur et qualité nutritionnelle), dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique et dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies (**Macheix et al., 2005**).

Rhamnus alaternus appartient à la famille des Rhamnaceae (**Cuoco et al., 2014**), c'est un arbuste vivace dioïque distribués dans tout le bassin méditerranéen (**Bas et al., 2009**). Les propriétés thérapeutiques de l'espèce *Rhamnus alaternus* L. ont été mises en évidence *in vitro*, elles sont dues à des composés actifs tels que les polyphénols (**Ben ammar et al., 2008**). Les feuilles sont utilisées comme laxatif, purgatif, hypotensive et pour traiter les affections dermatologiques et hépatiques (**Ben ammar et al., 2005**).

La présente étude a pour objectif l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits d'une plante médicinale locale ; *Rhamnus alaternus*. Notre travail se répartit en deux parties : la première partie est une synthèse bibliographique où nous apportons des généralités sur les plantes et les composés phénoliques. La deuxième partie est la partie expérimentale qui est consacrée à l'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles de *Rhamnus*

alaternus, leur dosage et leur effet antibactériens vis-à-vis d'*E coli* et *Staphylococcus aureus*. Enfin, une conclusion qui résumera tous les résultats obtenus et quelque perspectives.

Chapitre I

Partie bibliographique

I-Généralités sur *Rhamnus alaternus* L

I.1-Description et caractéristiques

Rhamnus alaternus L. est une espèce botanique qui appartient à la famille des Rhamnaceae (Cuoco et al., 2014), c'est une famille endémique d'arbres, arbustes et herbacées qui contient environ 50 genres et 900 espèces (Richardson et al., 2000). Les plantes de cette famille sont connues comme espèces médicinales possédant diverses propriétés biologiques (Bas et al., 2005 ; Bhourri et al., 2011).

Rhamnus alaternus L. est une plante vivace et arbuste à fruits charnus dioïque (Bas et al., 2005) de 2-6 mètres de hauteur (Bas et al., 2009). Les fruits mûrs sont des drupes noires porte habituellement deux à cinq graines triangulaires (2.5 millimètres, 4.6 millimètres et 9.1 mg ; la largeur, la longueur et le poids maximum respectivement) et chaque graine est incluse dans un endocarpe qui s'ouvre quand la pulpe de fruit est éliminée (figure 1) (Gullias et al., 2004 ; Bas et al., 2005 ; Bas et al., 2009).

Le fruit charnu de ce genre de plantes représente une source importante d'eau et de nutriment pour les oiseaux et les petits mammifères (Miralles et al., 2011). Ces caractéristiques en font de *R. alaternus* une espèce importante de la région Méditerranéenne, où elle s'est bien adaptée pour les températures très élevées, les radiations solaires et les déficits de vapeur et de pression (Miralles et al., 2011). En outre, elle a une grande valeur ornementale en raison de sa brillante feuillure coriace verte, qui avec ses petits fruits rouges crée un effet très agréable. Elle est également bien adaptée à la culture en pot (Yi-ling et Pan-kai, 1982 ; Miralles et al., 2011).

La reproduction est très variable en fonction des caractéristiques de l'environnement et de la population (Gullias et al., 2004). La production et la maturation des fruits de *R. alaternus* a été mentionnée dans différentes études dans la région de la Méditerranée occidentale, avec fruits mûrs entre juillet et août (Longo et al., 2005). L'inflorescence de cette plante se produit à la fin de l'hiver et au début du printemps. Les fruits charnus mûrissent en fin de printemps et début de l'été (Miralles et al., 2011). Les fleurs sont pollinisées par le vent et les insectes, les fruits mûrs sont dispersés par les oiseaux (Bas et al., 2005).

R. alaternus L. (Rhamnaceae) est un arbrisseau caractéristique de la région méditerranéenne (Bas et al., 2005 ; Ben Ammar et al., 2008). Il joue un rôle important dans la composition des maquis qui couvrent une bonne partie du littoral et des îles de la

Méditerranée (Lev-Yadun et al., 2009). *R. alaternus* habite les coteaux secs et calcaires du Sud de la France, de la Corse, de l'Algérie, du Nord de la Tunisie (Ben Ammar et al., 2008). *Rhamnus alaternus* est utilisés généralement dans le programme de reboisement, en raison de sa résistance dans les environnement xériques (Gulias et al., 2004).

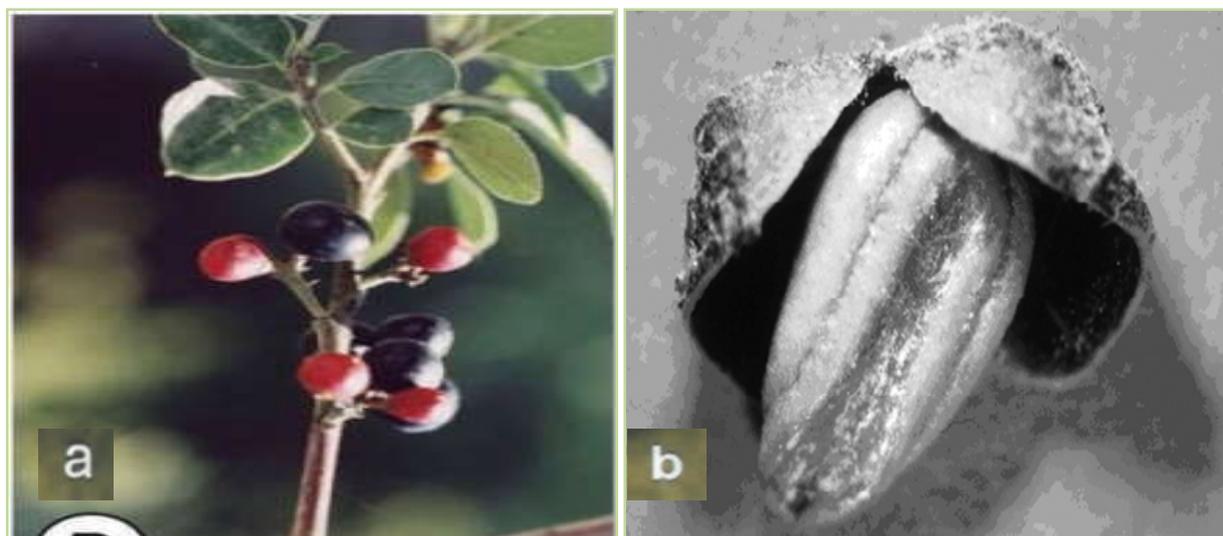


Figure 1 : fruits, feuilles et graines de *Rhamnus alaternus* L. (Bas et al., 2002 ; Lev-Yadun et al., 2009). a: les feuilles et les fruits, b: la graine

I.2- Les noms vernaculaires de *Rhamnus alaternus*

Les noms vernaculaires sont indiqués dans le tableau I.

Tableau I : les noms vernaculaires de *Rhamnus alaternus* L. (Gubb, 1913 ;Bhourri et al., 2012 ; Ben Ghezala et al., 2015).

Nom français	Nerprun mediterraneen.
Nom Allemand	Kreülzdorn.
Nom Espagnol	Aladierna, Cosco Unia, Sanguino de Andalucia.
nom Italien	Alaterno, Legno Puzzo.
Nom Arabe	Oud el-khir.
Nom Kabyle	Imlillesse, mlillesse
Nom Anglais	Mediterranean Buckthorn.

I.3- Classification botanique de *Rhamnus alaternus*

La classification botanique de *Rhamnus alaternus* est résumée dans le tableau II.

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

domaine	Aucaryota-eucaryote
Règne	Plantae-végétal
Sous règne	Viridiaeplantae-plantes vertes
Phylum	Magnoliophyta-plantes à fleurs
Sous phylum	<i>Spermatophytina-plantesagraines</i>
Infraphylum	<i>Angiospermae-angiosperme</i>
Classe	<i>Magnoliopsida-dicotyledones</i>
Sous classe	<i>Rhosidae</i>
Super ordre	<i>Rhamnanae</i>
Ordre	<i>Rhamnales</i>
Famille	<i>Rhamnaceae</i>
Genre	<i>Rhamnus</i>
Espèce	<i>Rhamnus alaternus</i>

I.4-Usage traditionnel

Rhamnus alaternus a été employé et largement dans la médecine en Tunisie et de nombreux autres pays d'Afrique du Nord (Ben Ammar et al., 2007 ; Ben Ammar et al., 2008). Cette plante a été utilisée comme un laxatif, purgatif, diurétique et antihypertenseur dépuratif (Ben Ammar et al., 2008 ; Ben Ammar et al., 2009) et pour le traitement de diabète (Ben Guezala et al., 2015). La décoction des parties aériennes de *Rhamnus alaternus* L tel que l'écorce est utilisée dans les pays d'Afrique du Nord contre certains affections dermatologique et hépatiques (Ben Ammar et al., 2008).

I.5-Composition biochimique

L'étude phytochimique des extrait de *R. alaternus* à montré la présence de divers composés polyphénoliques, anthraquinones, tanins et en particulier les flavonoïdes qui sont décrit par de nombreux auteurs comme des molécules antioxydants (Ben Ammar et al., 2007). Quatre anthraquinones aglycones ont été isolé à partir de la partie aérienne de *R.*

alaternus qui sont l'émodin, le chrysofanol, l'alaternin et le physcion (figure 3) (Ben Guazela et al., 2015). Trois flavonoïdes glycosylés ont été également isolés de feuille de *Rhamnus alaternus* : le kaempferol 3-O-Bisorhamninoside, le rhamnocitrin 3-O-Bisorhamninoside et rhamnetin-3-O-B-isorhamninoside (figure 2) (Bhourri et al., 2011) et des flavonoïdes aglycones comme le kaempferol, la quercétine et l'apigénine (Ben Ammar et al., 2008 ; Ben Ammar et al., 2009). Elle est aussi riche en flavones hétérosides (Stocker et al., 2004) et coumarins (Ben Ammar et al., 2005).

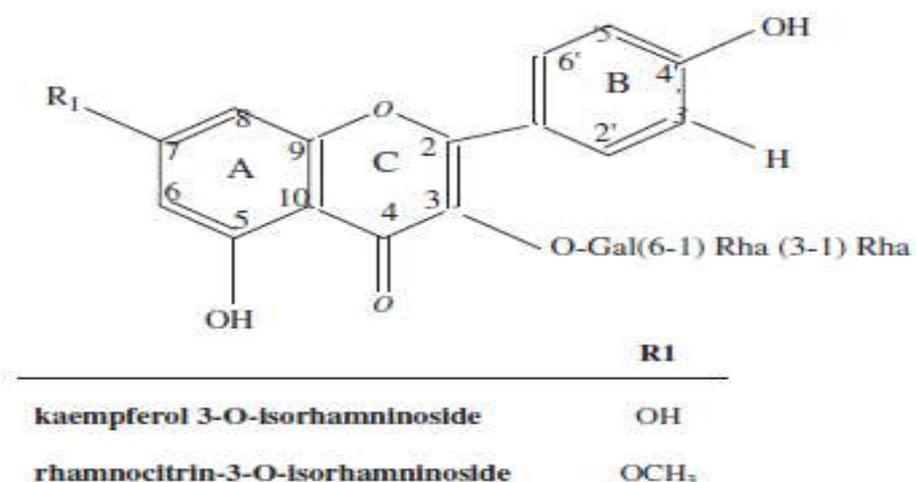
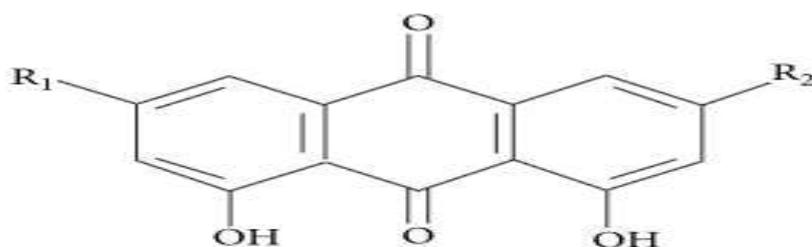


Figure 2 : La structure chimique des flavonoïdes de *Rhamnus alaternus* (Bhourri et al., 2012).



Aloe-emodin: $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$; $R_2 = \text{H}$

Chrysophanol: $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$

Emodin: $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{OH}$

Rhein: $R_1 = \text{COOH}$; $R_2 = \text{H}$

Physcion: $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{OCH}_3$

Figure 3: La structure chimique des anthraquinones de *Rhamnus alaternus* (Ben Ghezala et al., 2015).

I.6-Activités biologiques

I.6.1-Activité antimutagène

L'effort oxydant provoqué par des espèces réactives de l'oxygène induit l'oxydation des biomolécules menant aux dommages cellulaires (Ben Ammar et al., 2008). L'extrait organique de *R. alaternus* a une propriété antimutagène qui se traduit par l'inhibition des agents mutagène (Aflatoxine B1) qui pourrait être due à l'abondance des flavonoïdes et des tanins (Ben Ammar et al., 2005 ; Ben Ammar et al., 2007).

I.6.2-Activités antioxydantes

Le stress oxydatif, causé par les espèces réactives oxygénées (ROS), est connu pour causer l'oxydation de biomolécules conduisant à des dommages cellulaires et à l'oxydation des enzymes importantes (Ben Ammar et al., 2008). Les Espèces réactives oxygénées ont été reconnus comme jouant un rôle important dans l'initiation et / ou la progression de diverses maladies telles que l'athérosclérose, l'inflammation, le cancer et les maladies cardiovasculaire. L'activité antioxydante de l'extrait organique de *Rhamnus alaternus* est effectuée en empêchant la formation des radicaux libres, par piégeage des espèces réactives oxygénés (ROS) (Bhourri et al., 2012).

Certains extraits de *Rhamnus alaternus*, ont un potentiel d'activité antioxydante liée à la composition de la plante en flavonoïdes et polyphénols (**Ben Ammar, et al., 2008 ; Bhourri et al., 2012**). Les flavonoïdes neutralisent les radicaux libres, en se liant directement à ces derniers.

Les flavonoïdes de *Rhamnus alaternus* sont de bon chélateurs de métaux qui jouent un rôle important dans le métabolisme de l'oxygène et l'apparition des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la réduction du H₂O₂ par génération de quantité importante de radicaux libres hydroxyles (**Aschok, 2001**). Les travaux de **Yen (1995)** et **Kelly (2002)** ont démontré que les flavonoïdes, sont de bons donneurs d'électrons et d'hydrogène ce qui leur confère la capacité de terminer la chaîne de formation des radicaux, en convertissant les radicaux libres et les espèces réactives oxygénés (ROS) en produits stables.

I.6.3-Activité antigénotoxique

Les extraits de *Rhamnus alaternus* possèdent des propriétés antigénotoxiques qui peuvent contrer ou prévenir les effets indésirables causés par les produits chimiques endommageant l'ADN. En effet, des recherches ont montré que les composés phénoliques de *Rhamnus alaternus* exercent des propriétés antigénotoxique (**Ben Ammar et al., 2007**).

I.6.4-Activités anti-enzymatique

Des études in vitro ont montré que les extraits organiques de *R. alaternus* inhibent significativement l'activité des carboxyl estérases, enzymes largement distribuées dans les tissus animaux, essentiellement impliqués dans le catabolisme du nombreux xénobiotiques, tels que des carboxylesters, des thio-esters et des amides aromatiques. Cette propriété inhibitrice est attribuée aux flavonoïdes qui exercent une activité non compétitive (**Stocker et al., 2004**).

I.6.5-Activité anti-inflammatoire

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ont été reconnus comme jouant un rôle important dans l'initiation et/ou la progression de diverses maladies telles que l'athérosclérose, l'inflammation, le cancer et les maladies cardiovasculaires (**Bhourri et al., 2012**). Ainsi des études récentes ont montré que l'activité anti-inflammatoire des extraits de *Rhamnus alaternus* est corrélées avec la composition en polyphénols, en flavonoïdes, en tannins et en anthraquinones et que cette propriété est due principalement à leurs activités de piégeage des radicaux libres (**Ben Ammar et al., 2005**).

II-Généralités sur les composés phénoliques

II.1-Définition

Les polyphénols également dénommés composés phénoliques sont des métabolites secondaires très largement répandus dans le règne végétal (**Harnly et al., 2007 ; Quideau et al., 2011**). Ils font partie de l'alimentation animale, par exemple, l'homme consomme quotidiennement jusqu'à 10g de composés phénoliques (**Naczk and Shahidi, 2004**). Les variations en teneurs des composés phénoliques est souvent considérables d'une espèce à l'autre et même à l'intérieur de la même espèce (**Macheix et al., 2005**). Les polyphénols ont tous en commun un cycle aromatique (C6) portant un ou plusieurs groupes hydroxyles, libre ou engagés dans une autre fonction chimique (éther méthylique, ester, sucre....etc) (**Michalak, 2006**).

II.2-Classification

Plus de 8000 composés phénoliques ont été isolés dans une grande variété de formes (**Erdman et al., 2007 ; Harnly et al., 2007 ; Batra et Sharma, 2013**). La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples vers les molécules les plus hautement polymérisés (tanins condensés) (**Harnly et al., 2007**). Les polyphénols sont repartis en plusieurs classes illustrées dans le tableau III.

Tableau III : principales classes des composés phénoliques (**Balasundram et al., 2006**).

Structure	Classe
C6	Les acides phénoliques simples, benzoquinones.
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques
C6-C2	Acétophénones, acides phénylacétiques
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques, acides phénylacétiques (coumarins, isocoumarins, chromones, chromènes)
C6-C4	Napthoquinones
C6-C1-C2	Xantones
C6-C2-C6	Stilbénes, anthraquinones
C6-C3-C6	Flavonoïdes, isoflavonoïdes
(C6-C3) ²	Lignanes, neolignanes
(C6-C3-C6) ²	Biflavonoïdes
(C6-C3) ⁿ	Lignines
(C6-C3-C6) ⁿ	Tanins condensés

II.2.1-Acides phénols simples

Le terme acide-phénol peut s'appliquer à tout les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique. Ces composés peuvent être divisés en deux catégories : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique (**Massimo et al., 2007**).

II.2.1.1-acide hydroxybenzoïque.

Ils Sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure générale de base de type (C6-C1). Ils existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides (**Macheix et al., 2005**). les acides hydroxybenzoïques les plus abondant sont répertoriés dans la (Figure 4).

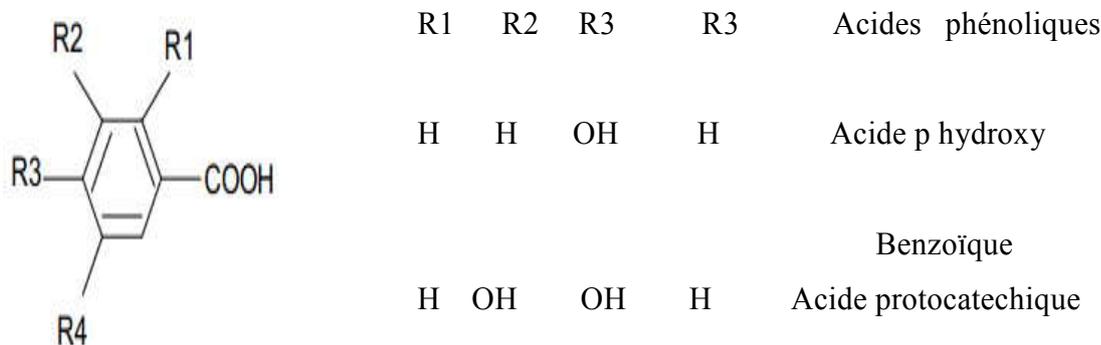


Figure 4: principaux acides hydroxybenzoïque (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

II.2.1.2-acide hydroxycinnamique

Il représente une classe très importante dont la structure de base est (C6-C3) dérivé de celle d'acide cinnamique grâce a des substitutions au niveau du cycle aromatique (Psotova et al., 2003). Ils entrent dans la composition de nombreux végétaux (surtout les fruits) et existent sous forme d'esters hydrosolubles (acide caféique) ou insolubles, associés aux fibres (acide férulique) (Sarni-Manchado et Cheynier , 2006). les acides hydroxycinnamiques les plus abondant sont répertoriés dans la (Figure 5).

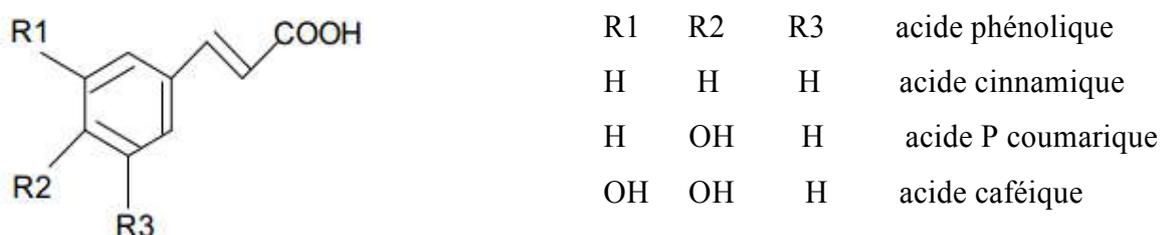


Figure 5 : Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

II-2-2-Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les principaux métabolites secondaires végétaux (Ralston et al., 2005). Ils constituent un grand groupe de composés phénoliques ayant une structure benzo-γ-

pyrone et sont omniprésents dans les plantes. Ils sont synthétisés par voie des phénylpropanoïdes (Winkel-Shirle, 2000). Ils se trouvent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides, en général dans toutes les plantes vasculaires, ou ils peuvent être localisés dans divers organes comme les racines, les tiges, les feuilles, les fleurs et les fruits (Havsteen et al., 2002).

Plus de 4000 variétés de flavonoïdes ont été identifiés, dont beaucoup sont responsables des couleurs attrayantes de fleurs, de fruits, et des feuilles (Nijveldt et al., 2001 ; Batra et Sharma, 2013). Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, par conséquent, il possède tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone, constitué de deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et d'un hétérocycle central C (Erdman et al., 2007) (Figure 6).

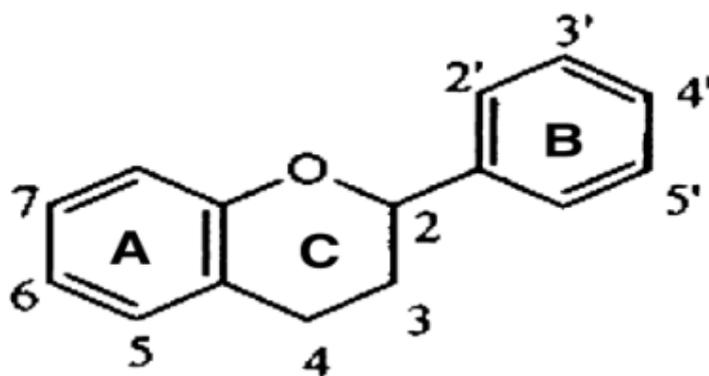
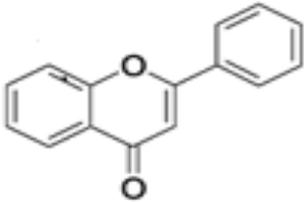
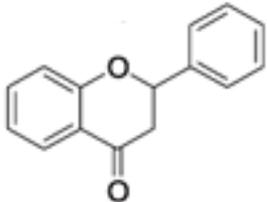
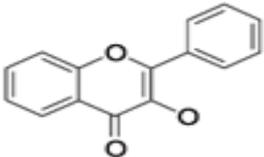
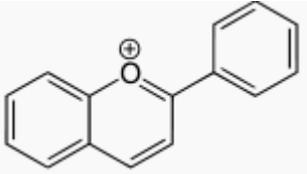
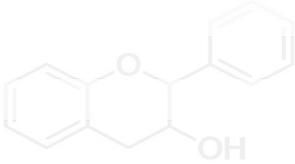


Figure 6 : structure de base des flavonoïdes (Erdman et al., 2007 ; Stefk, 2011).

Les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes sur la base de leur structure moléculaire. Les 5 principaux groupes de flavonoïdes, ainsi que les exemples les plus connus de chaque groupe, la structure moléculaire de chaque groupe de flavonoïdes et la source de nourriture dans laquelle ils sont présents est donnée dans le tableau IV (Nijveldt et al., 2001 ; Harnly et al., 2006).

Tableau IV: Les principales familles de flavonoïdes (Nijveldt et *al.*, 2001 ; Malesev et *al.*, 2007 ; Massimo et *al.*, 2010).

Familles	Exemples	Structures	Sources de nourriture
Flavones	Apigénine, lutéoline		les oignons, les pommes, le brocoli, les baies et persil
Flavanones	Naringénine, Butine		les agrumes
Flavonols	Kaempférol, Isorhamnétine, Quercétine, Myricétine		le thé vert et noir, le vin rouge, oignons et tomate
Anthocyanidines	Cyanidine, delphiciandine, pelargonidine, péonidine, petunidine		les fraises, les baies, les raisins, le vin et le thé
Flavone-3-ol= Flavanol	Catéchine, gallocatéchine, Epicatechine, Gallate		Chocolat, abricot

II.2.2-Anthocyanines

Les anthocyanines sont des composés phénoliques d'origine naturelle responsable de la couleur de nombreuses fleurs, fruits et baies. Ils sont glycosylés, polyhydroxylés (figure 11) et ont une large distribution dans le règne végétal (Longo et al., 2005 ; Currie et al., 2006 ; Qin et al., 2010). L'intérêt pour ce type de pigment a augmenté essentiellement en raison de leur possible utilisation comme colorant naturel. A cause de leur hydrosolubilité (les anthocyanes sont le plus grand groupe de pigments solubles dans l'eau), ils peuvent être en effets bénéfiques pour la santé comme agents anti-inflammatoires (Longo et al., 2005), et agent antioxydant (Ghosh et Konishi, 2005).

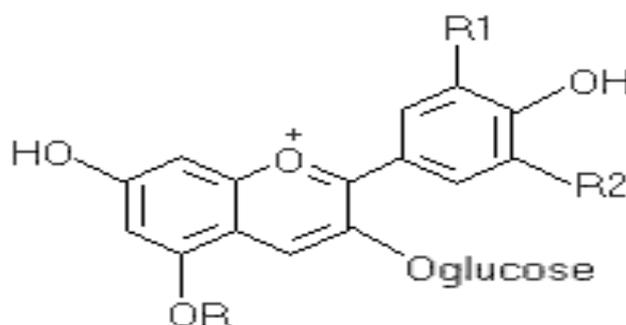


Figure 7: la structure chimique d'anthocyanane (Sava et al., 2006).

II.2.4-Stilbènes

Les stilbènes sont de petits poids moléculaire (environ 200-300g/mol), des composés d'origines naturel et se retrouvent dans un large éventail de sources végétales, des produits d'aromathérapie, et des compléments alimentaires. Les stilbènes agissent comme agents protecteur naturels pour défendre la plante contre les attaques virales et microbiennes et exposition aux ultraviolets excessive (Roupe et al., 2006). Parmi les stilbènes les plus abondant, le resvératrol (figure 7) qui est connu essentiellement pour ses diverses propriétés biologiques d'où son utilité pharmaceutique et médicinales (Delmas et al., 2003).

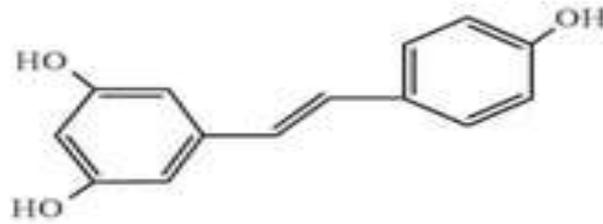


Figure 8: Un exemple de stilbénes (resvératrol) (Macheix *et al.*, 2005).

II.2.5-Lignines

Se sont les composants majeurs de la paroi cellulaire. Les lignines (du latin lignum, bois) sont les polymères les plus abondants après la cellulose (forme la paroi végétale) (Ralston *et al.*, 2005). Ils forment une structure hétérogène et agissent à la fois sur le maintien de l'intégrité structurale de la paroi cellulaire, ainsi qu'un échafaudage pour les polysaccharides. Les polysaccharides augmentent le caractère hydrophobe de la structure de la lignine, ce qui facilite le transport de l'eau dans les tissus, en empêchant l'absorption d'eau. Cette structure hydrophobe est cruciale pour l'action capillaire, ce qui permet à l'eau de passer à travers les capillaires de lignine doublé sans absorber dans la cellule végétale (Holderness *et al.*, 2008).

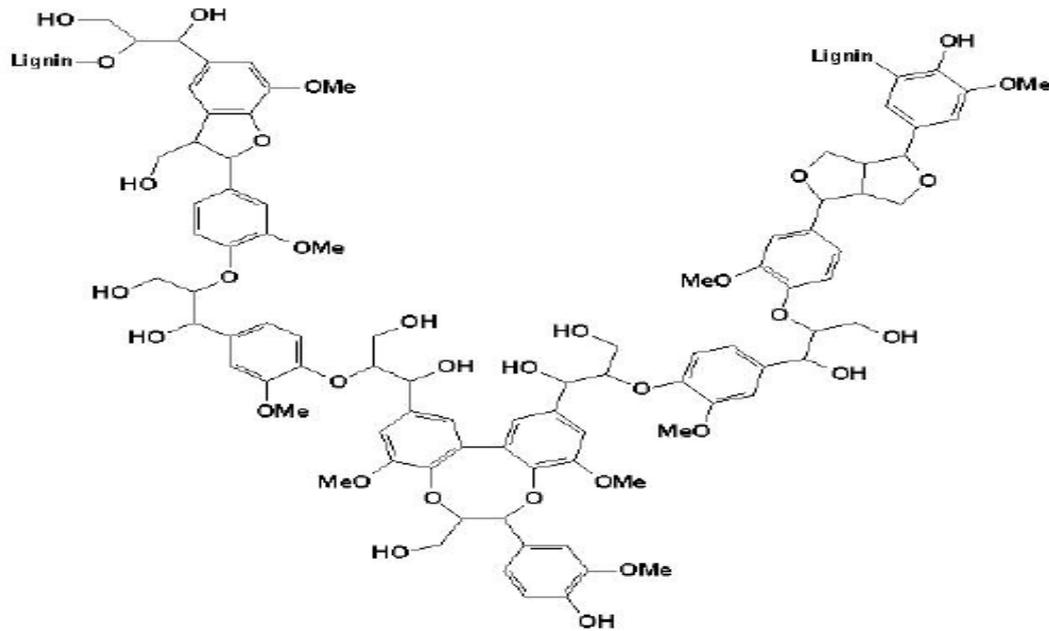


Figure 9: Structure chimique des lignines (Wertz et al., 2015).

II.2.6-Tannins

Les tanins sont des formes phénoliques condensées, ayant un poids moléculaire allant de 500 à 3000 daltons. Dans la nature les tannins se trouvent dans le monde entier dans de nombreuses familles de différentes plantes supérieures telles que le châtaignier et le bois de chêne (Paolini et al., 2003). Ils sont solubles dans l'eau (Akiyama et al., 2001). Le terme tannin vient de la source de tannins utilisée pour le tannage des peaux d'animaux en cuire (Khanbabaee et Ree, 2001). En outre, ils ont certaines propriétés spéciales telles que l'aptitude à la précipitation des alcaloïdes, de la gélatine et des autres protéines. Selon la nature des assemblages moléculaires, les tanins sont classés en 2 groupes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Reed et al., 1995 ; Sereme et al., 2010).

II.2.6.1-Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables (Figure 10) sont des résidus d'acide gallique qui contiennent un noyau de sucre entouré des groupes phénoliques. Ces résidus peuvent être modifiés par la suite par une autre addition de groupements phénoliques et de chaînes latérales comprenant un à n monomères d'acides galliques. Des liaisons carbonées à carbonées entre noyaux conduisent

à des molécules plus rigides (Nonaka, 1989). Ils sont nommés tannins hydrolysables parce que le traitement avec des acides faibles hydrolyse facilement les résidus d'acide gallique et produit des acides phénoliques avec un hydrate de carbone coré. Cependant, la production de diverses structures tanniques hydrolysables suggère qu'ils sont employés dans une fonction spécialisée. Une utilisation indiquée des tannins hydrolysables dans la défense des plantes contre les toxines et pour éviter la prédation herbivore (Holderness et al., 2008). Les tannins hydrolysables sont divisés en deux groupes, gallotannins et ellagitannins dont le premier groupe est formé à partir de l'acide phénolique et le deuxième groupe est obtenu à partir de l'acide gallique (Khanbabaee et Ree, 2001 ; Cai et al., 2006).

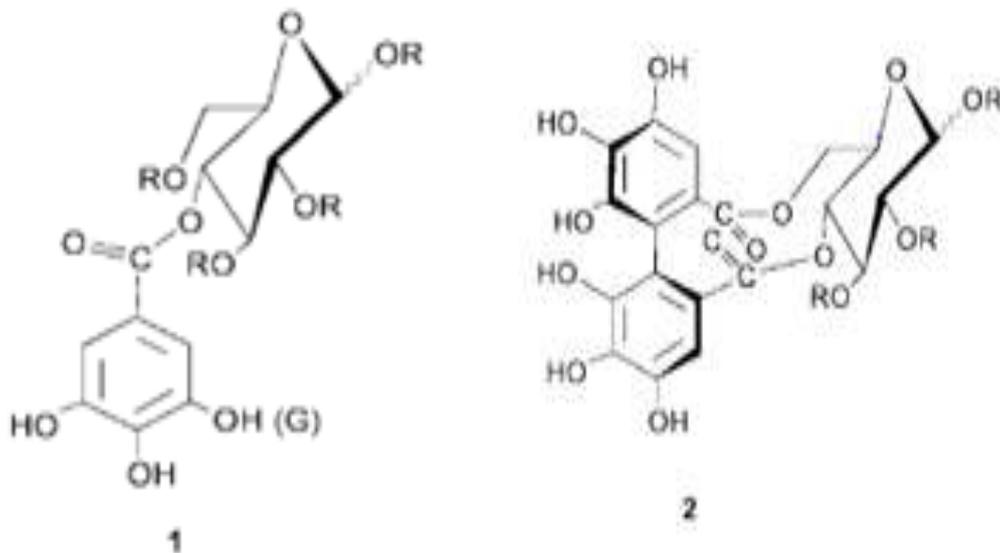


Figure 10: Structure chimique d'un tannin hydrolysables (Gallotannins (1), Ellagitannins (2)) (Khanbabaee et Ree, 2001).

II.2.6.2-Tanins condensés

Les tanins condensés également appelés proanthocyanidines sont des métabolites secondaires synthétisés par l'intermédiaire de la voie biosynthétique des flavonoïdes et sont largement répandus dans l'alimentation (fruits, vin, thé...etc.) et jouent un rôle important dans la défense contre les herbivores (Bogs et al., 2005 ; Holderness et al., 2008). Les tanins condensés résultent de la polymérisation de molécules élémentaires de flavanes (flavanes ol-

3, flavane ol-4, flavane diol –3,4). Ils sont désignés aussi sous le nom de tanins «catéchiques». Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes de végétaux, gymnospermes et fougères compris (**Tanner et al., 2003**).

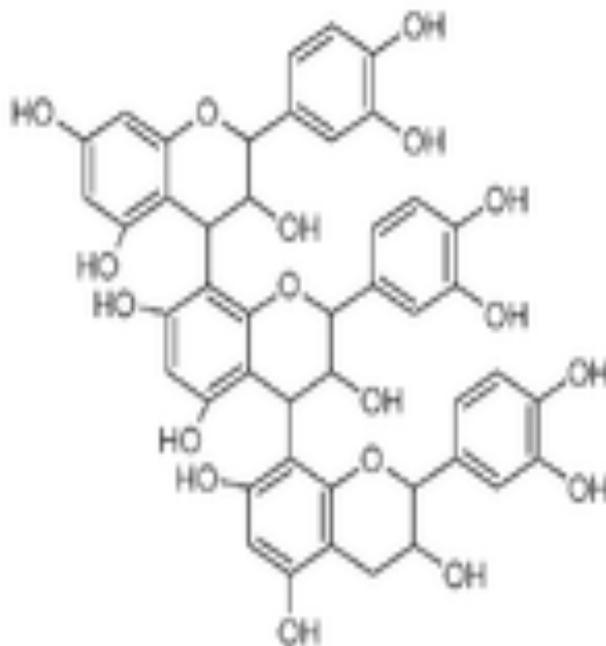


Figure 11: Structure générale des proanthocyanidines (**Khanbabaee et Ree, 2001**).

II.3-Activité antimicrobienne des polyphénols

Les polyphénols sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes (**Cowan, 1999**). Une contamination des végétaux par des microorganismes pathogènes entraîne une forte augmentation des teneurs en composés phénoliques, ce qui correspond à la mise en place de mécanisme de défense de la plante (**Macheix et al., 2005**). 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 adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (**Cowan, 1999**).

II.3.1-Activité antimicrobienne des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont parmi les plus communs des produits naturels qui présentent un large spectre d'activité antibactérienne (**Xiao et al., 2014**). Des études scientifiques menées au cours des dernières années ont généré un intérêt croissant dans leur rôle potentiellement important dans le maintien de la santé humaine. Un nombre considérable de plantes

médicinales contiennent des flavonoïdes, qui ont été rapportés par de nombreux auteurs comme ayant des propriétés antibactériennes (**Malesev et al., 2007**). L'activité de la quercétine, par exemple, a été au moins partiellement attribuée à l'inhibition de l'ADN gyrase d'*E. coli*. La catéchine, flavonoïde isolée du thé vert, est douée de propriétés antimicrobiennes (**Cowan, 1999**). De nombreux groupes de flavonoïdes ont été isolés et identifiés comme possédant une activité antifongique, antivirale et antibactérienne (**Cushnie et Lamb, 2005**).

Ozcelik et ses collaborateurs (2008) ont rapporté que les flavonoïdes ont montré in vitro une activité antimicrobienne contre les souches de *Klebsiella pneumoniae*.

II.3.2-Activité antimicrobienne des tanins

Les tanins ont été isolés à partir des feuilles de *Solanum trilobatum L* et testés contre des bactéries Gram+ et Gram-, les résultats montrent que les Tanins ont présenté une activité antibactérienne contre tous les micro-organismes testés (*S. aureus* et *E. coli*) (**Doss et al., 2009**). D'autres études ont également révélé que l'acide tannique est actif contre les bactéries, les moisissures et les levures (**Colak et al., 2010**).

II.3.3-Activité antimicrobienne des acides phénoliques

L'activité antimicrobienne des acides phénoliques a été rapportée dans plusieurs recherches. Les acides phénoliques comme l'acide P-coumarique, l'acide caféique agissent en tant que des facteurs empêchant la croissance de *Staphylococcus aureus* (**Stojković et al., 2013**). L'activité antimicrobienne est liée à la présence des groupements hydroxyles dans leur structure (**Cowan, 1999**). Une étude in vitro faite par **Khatkar et al. (2014)** a également démontré que les dérivés synthétiques de l'acide P-coumarique possèdent une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*.

Chapitre II

Matériel et méthodes

II.1-Préparation du matériel végétal

Cette étude a été réalisée sur les feuilles de *Rhamnus alaternus L*, récoltées au niveau du village taghzouit de la région de Bejaia durant le mois de mars 2014. Une fois récoltées, les feuilles fraîches de *Rhamnus alaternus L* ont été séchées à l'air libre pendant 20 jours, puis transférées dans l'étuve à 35°C pendant 02 jours pour affiner le séchage et pour obtenir un meilleur broyage et meilleure extraction. Après séchage, les feuilles sont broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Les particules ainsi obtenues sont tamisées sur un tamis de diamètres 250 µm pour avoir une poudre homogène. La poudre obtenue est conservée dans un récipient en verre et stockée à l'abri de lumière et de l'humidité jusqu'à l'extraction (figure 12).



Figure 12: Les feuilles (fraîches, sèches) et poudre de *Rhamnus alaternus L* (origine). a: les feuilles fraîches, b: les feuilles sèches, c: la poudre de *R. alaternus L*.

II.2- Extraction

L'extraction est effectuée par épuisement du matériel végétal. 90g de la poudre des feuilles de *Rhamnus alaternus* sont macérées dans 700ml de méthanol. Le mélange est maintenu sous agitation pendant 24 heures à une température ambiante. Après macération, la solution obtenue a été filtrée plusieurs fois sur papier wattman N°03, et le filtrat est récupéré (filtrat 1). La même opération a été répétée avec 400 ml de méthanol, afin d'avoir une extraction exhaustive, et le filtrat 2 est récupéré. Les deux filtrats ont été mélangés et le méthanol est évaporé dans un évaporateur rotatif jusqu'à ce que le poids de l'extrait reste constant (figure 13) et le taux de l'extraction est calculé selon la formule suivante:

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = P_1/P_0 \times 100$$

P0 : poids de la poudre avant l'extraction. P1 : poids de l'extrait sec après l'extraction.

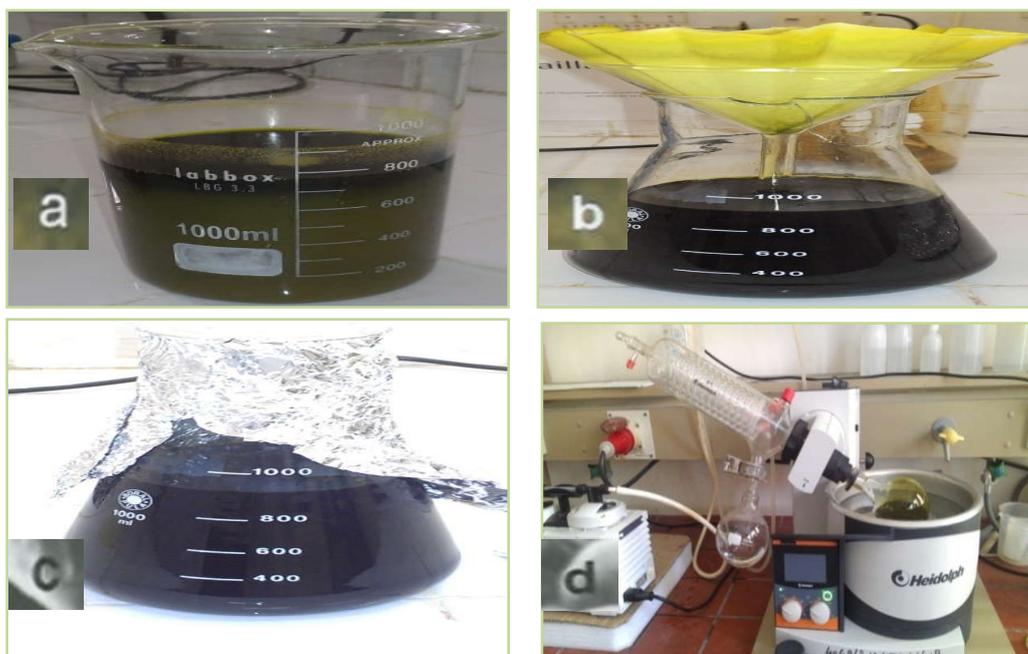


Figure 13: Macération, filtration et récupération de filtrat (filtrat 1+filtrat 2) et évaporation du l'extrait dans un évaporateur rotatif (**origine**). a: macération, b: filtration, c: filtrat, d: évaporation d'extrait.

II.3-Fractionnement de l'extrait méthanolique

Après évaporation du méthanol, l'extrait méthanolique brut a été solubilisé dans 120ml d'eau distillée, puis il a été lavé trois fois avec le même volume d'hexane dans une ampoule à décanter pour éliminer les graisses, les stérols et les pigments (chlorophylle et caroténoïdes). Une extraction liquide-liquide (figure 14) a été réalisée avec trois solvants de polarité différente (croissante), chloroforme, acétate d'éthyle et butanol, et la récupération de phase contenant le solvant est obtenu selon la densité de ce dernier. Quatre fractions ont été obtenues: chloroforme, acétate d'éthyle, butanol et H₂O (figure 15).



Figure 14: Extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter (**origine**).

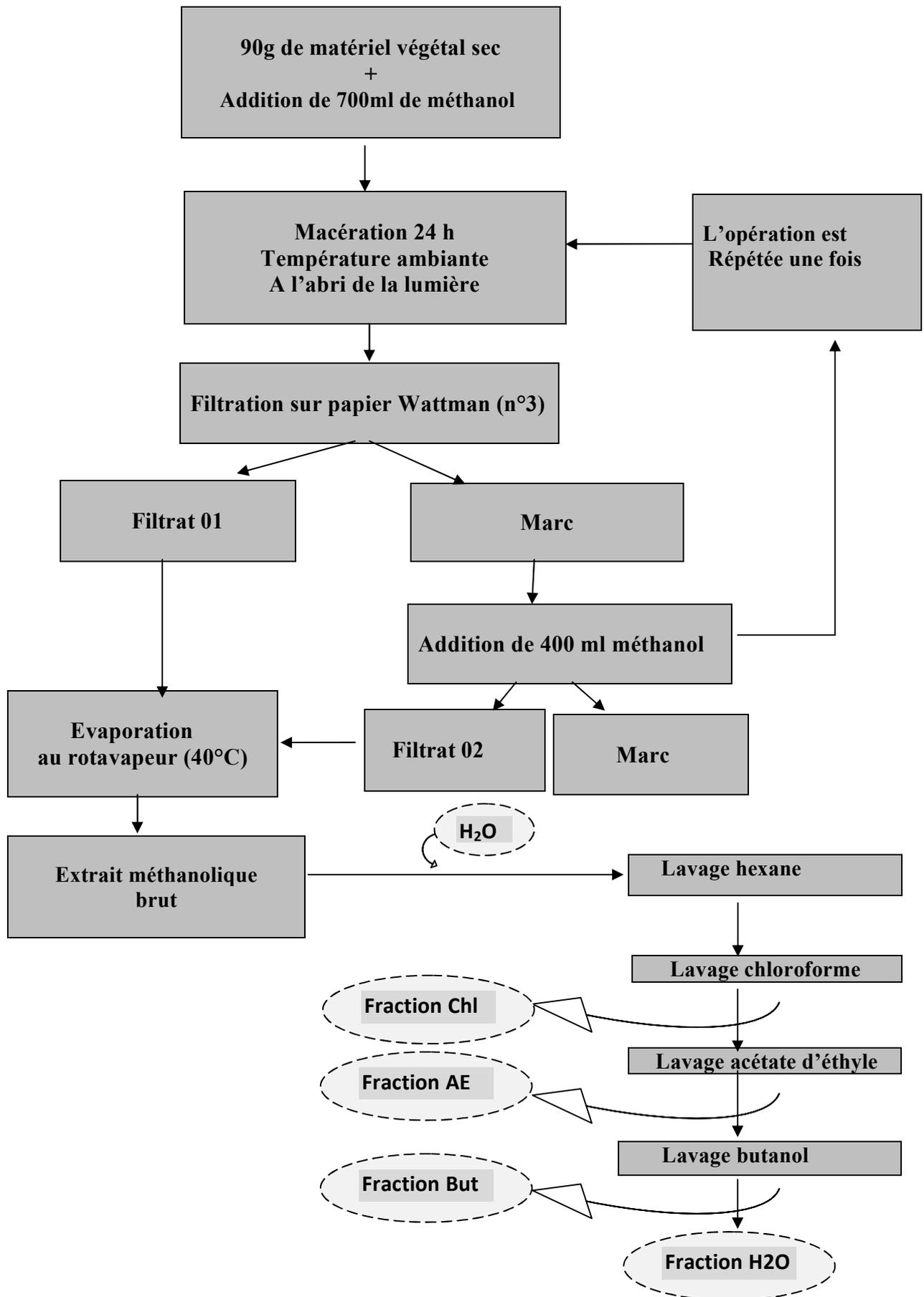


Figure 15: Protocole de préparation des quatre extraits de *rhamnus alaternus L.*

II.4-Analyses phytochimiques**II.4.1-dosages des polyphénols totaux**

Le contenu en polyphénols totaux des extraits a été déterminé en suivant le protocole d'Owen et John (1999), avec quelques modifications.

➤ Principe

Les composés phénoliques réagissent avec le réactif de Follin-ciocalteu. Ce dernier est composé d'un mélange jaune d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PM₁₂O₄₀) qui se réduit lors de l'oxydation des polyphénols, en oxyde bleu de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (MO₈O₂₃). La coloration est proportionnelle aux taux des composés phénoliques (Ribereau-Gayon *et al.*, 1982).

➤ Procédure expérimentale

A température ambiante, 100µL d'extrait ont été ajoutés à 0.5 ml du réactif de follin-ciocalteu (0.1N) et le tout est bien mélangé. Après 5min d'incubation, 0.4 ml d'une solution de monohydrate carbonate de sodium (7.5% p/v) a été ajouté et le tout est bien mélangé. La préparation a été laissée incuber pendant 1 heure à l'obscurité, puis l'absorbance a été mesuré à 730 nm contre un témoin préparé suivant la même méthode, sauf que l'extrait a été remplacé par le solvant. Une courbe standard est réalisée avec différentes concentration de l'acide gallique dans les mêmes conditions que le dosage des échantillons. La quantité des polyphénols totaux a été exprimée en équivalents milligramme d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g) (Annexe I).

II.4.2-Dosages des flavonoïdes

Le contenu en flavonoïdes des extraites a été déterminé en suivant le protocole de Quettier-Deleu *et al.* (2000), avec quelques modifications.

➤ Principe

Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres en présence de chlorure d'aluminium, grâce aux groupements hydroxyles libres (Ribereau-Gayon, 1968). Ainsi la couleur jaune obtenue est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes dans l'extrait.

➤ Procédure expérimentale

A température ambiante, 0.5 ml de la solution d'extrait est ajouté à 0.5 ml d'une solution de chlorure d'aluminium (2%), le tout est bien mélangé. Après incubation pendant 15min à l'obscurité, la mesure de l'absorbance a été effectuée à 410 nm contre un témoin préparé

suivant la même méthode sauf que l'extrait est remplacé par le solvant. Une courbe standard est réalisée avec différentes concentrations de la quercitrine dans les mêmes conditions que le dosage des échantillons. La quantité des flavonoïdes est exprimée en équivalents milligramme de quercitrine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g) (Annexe I).

II.4.3-Dosage des tanins

La teneur en tanins est déterminée selon le protocole de **Hagermen et Butler (1978)**.

➤ principe

Ce principe repose sur l'aptitude des tanins à précipiter les protéines. Le complexe insoluble protéine-tanins obtenu est dissout dans une solution alcaline (SDS/TEA). Le chlorure ferrique réagit avec les tanins en présence de SDS pour former des chélates de couleur violette, déterminés par spectrophotomètre à 510nm et la coloration obtenue est proportionnelle à la quantité des tanins. L'utilisation de la BSA dans le dosage des tanins en milieu acide a pour but de séparer ces derniers des autres polyphénols présents dans l'extrait (**Ribéreau-Gayon, 1968 ; Hagermen et Bulter, 1978**).

➤ Procédure expérimentale

Un volume de 1ml de la solution d'extrait a été additionné à 2ml de BSA (solubilisés dans un tampon d'acétate (0.2M) ajusté à pH 4.9). Après 24h d'incubation à 4°C, une centrifugation à 4000 tour/15min a été réalisé afin de séparer le précipité (complexe tanins-BSA) et le surnageant. Le précipiter est hydrolysé avec 4ml d'une solution SDS/TEA, et un volume de 1ml du $FeCl_3$ a été additionné. Le mélange réactionnel a subi une agitation vigoureuse suivie d'une incubation à température ambiante pendant 15min et l'absorbance a été mesurée à 510nm (figure 16). Une courbe standard est réalisée avec différentes concentrations d'acide gallique dans les mêmes conditions que le dosage des échantillons. La quantité des tannins est exprimée en équivalents milligramme d'acide tannique par gramme d'extrait sec (mg EAT/g).

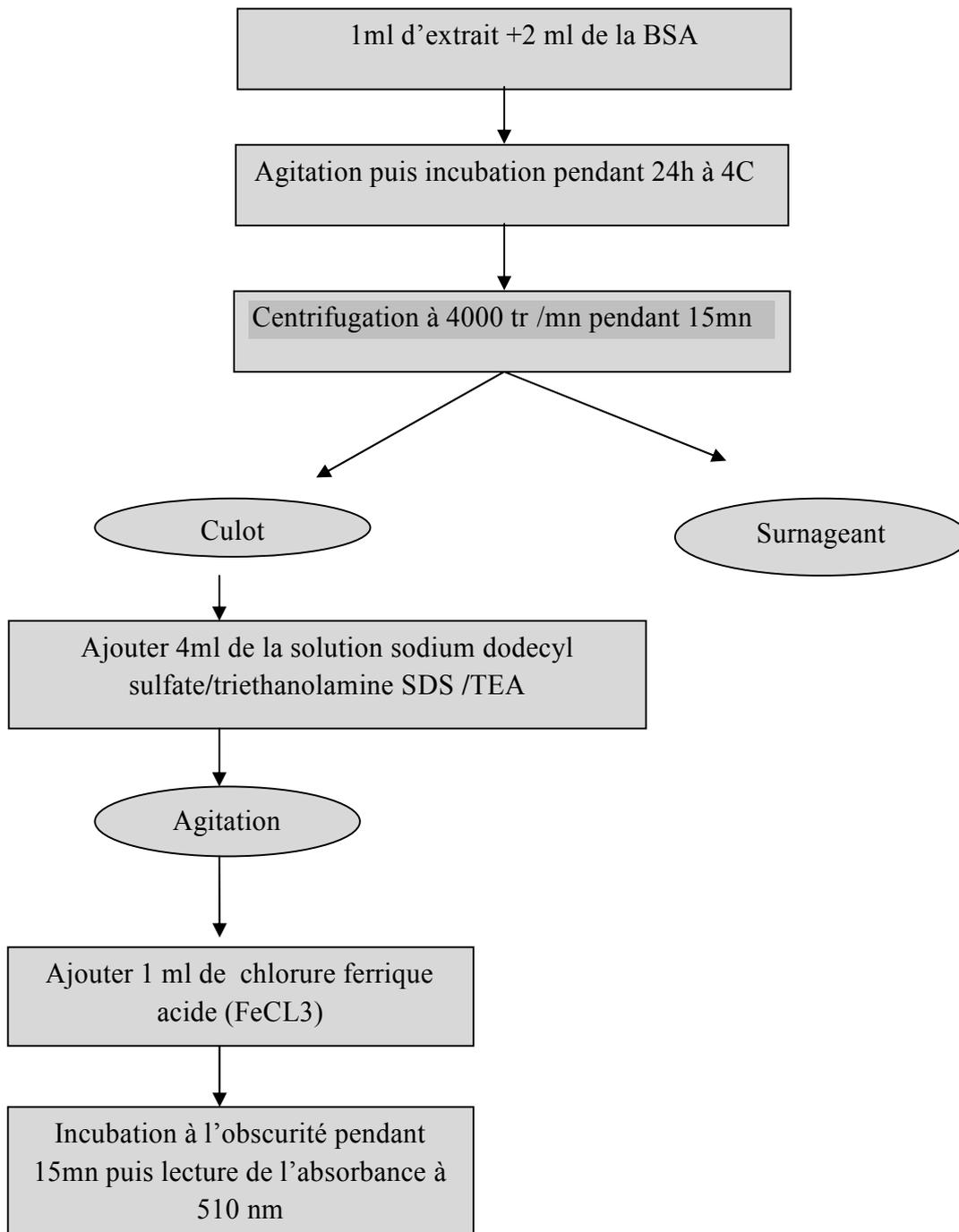


Figure 16 : Les étapes de dosage des tanins (Hagermen et Butler, 1978).

II.5-Etude de l'activité antibactérienne**II.5.1-Définition de l'activité antibactérienne**

Le terme "agent antimicrobien" désigne toute substance utilisée pour détruire les micro-organismes ou empêcher leur croissance, y compris, agents antibactériens. Les agents antimicrobiens sont utilisés depuis des décennies pour traiter les maladies transmissibles et prévenir les infections (CCE, 2001). Le mode d'action de ces agents sur les bactéries, peuvent être : Bactériostatique, lorsque la substance inhibe la multiplication des bactéries ou bactéricides : lorsque la substance détruit totalement les bactéries.

III.5.2- Les souches bactériennes testées

Les différentes fractions de l'extrait méthanoliques de *Rhamnus alaternus* ont été testées sur deux souches bactériennes : les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et les bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*). Ces souches ont été fournies par le laboratoire de Microbiologie Appliquée (L.M.A) de l'Université de Bejaïa. Le tableau V et VI montre les souches bactériennes testées.

Tableau V : Références des souches bactériennes testées

Souche	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Référence	6726TSB	ATCC29522

Tableau VI : Classification de souches bactériennes testées (Sutra et al., 1998 ; Delarras, 2007).

	Souches bactériennes	
Classification	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Règne	Bacteria	Bacteria
Phylum	Firmicutes	Proteobacteria
Classe	Bacilli	Gammaproteobateria
Ordre	Bacillales	Enterobateriales
Famille	Staphylococcaceae	Enterobacteriaceae
Genre	Staphylococcus	Escherichia
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>

II.5.3-Tests d'évaluation de l'effet antibactérien**II.5.3.1- Standardisation des inocula bactériens**

Les activités antibactériennes implique l'emploi de concentrations fixes de l'inoculum bactérien de la souche cible. De ce fait, les inocula bactériens ont été standardisés au (L.M.A).

II.5.3.2-Repiquage et purification des souches

A fin d'évaluer l'activité anti bactérienne des extraits; des repiquages ont été effectués pour chaque souche bactérienne en milieu solide: milieu de **Chapman** pour *Staphylococcus aureus* et **EMB** pour *Escherichia coli*, le milieu de **Mueller Hinton** est utilisé pour l'antibiogramme. L'incubation à lieu à 37°C pendant 24h.

II.5.3.4-Préparation des dilutions des extraits

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne des différentes fractions de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* (Chloroforme, Acétate d'éthyle, Butanol et H₂O), des dilutions 1/1 (solution mère), 1/4 et 1/10 ont été préparées dans le Diméthyle Sulphoxide (DMSO) pour chaque extrait. Elles correspondent respectivement aux concentrations de 50 mg/ml, 25 mg/ml et 10 mg/ml. La nomination et les concentrations des fractions sont représenté dans le tableau VII.

Tableau VII : Nomination et concentration des fractions de l'extrait méthanolique étudiées.

Extrait	[C]1 (mg/ml)	[C]2 (mg/ml)	[C]3 (mg/ml)
H2O (1)	50	25	10
But (2)	50	25	10
A.E (3)	50	25	10
Chlr (4)	50	25	10

II.5.3.5-Antibiogramme**❖ Mode opératoire**

Des suspensions bactériennes ont été préparées à partir des milieux repiqués par la souche standardisée correspondante. Selon la longueur d'onde maximale de chaque souche,

des suspensions bactériennes ont été préparées à une opacité équivalente à une absorbance de 0,5 et qui correspond au nombre d'UFC/ml (tableau VIII).

Tableau VIII : Nombre d'UFC/ml correspond à la longueur maximale de chaque souche avec une absorbance égale à 0,5.

Souches	Longueur d'onde max (nm)	Solution mère à une A=0,5 (UFC/ml)
<i>Escherichia coli</i>	448	$0,42 \cdot 10^8$
<i>Staphylococcus aureus</i>	525	$0,42 \cdot 10^8$

Un ensemencement par des suspensions préalablement préparées est effectué par la méthode d'écouvillonnage à la surface de boîtes de pétri dans lesquelles ont été coulées 5mm d'épaisseur de la gélose Mueller Hinton. L'activité antibactérienne est évaluée par la méthode de **Suay et al. (2000)**. Des puits d'environ 7 mm de diamètre ont été effectués dans la gélose Mueller Hinton. Chaque puit d'une boîte a reçu 50 µl de chaque extrait aux concentrations de 10, 25 et 50 mg/ml. Des boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 24 heures, les zones d'inhibition autour du point d'application des puits sont mesurées en millimètres après 24h d'incubation (**Kosalec et al., 2013**). L'extrait est remplacé par le DMSO comme un témoin négatif.

Remarque

*Ce mémoire a été initialement proposé pour évaluer l'effet anti hyperlipidémique des différentes fractions de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* sur une hyperlipidémie causé par le Triton WR-1339 (Tyloxapol) chez des souris Swiss albinos. Malheureusement, lors de l'injection du Triton WR-1339 par voie intra-péritonéale pour induire l'hyperlipidémie, ca n'a pas causé une hyperlipidémie et une augmentation du taux plasmatiques des triglycérides et du cholestérol total. Cela est probablement dû à la mauvaise préparation du Triton WR-1339.*

II.6-Evaluation de l'effet des fractions de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* L. sur l'hyperlipidémie induite par triton WR-1339 (Tyloxapol)**II.6.1-Matériel animal**

L'étude a été menée sur des souris *Swiss albinos* mal pesant entre 26 et 32 g. Elles sont issues par élevage au niveau de l'animalerie de l'université de Constantine. Les souris ont été placés dans des cages transparentes en polypropylène ou chaque cage regroupe 6 souris, à température ambiante de 20 à 25 °C, avec un cycle de 10/14h (lumière/obscurité), et disposés de granules d'aliment standard provenant de L'ONAB (Office National Alimentation Batail), El-Kseur de Bejaia, et l'eau de robinet. La litière est la sciure renouvelée 3 fois par semaine pour garder le bon conditionnement hygiénique des souris (figure 17).



Figure17 : Elevage des souris Swiss albinos au sein de l'animalerie de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia (origine).

II.6.2-Etude de l'effet anti- l'hyperlipidémique**II.6.2.1-Induction de l'hyperlipidémie**

L'hyperlipidémie a été induite par injection intra-péritonéale du triton WR-1339(Tyloxapol, Sigma-Aldrich, USA) à une dose de 300 mg/Kg du poids corporel dissoute dans une solution saline (0.9% solution NaCl). Après l'injection de Triton WR-1339, les souris développent une hyperlipidémie aiguë.

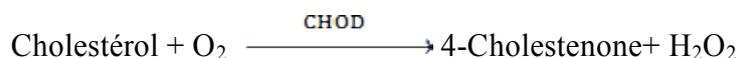
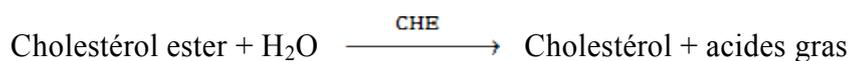
II.6.2.2-Protocole expérimentale

Dans ce model expérimental, 42 souris Swiss Albinos ont été laissé à jeun pendant une nuit, et ont été répartie en 07 groupes (n=6) de poids homogènes. Les souris du groupe I ont servi de témoins (contrôle non traité) et ont reçu une injection intra-péritonéale d'une solution saline (eau physiologique), suivi d'un gavage avec de l'eau physiologique. Le groupe II (contrôle positive) reçoit une injection intra-péritonéale du triton WR-1339 à une dose de 300mg/Kg du poids corporel, suivi d'un gavage avec de l'eau physiologique. Groupe III reçoit une injection intra-péritonéale du triton WR-1339 à une dose de 300mg/kg du poids corporel, suivi d'un gavage avec une solution de DMSO 4%. Les groupes (IV, V, VI et VII) reçoivent une injection de 300mg/kg du poids corporel, suivi d'un gavage avec les 04 fractions de l'extrait méthanolique : chloroforme, acétate d'éthyle, butanol et H₂O respectivement.

Après 24h, le sang est récupéré par la veine jugulaire dans des tubes héparines, sachant que durant ces 24h, les souris n'ont pas eu accès à la nourriture mais seulement à l'eau .une fois le sang est récupéré, il est centrifugé à 3000 tours/minute pour récupérer le sérum qui va servir au dosage des paramètres lipidiques sanguin : cholestérol total et triglycérides.

III.6.3-Dosages des paramètres lipidiques sanguins**III.6.3.1-Dosage du cholestérol total**

Le cholestérol plasmatique est libéré par le cholestérol estérase à partir des esters de cholestérols puis oxydés par le cholestérol oxydase en cholestenone, parallèlement à la libération des molécules H₂O₂. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de cholestérol dans l'échantillon. L'origine de la coloration donnée est du à la formation d'un complexe selon la réaction suivante (SPINREACT, Spain, 2015)



Mode opératoire : Le mode opératoire est illustré dans le tableau ci-dessus. Après mélange et incubation pendant 05min à 37°C, les absorbances sont lues à 505nm et la couleur est stable pendant au moins 60 minutes

	Blanc	Standard	Echantillon
R (mL)	1.0	1.0	1.0
Standard (µL)	---	10	---
Echantillon (µL)	---	---	10

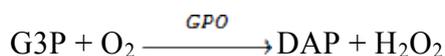
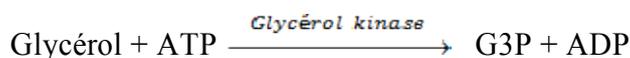
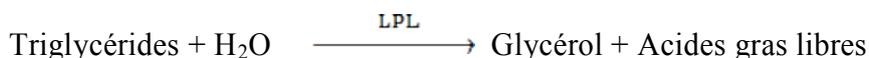
Le taux du cholestérol total est calculé selon la formule suivante

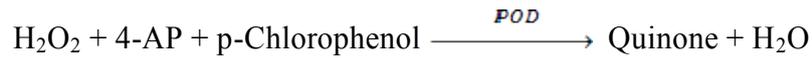
$$\frac{(A)Echantillon}{(A)Standard} \times 200 \text{ (la concentration de standard)} = \text{mg/dL de cholestérol dans}$$

l'échantillon. Le facteur de conversion = mg/dL × 0.0258 = mmol/L

II.6.3.2-Dosage des triglycérides

Les triglycérides de l'échantillon sont incubés avec les lipoprotéine lipases (LPL), qui libèrent le glycérol et les acides gras libres. Le glycérol est converti en glycérol-3-phosphate (G3P) et adénosine-5-phosphate (ADP) par le glycérol kinase en présence d'ATP. Le glycérol-3-phosphate est convertie par la suite par le glycérol phosphate déshydrogénase (GPO) en dihydroxyacétone phosphate (DAP) et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Dans la dernière réaction, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) réagit avec le 4-aminophénazone (4-AP) et le p-chlorophenol en présence de peroxydase (POD), ce qui donne une couleur rougeâtre (SPINREACT, Spain, 2013) (Annexe III)





Mode opératoire : Le mode opératoire est illustré dans le tableau ci-dessous. Après mélange, les tubes sont incubés les tubes à 37°C, pendant 5minutes. Les mesures de la densité optique (DO) sont effectuées au spectrophotomètre à 505 nm (490-550). Le taux des triglycérides est exprimé en mmol/L est donné par la formule suivante.

	Blanc	Standard	Echantillon
R (mL)	1.0	1.0	1.0
Standard (μL)	---	10	---
Echantillon (μL)	---	---	10

$$\frac{(A)\text{Echantillon}}{(A)\text{Standard}} \times 200 \text{ (la concentration de standard)} = \text{mg/dL triglycérides dans l'échantillon}$$

Facteur de conversation : $\text{mg/dL} \times 0.0113 = \text{mmol/L}$.

Chapitre III

Résultats et discussion

III-Résultat et discussion**III.1- Taux d'extraction**

Les feuilles de la plante de *Rhamnus alaternus L* ont été soumises à une extraction liquide –solide en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction. Après évaporation de méthanol, un résidu sec d'extrait brut méthanolique a été obtenu ayant un poids 27.52g ce qui correspond à un rendement de 30.57%. Cet extrait brut solubilisé dans l'eau distillé et soumis à un partage liquide-liquide dans une ampoule à décanter en utilisant des solvants de polarité croissante (Chloroforme, Acétate d'Ethyle et Butanol) a donné 04 fractions différentes qui ont été appelées (Chloroforme, Acétate d'Ethyle, Butanol et H₂O). Le calcul du taux d'extraction pour chaque fraction a donné les résultats présentés dans le tableau IX.

Tableau IX: les pourcentages d'extraction des extraits des feuilles de *Rhamnus alaternus*.

Extrait	Taux d'extraction
Extrait de chloroforme	1.95
Extrait d'acétate d'éthyle	0.45
Extrait butanol	3.94
Extrait de H ₂ O	12.92

D'après les résultats, le rendement de la fraction H₂O a montré un taux d'extraction le plus élevé (12.92 %), comparé à la fraction butanol (3.94%) et à ceux des fractions d'acétate d'éthyle et de chloroforme qui ont montrés un rendement de (0.45%) et (1.95%) respectivement. Cela pourrait supposer la richesse des feuilles de *Rhamnus alaternus* en composés de polarité élevée dont les composés phénoliques, étant donnés leur richesse en groupement hydroxyle.

La différence de rendement des quatre fractions est due à la différence de la nature chimique des composés phénoliques de l'extrait et la nature de solvant utilisé. La différence dans les polarités des solvants d'extraction influence la solubilité des constituants chimiques d'un échantillon ainsi que le rendement d'extraction (Sulaiman et al., 2011), ce qui explique la teneurs obtenues avec les quatre solvants utilisé. Selon Naczk et shahidi (2004), le taux

d'extraction des composés phénoliques est influencé par la taille des particules de l'échantillon et la meilleure extraction est obtenue avec le plus petit diamètre.

III.2- Analyse phytochimique

III.2.1- Teneur en polyphénols totaux

La détermination de la teneur en polyphénols totaux des différentes fractions a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. une coloration bleue est obtenue, cette coloration varie en fonction de la concentration de l'extrait de la plante en composé phénolique.

La courbe d'étalonnage (Annexe I) établie à l'aide de différente concentration de l'acide gallique, nous a permis d'estimer la teneur en composés phénoliques. Les quantités des polyphénols correspondantes de chaque fraction (figure 18) ont été calculé à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en équivalent milligramme d'acide gallique par gramme d'extrait sec et déterminé par l'équation de type : $y = 0.126X - 0.053$ sachant que $R^2 = 0$.

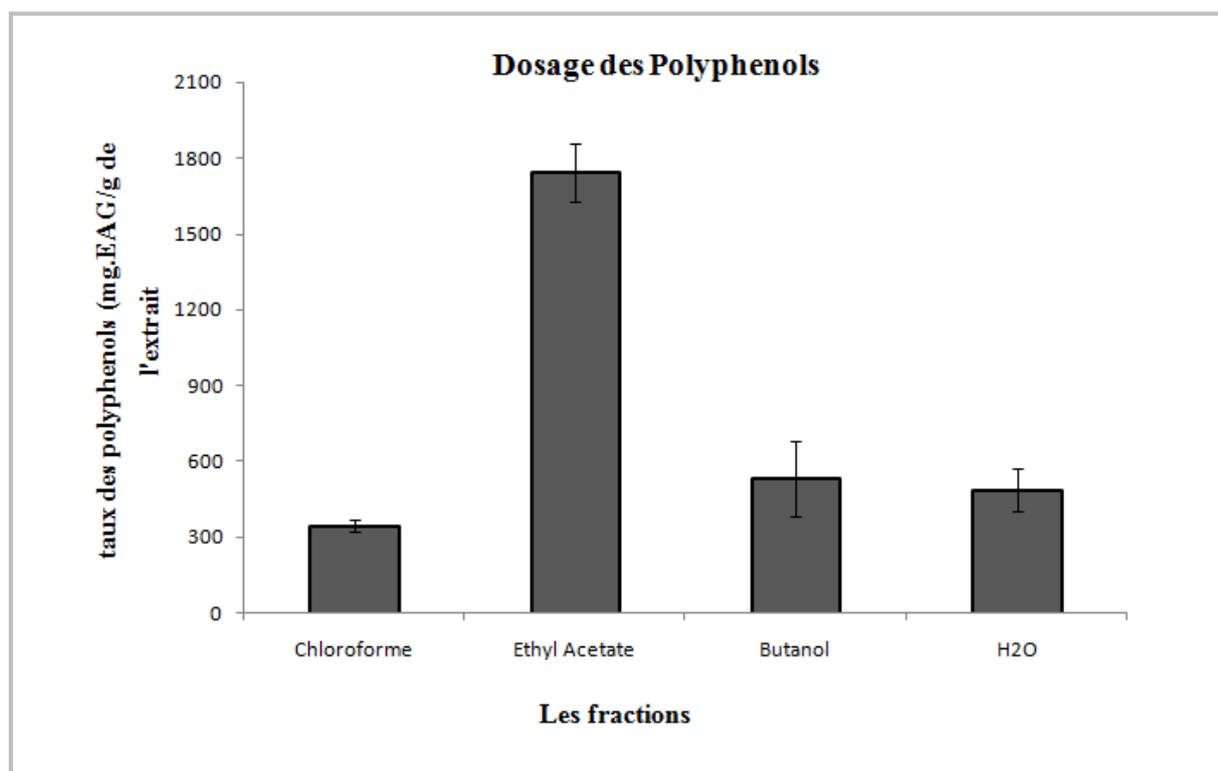


Figure 18 : Teneur en polyphénols totaux des quatre fractions.

D'après les résultats obtenus (figure 18), nous constatons que les polyphénols sont présents dans les quatre fractions avec des teneurs variables d'une fraction à une autre et qu'il paraît clairement que c'est la fraction d'acétate d'éthyle qui a donné la teneur en polyphénols totaux la plus élevée $1740,13 \pm 115,30$ mg EAG/g d'extrait sec, suivi par les fractions de butanol et H₂O avec des teneurs respectives de $531,53 \pm 149,90$ et $486,71 \pm 86$ mg EAG /g d'extrait. La fraction du chloroforme a donné la plus basse teneur en polyphénol totaux qui est de l'ordre de $345,35 \pm 21,53$ mg EAG /g d'extrait. **Ben Ammar et ses collaborateurs (2007)**, ont rapportés une teneur en polyphénols totaux des feuilles de *Rhamnus alaternus* de l'ordre de 250 ± 17 mg EAG/g d'extrait pour l'extrait d'éthyle acétate, ce résultat est inférieur à la teneur obtenus dans notre travail.

Kosalec et ses collaborateurs (2013), ont rapporté un taux de 38.4 mg EAG/g de la matière fraîche de l'écorce de *Rhamnus alaternus* on utilisant le méthanol comme solvant d'extraction, cette différence pourrait s'expliquer par la partie qui a été étudié (feuilles et écorce). En effet, les composés phénolique se répartissent d'une manière différentes dans les organes des plantes (**Macheix et al., 2006**).

Ces résultats peuvent être expliqués par la nature des solvants d'extraction utilisée et leur degré de pureté. L'efficacité d'une extraction est fortement influencée par la méthode d'extraction et le type de solvant utilisé.

le choix bon système de solvant est l'étape la plus décisive pour l'obtention d'une bonne teneur en composés phénoliques à partir d'un échantillon donné (**Sulaiman et al., 2011**).

III.2.2- Teneur en flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl₃) et l'étalon été la quercitrine. Une coloration jaunâtre a été obtenue dont l'intensité est proportionnelles à la concentration de l'extrait de la plante ce qui confirme la présence des flavonoïdes dans l'extrait des feuilles de *Rhamnus alaternus L.*

Les teneurs en flavonoïdes correspondantes de chaque extrait (figure 19) ont été calculé à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe I) établie à l'aide de différentes concentrations de la quercitrine, exprimée en milligrammes d'équivalent de quercitrines par

gramme d'extrait sec et déterminé par l'équation de type : $Y = 0.054x + 0.032$ sachant que $R^2 = 0.983$.

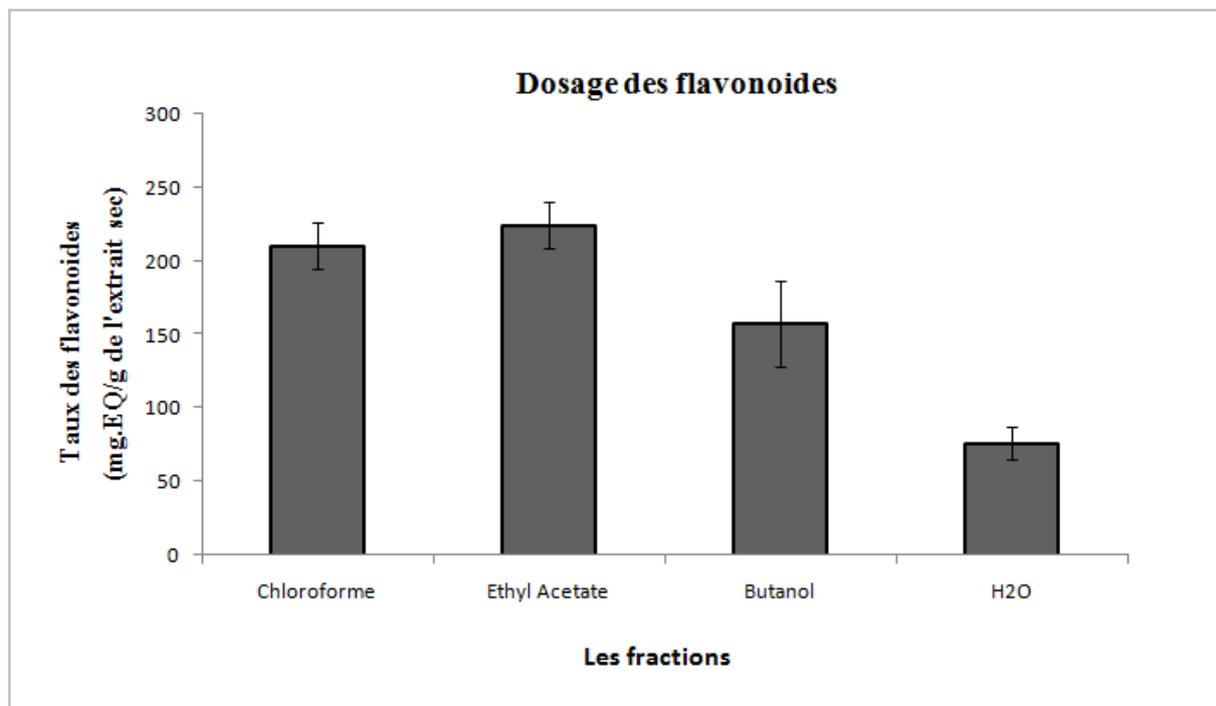


Figure 19 : Teneurs en flavonoïde des quatre fractions.

D'après le résultat obtenu (figure 19), les flavonoïdes sont présents dans les quatre fractions avec des teneurs variable d'une fraction à une autre. La teneur varie entre 224.59 ± 15.61 et 76.33 ± 11.45 mg EQ/g d'extrait sec, dont la plus élevée est celle de la fraction d'éthyle acétate avec 224.59 ± 15.61 , puis celle de chloroforme avec 210.64 ± 16.04 , suivie de celle de butanol avec 157.64 ± 28.90 , et enfin la plus faible teneur obtenue avec la fraction de H₂O et qui est de l'ordre de 76.33 ± 11.45 mg EQ/g d'extrait sec.

Ces résultats montrent que les feuilles de *Rhamnus alaternus* sont très riches en flavonoïdes. On remarque que les flavonoïdes extraits de *Rhamnus alaternus* sont beaucoup plus apolaire que polaire, ce qui explique le rendement élevé de la fraction d'éthyle acétate (224.59 ± 15.61) par rapport aux deux autres fractions, butanol et H₂O, alors que les flavonoïdes polaire sont moins présents, trois fois moins abondants que les flavonoïdes apolaire, du fait de faible pourcentage obtenue avec l'extrait H₂O.

Nos résultats sont inférieurs à ceux obtenus par **Ben Ammar et ses collaborateurs (2007)**, qui ont rapporté que l'extrait d'éthyle acétate des feuilles de *R.alaternus* de Tunisie

contient environ 338 ± 34 mg EQ/g. Cette différence pourrait s'expliquer par la région dans laquelle la plante est cultivée, la méthode de dosage, la sensibilité et la pureté des réactifs utilisés ainsi que la période de la récolte. **Kosalec et ses collaborateurs (2013)**, ont rapporté que l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* a montré un taux en flavonoïde de 33.6 ± 1.50 mg EQ/g de la matière fraîche, ce taux est inférieur à celui obtenue dans notre travail. Cette différence peut être expliquée par la différence partie qui a été étudié (feuilles et écorce) et la méthode de dosage.

Les flavonoïdes sont des secondaire ubiquitaires dans les cellules photosynthétiques ce qui pourrait expliquer leur présence en plus grande quantité dans échantillon (feuilles) que dans échantillon de (écorce) (**Skerget et al., 2011**).

III.2.3- Teneur en tannins

Les teneurs en tanins correspondantes de chaque fraction ont été calculé à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe I), établie à l'aide de différentes concentrations de l'acide tannique, exprimée en milligrammes d'équivalent de l'acide tannique par gramme d'extrait sec et déterminé par l'équation de type : $Y = 0.001x + 0.001$ sachant que $R^2 = 0.998$. Les teneurs en tanins des extraits des feuilles de *Rhamnus alaternus* sont représentés dans la figure 20.

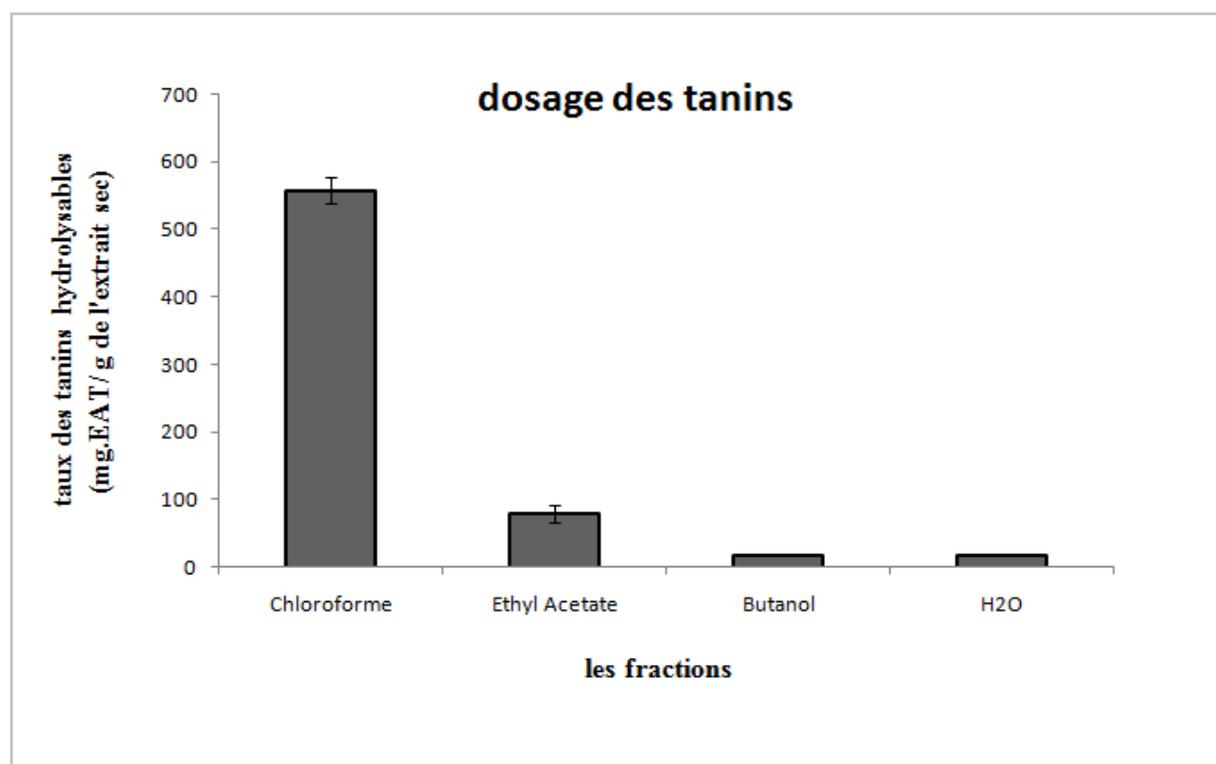


Figure20 : Teneurs en tannins des quatre extraits de *R. alaternus*.

A l'image de la (Figure 20), les résultats montrent que les tanins sont présents dans les quatre extraits avec des teneurs variables d'un extrait à un autre. La teneur la plus élevée est notée pour la fraction de chloroforme 556.97 ± 19.61 mg EAT/g de l'extrait sec, largement supérieur à celle de l'extrait d'éthyle acétate avec $79.9 \pm 12,99$ mg EAT/g de l'extrait sec, suivie de celle de l'extrait de butanol et H₂O respectivement 18 ± 0 , 18 ± 0 mg EAT/g de l'extrait sec.

Ces observations peuvent être expliquées par la polarité des solvants d'extractions. Le chloroforme étant un solvant organique apolaire d'où la concentration, élevée en tanins, contrairement à l'éthyle acétate, butanol et à H₂O d'où les concentrations faibles en tanins. **Ben Ammar et ses collaborateurs (2007)** ont rapportés une teneur en tanins totaux des feuilles de *Rhamnus alaternus* de l'ordre de 838 ± 41 mg EAT/g d'extrait de sec pour l'extrait d'éthyle acétate. ce résultat est supérieur à la teneur obtenue dans le présent travail .

La différence observés entre nos résultats et ceux rapportés par **Ben Ammar et ses collaborateurs (2007)** peuvent être expliqués par l'emplacement géographique de la plante ainsi que la saison de récolte, les modifications apportés dans le protocole et la différence de condition expérimentale (les appareils utilisés).

III-3-Activités antimicrobienne

Une des stratégies pour cette étude consiste à explorer les plantes utilisées en médecine traditionnelle. En effet, l'OMS (2002) estime que, pour se soigner, 80% De la population africaine recourt toujours à la médecine traditionnelle pour laquelle la majeure partie des thérapies implique l'exploitation des principes actifs des plantes médicinales (**Biyiti et al., 2004**).

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antimicrobien des fractions de *R. alaternus* par la méthode des puits sur un milieu gélosés solides, Mueller-Hinton pour les bactéries. L'objectif de ce travail est d'évaluer la capacité des fractions de *Rhamnus alaternus* à produire des composés bioactifs, pouvant présenter un effet thérapeutique antibactérien.

III-3-1- Antibiogramme à l'égard des souches étudiées

L'activité de fractions étudiées de *Rhamnus alaternus* a été évaluée par la présence ou l'absence d'inhibition de la croissance bactérienne. La présence de l'activité antibactérienne est traduite par l'apparition des zones claires autour des puits remplis des extraits de la plante, l'absence de l'inhibition se traduit par l'absence d'halos autour des puits. Le diamètre d'halos varient en fonction de la souche testée, la nature et la dose de la substance active présente dans les extraits (**Orhan et al., 2012**). Les extraits sont testés sur deux souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*). Les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activité : $D < 8$ mm : bactérie non sensible ; $9 < D < 14$ mm : bactérie sensible ; $15 < D < 19$ mm : bactérie très sensible et $D > 20$ mm : bactérie extrêmement sensible (**Bouharb et al., 2014**). Les résultats des tests sont présentés dans le tableau X.

Tableau X : Diamètre des zones d'inhibitions en (mm) obtenu avec *E coli* et *S aureus*.

Extraits		Diamètres des zones d'inhibitions (mm)	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Esherischia coli</i>
Concentration (10mg/ml)	1 (H2O)	-	-
	2 (But)	-	-
	3 (AE)	18	-
	4 (Chl)	-	-
	5 (DMSO)	-	-
Concentration (25mg/ml)	1 (H2O)	-	-
	2 (But)	12	-
	3 (AE)	18	-
	4 (Chl)	-	-
	5(DMSO)	-	-
Concentration (50mg/ml)	1 (H2O)	-	-
	2 (But)	12	-
	3 (AE)	18	-
	4 (Chl)	-	-
	5 (DMSO)	-	-

- : signifie l'absence de la zone d'inhibition claire autour des puits.

III.3.1.1- Antibiogramme à l'égard de *S. aureus* (Gram positif)

Deux extraits de la plante de *Rhamnus alaternus* ont inhibé la croissance de *S. aureus* avec des zones d'inhibitions allant de 10 à 18 mm. La zone d'inhibition la plus large (18mm) est obtenue pour l'extrait d'Acétate d'éthyle et c'est le seul qui a démontré une activité inhibitrice importante contre *S. aureus* à des concentrations de 10, 25 et 50 mg/ml. Cependant l'extrait de Butanol a montré une zone d'inhibition de 12 mm de diamètre à la concentration de 50 mg/ml et une zone d'inhibition de 10mm à la concentration de 25 mg/ml. Par contre la souche *S. aureus* s'est montrée résistante, vis-à-vis des fractions de chloroforme H₂O, sachant que le DMSO (témoin) n'a montré aucune activité (Figure21).

III.3.1.2- Antibiogramme à l'égard d'*E. Coli* (Gram négatif)

Les résultats de la présente étude, montre que la souche bactérienne testée *E. coli* ne présente pas de sensibilité vis-à-vis des fractions de l'extrait méthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus* malgré leurs teneurs considérables en polyphénols d'où aucune zone d'inhibition claire n'est observée. Sachant que le DMSO (témoin) n'a montre aucune activité. (Figure22).

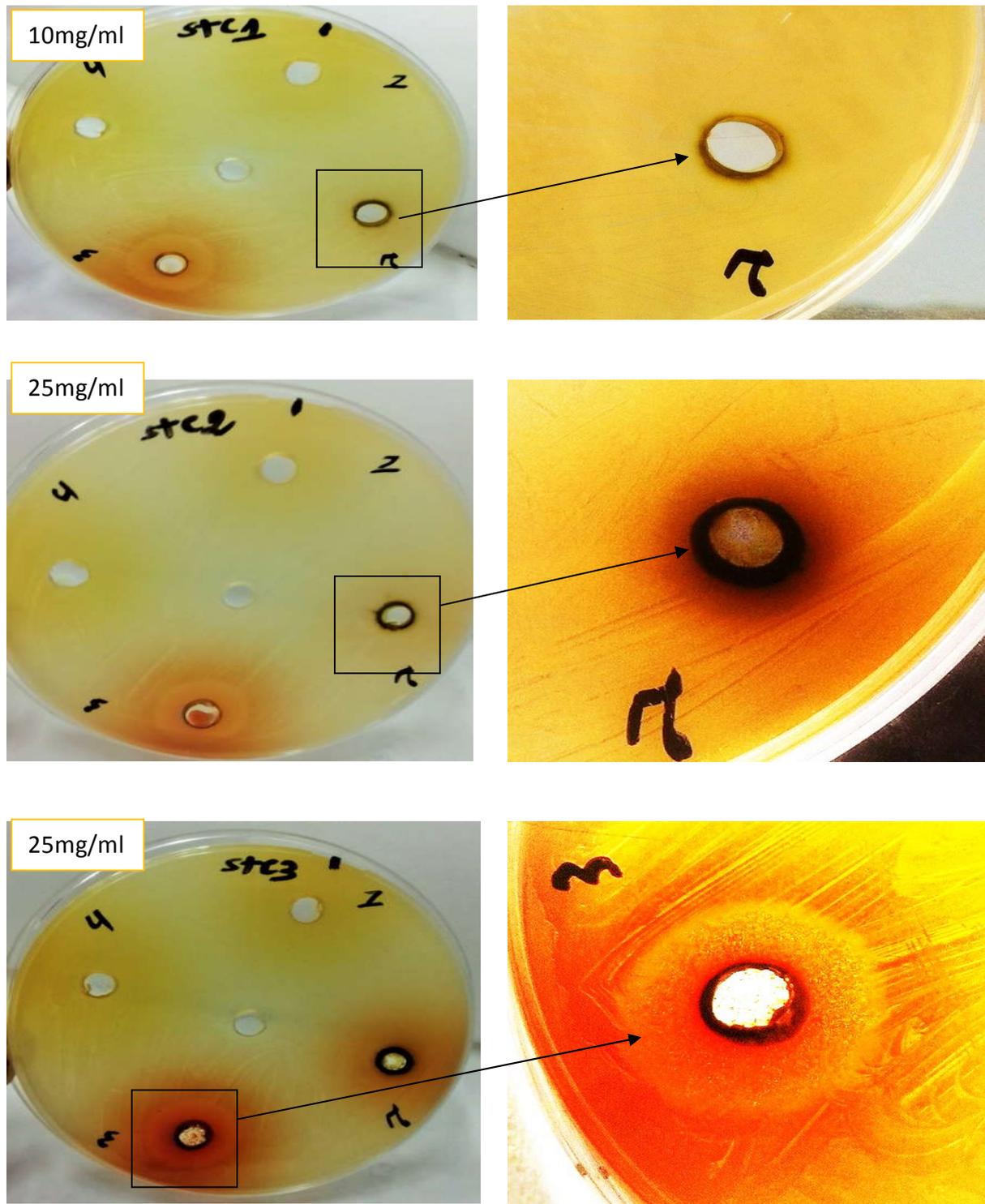


Figure 21: Effet antibactériens des quatre fractions vis-à-vis *Staphylococcus aureus* à différentes concentration.

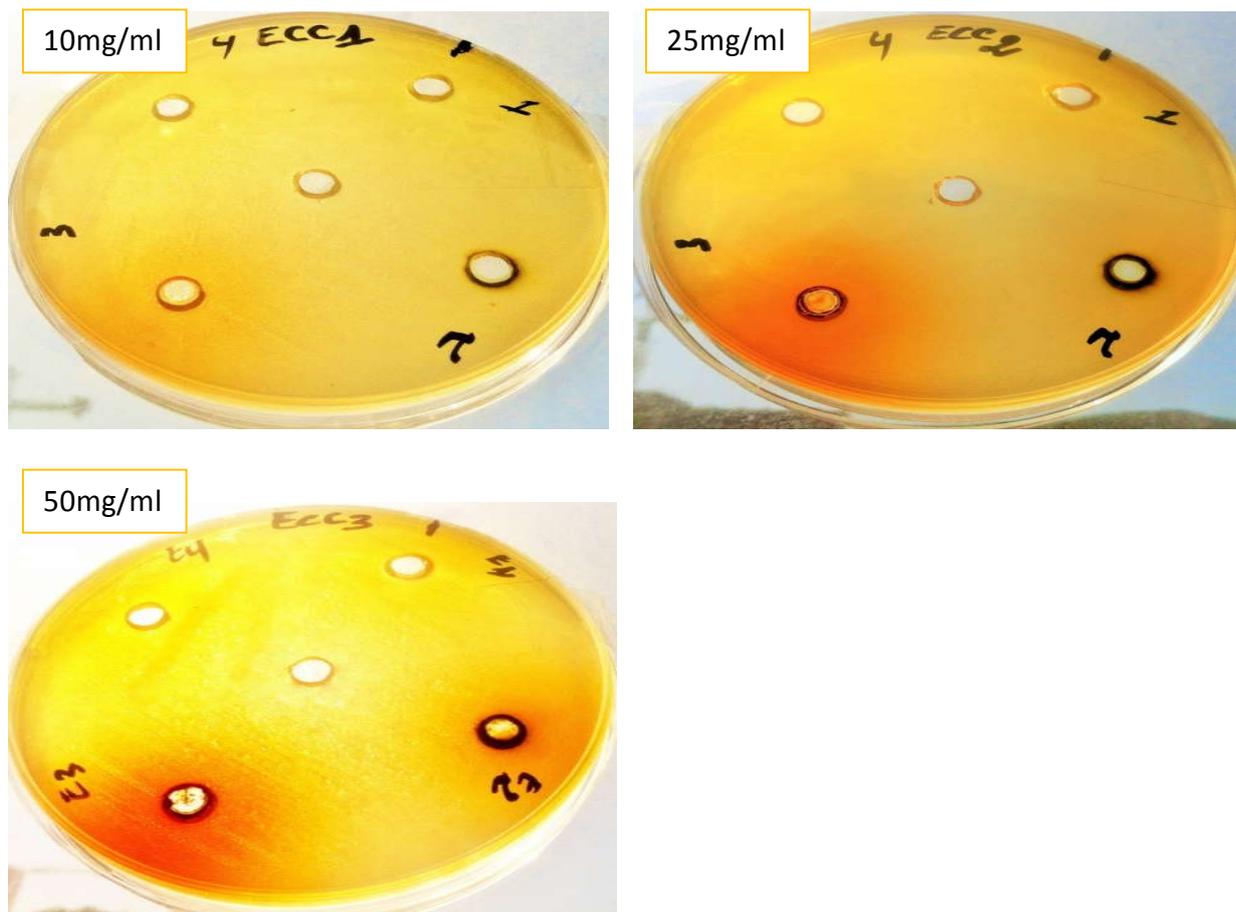


Figure 22 : Effet antibactériens de quatre fractions vis -à-vis *Escherichia coli* à différentes concentration.

Les résultats consignés dans le tableau X ont montré que les extraits de *R. alaternus* ont une bonne activité inhibitrice aux différentes concentrations testées sur la souche bactérienne à Gram positif étudiée (*Staphylococcus aureus*), contrairement à la souche bactérienne à Gram négatif (*Escherichia coli*). Plusieurs études ont montré que l'activité antibactérienne des extraits de plante est attribuée à leurs composés phénoliques (Cowan, 1999).

les travaux de **Kosaic et ses collaborateurs (2013)** sur l'activité antimicrobienne des extraits méthanolique d'écorce de *R. alaternus*, *R. fallax*, *R. intermedia* et *R. pumila* ont montré une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de 12mm et également une activité antimicrobienne contre *Escherichia coli* avec une zone d'inhibition de 10mm avec une CMI égales ou inférieures à 2.5 mg/mL.

Nos résultats ressemblent à ceux rapportés par **Toty et al. (2013)** sur l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de *Harungana madagascariensis* sur quelques souches bactériennes Gram positif (*S. aureus*) et Gram négatif (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* et *S. Typhi*), puisque, l'extrait aqueux n'a donné aucune zone d'inhibition vis-à-vis des souches testées Gram négatif, par contre, il a montré une activité antibactérienne très importante de 17 mm vis-à-vis de la souche Gram positif (*S. aureus*).

Selon **Orhan et ses collaborateurs (2012)**, les extraits méthanoliques de *Paliurus spina* (famille des *Rhamnaceae*) présente une très forte activité antibactérienne vis-à-vis de *S. aureus* avec une CMI de 16 mg/ml. Les travaux de **Biyiti et al. (2004)** ont prouvé que l'extrait de *Maesopsis Eminii* (*Rhamnaceae*) a présenté une bonne action inhibitrice sur *S. Aureus* (15 mm) (bactérie Gram positif) qui par contre il n'a présenté aucun effet inhibiteur vis-à-vis d'*E. coli* (bactérie Gram négatif).

Les études d'**Oumaskour et al. (2012)** ont montré que les bactéries à Gram positif présentent une sensibilité supérieure à celle des bactéries à Gram négatif. **Masibo et son collaborateur (2009)** expliquent ce phénomène, en considérant que la résistance d'*E. coli* Gram négatif aux agents antimicrobiens est liée à la présence d'une enveloppe qui comprennent une membrane cellulaire riche en lipopolysaccharides et une paroi ce qui limite l'accès des agents antimicrobiens à leurs cibles dans les cellules bactériennes, car les agents antimicrobiens sont en contact avec l'enveloppe cellulaire. Contrairement aux bactéries Gram positif qui sont moins protégées contre les agents externes (détergents et antibiotiques).

Dans l'ensemble, les souches bactériennes testées à Gram positif étaient plus sensibles que les gram négatif. En effet les résultats obtenus par tous ces auteurs concordent avec ce qui a été observés dans la présente étude. En règle générale, les extraits de plantes sont habituellement plus actif contre les bactéries Gram positif que les bactéries Gram négatif (**Okoro et al., 2010**).

Dans la présente étude, toutes les fractions de l'extraits méthanoliques de *R. alaternus* se sont révélés inactifs sur la souche *E. coli* quelque soit la dose, le même cas s'est révélé dans les travaux de **Meddour et ses collaborateurs (2013)** où ils ont montrés que l'extrait méthanolique de *Capparis spinosa* (*Capparidaceae*) est inactif sur *E. coli* et *P. aeruginosa*, par contre l'extrait est actif sur *S. aureus*.

L'effet inhibiteur des composés phénolique sur la croissance des bactéries peut être expliqué par plusieurs raisons. Parmi les l'hypothèse avancés, on peut citer la chélation des métaux tel que le fer qui est nécessaire a la croissance microbienne, l'action sur les membranes des micro-organismes conduisant a la perte de son intégrité structurale (**Akiyama et al., 2001**), l'effet endommageant de la bicouche lipidique (**Funatogawa et al., 2004**), et enfin, l'action sur les métabolisme bactériens (**Scalbert, 1991**).

Xiao et ses collaborateurs (2014) a montré que Les flavonoïdes sont parmi les plus communs des produits naturels qui présentent un large spectre d'activité antibactérienne. Un nombre considérable de plantes médicinales contiennent des flavonoïdes, qui ont été rapportés par de nombreux auteurs comme ayant des propriétés antibactériennes (**Malesev et al., 2007**). Les travaux de **Cowan, (1999)** à montré que l'activité de la quercétine, par exemple, a été au moins partiellement attribuée à l'inhibition de l'ADN gyrase *d'E coli*. La catéchine, flavonoïde isolée du thé vert, est douée de propriétés antimicrobiennes. De nombreux groupes de flavonoïdes ont été isolé et identifié comme possédant une activité antifongique, antivirale et antibactérienne (**Cushnie et Lamb, 2005**).

III.4 -Dosage du cholestérol total et des triglycérides plasmatiques

Les résultats du dosage des triglycérides et de cholestérol total à la fin de l'expérimentation (24 heure) sont illustrés dans les figures (23 et 24) respectivement.

Dans cette étude, les résultats montrent que le triton WR-1339 n'a provoqué aucune augmentation significative des taux de cholestérol et des triglycérides plasmatiques. Ce résultat négatif est probablement dû aux conditions dans lesquelles le produit a été préparé.

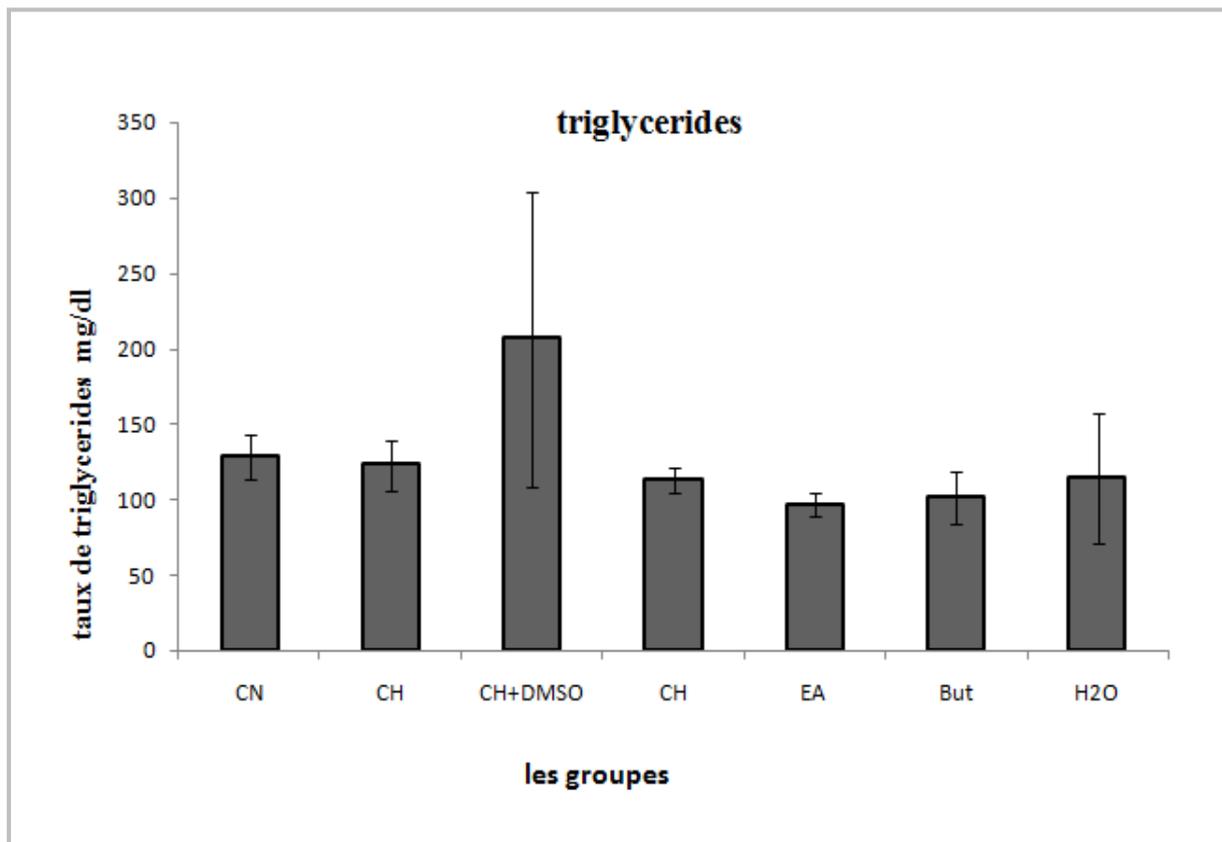


Figure 23 : taux des triglycerides.les résultats sont exprimés en moyenne ±SEM.

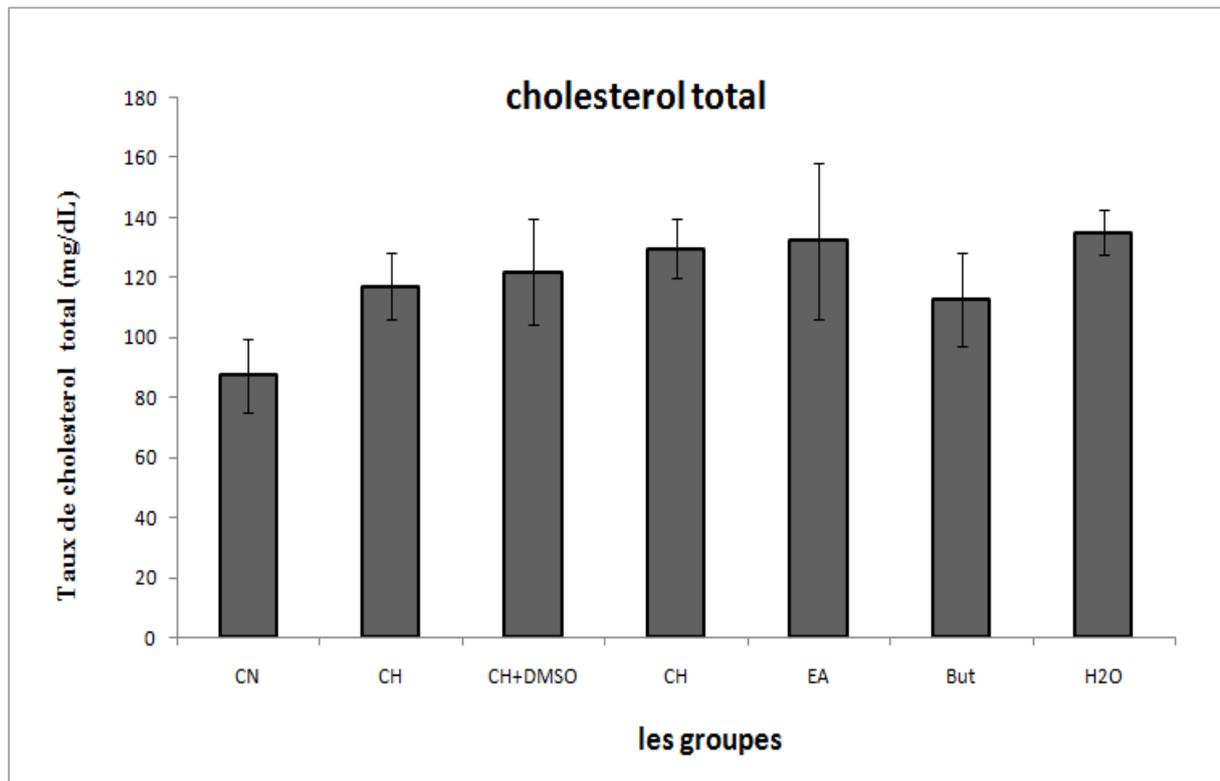


Figure 24 : taux de cholestérols total. les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM.

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Dans ce présent travail, une étude des propriétés antimicrobienne de *Rhamnus alaternus* a été réalisée; c'est une plante appartenant à la famille des Rhamnacees, employée en Algérie grâce à ses propriétés thérapeutiques.

Nous nous sommes intéressés aux feuilles de *Rhamnus alaternus*, et à l'évaluation de la teneur en composés phénoliques, à savoir les polyphénols totaux, les flavonoïdes et les tanins, et l'étude de l'activité antimicrobienne de ses substances bioactives sur deux souches bactériennes, une souche à Gram positive ; *S. aureus* et une autre à Gram négatif ; *E.coli*.

L'extraction des composés phénoliques des feuilles de *Rhamnus alaternus* a été réalisée avec le méthanol, puis l'extrait méthanolique est fractionné avec différents solvants. Pour ce qui est du rendement d'extraction, le meilleur taux a été obtenu avec la fraction H₂O (12.92%), par contre le plus faible était avec la fraction d'acétate d'éthyle (0.45%).

La teneur en composés phénoliques totaux, quant à elle varie de 1740,13 ± 115,30 mgEAG/g à 345.35 ± 21.53 mg EAG/g d'extrait sec, avec une meilleure teneur qui est obtenue avec la fraction éthyle acétate (1740,13 ± 115,30 mgEAG/g d'extrait sec). Le dosage des flavonoïdes a montré que les 04 fractions sont riches avec des teneurs qui varient de 224.59 ± 15.61 mg EQ/g d'extrait sec à 76.33 ± 11.45 mg EQ/g d'extrait sec, avec un taux le plus élevé qui est aussi obtenu avec la fraction éthyle acétate (224.59 ± 15.61 mg EQ/g d'extrait sec). Pour ce qui est de la teneur en tanins, elle varie de 556.97 ± 19.61 mg EQ/g à 18 ± 0 mg EAT/g de l'extrait, la teneur la plus élevée est retrouvée dans la fraction chloroforme (556.97 ± 19.61 mg EQ/g d'extrait sec). Il ressort de ces analyses que les feuilles de *R. alaternus* sont très riches en divers composés phénoliques.

L'étude de l'activité antibactérienne des extraits de *Rhamnus alaternus* a révélé que ceux-ci n'ont pas montré un grand effet sur les souches testées. Néanmoins la souche à Gram positive (*Staphylococcus aureus*), s'est révélée très sensible vis-à-vis des extraits d'acétate d'éthyle et de butanol avec des zones d'inhibitions de 18 et 12 mm respectivement. Par contre, la souche à Gram négative (*Escherichia coli*), elle s'est révélée non sensible et aucune zone d'inhibition n'a été obtenue.

La présente étude montre que les feuilles de *Rhamnus alaternus* sont riches en métabolite secondaire et que ces derniers peuvent avoir un bon effet antibactérien. Il serait intéressant de compléter cette étude en utilisant d'autres méthodes d'analyse plus précises qui permettent non seulement de quantifier mais de qualifier les composés phénoliques présents dans les différents extraits. De tester ensuite leur efficacité sur différentes souches bactériennes et élucider leur mécanisme d'action.

Références

Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, O. and Iwatsuki, K. (2001).** Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 (4): 487-491.
- **Alves, M.J. Ferreira, I.C.F.R. Froufe, H.J.C. Abreu, R.M.V. Martins, A. and Pintado, M. (2013).** Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *Journal of Applied Microbiology*, pp: 01-12.
- **Ashok, K.T. (2001):** Imbalance in antioxidant defence and human diseases: multipl approach of natural antioxidants therapy. *Current Science*, 8: 9–10.
- **Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods*, 99: 191–203.
- **Bas, J.M., Gomez, C. and Pons, P. (2005).** Fruit production and predispersal seed fall and predation in *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae). *Acta Oecol.* 27: 115-123.
- **Bas, J.M., Gómez, C. and Pons, P. (2002).** Caracterización morfológica y estructural de los frutos del aladierno (*Rhamnus alaternus* L.) en el Noreste de la Península Ibérica. *Studia Botanica*, 21: 89-103.
- **Bas, J.M., Oliveras, J. and Gomez, C. (2009).** Myrmecochory and short-term seed fate in *Rhamnus alaternus*: Ant species and seed characteristics. *Acta Oecologica*, 35: 380-384.
- **Bas, J.M., Oliveras, J. and Gomez, C. (2007).** Final seed fate and seedling emergence in myrmecochorous plants: effects of ants and plant species. *Sociobiology*, 50: 101–111.
- **Batra, P. and Sharma, A. K. (2013).** Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. 3(6): 439-459.
- **Ben Ammar, R., Bhourri, W., Ben Sghaier, M., Boubaker, J., Skandrani, I., Neffati, A., Bouhlel, I., Kilani, S., Mariotte, A.M., Chekir-Ghedira, L., Dijoux-Franca, M.G. and Ghedira, K. (2009).** Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. *Food Chemistry*, 116: 258–264.
- **Ben Ammar, R., Ben Sghaier, M., Boubaker, J., Bhourri, W., Naffeti, A., Skandrani, I., Bouhlel, I., Kilani, S., Ghedira, K. and Chekir-Ghedira, L. (2008).** Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B1, nifuroxazide and sodium azide-

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus* L. *Chemico-Biological Interactions*, 174: 01-10.

- **Ben Ammar, R., Kilani, S., Abdelwahed, A., Hayder, N., Mahmoud, A., Chibani, J., Chekir-Ghedira, L. and Ghedira K. (2005).** In vitro mutagenicity, antimutagenicity and free radical scavenging activities of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) extracts. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8: 439-445.
- **Ben Ammar, R., Kilani, S., Bouhlel, I., Skandarani, I., Naffeti, A., Boubaker, J., Ben Sghaier, M., Bhourri, W., Mahmoud, A., Chekir-Ghedira, L. and Ghedira, K. (2007).** Antibacterial and cytotoxic activities of extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae). *Annals of Microbiology*, 57(3): 453-460.
- **Ben Ghezala, H., Chaouali, N., Gana I., Snouda, S., Nouioui, A., Belwaer, I., Ouali J., Kaddour, M., Masri, W., Ben Salah D., Amira D., Ghorbal, H. and Hedhili A. (2015).** Toxic Effects of *Rhamnus alaternus*: Case Report *Emergency Mediteranean*. Sous press.
- **Bhourri, W., Ben Sghaier, M., Kilani, S., Bouhlel, I., Dijoux-Franca, M.G., Ghedira, K. and Ghedira L.C. (2011).** Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): Kaempferol 3-O-b-isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O-b-isorhamninoside. *Food Chemistry Toxicology*, 49: 1167-1173.
- **Bhourri, W., Boubaker, J., Kilani, S., Ghedira, K. and Ghedira, C. L. (2012).** Flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): Kaempferol 3-O- β -isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O- β -isorhamninoside protect against DNA damage in human lymphoblastoid cell and enhance antioxidant activity. *South African Journal of Botany*, 80: 57-62.
- **Biyiti, L.F., Meko'o, D.J.L., Tamzc, V. et Amvam Zollo, P.H. (2004).** Recherche de l'Activité Antibactérienne de Quatre Plantes Médicinales Camerounaises. *Pharmie. Médecine Traditionelle. Afrique*, 13: 11-20.
- **Bogs, J., Downey, M.O., Harvey, J.S., Ashton, A.R., Tanner, G.J. and Robinson, S. P. (2005).** Proanthocyanidin Synthesis and Expression of Genes Encoding Leucoanthocyanidin Reductase and Anthocyanidin Reductase in Developing Grape Berries and Grapevine Leaves. *American Society of Plant Biologists*, 139: 652-663.
- **Bouharb, H., El Badaoui, K., Zair, T., El amri, J., Chakir, S. and Alaoui, T. (2014).** Sélection de quelques plantes médicinales du Zerhoun (Maroc centrale) pour

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

l'activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Biosciences* 78:6685-6693.

- **Cai, K. and Bennick, A. (2006).** Effet of Salivary Proteins on the transport of tannin and quercetin across intestinal epithelial cells in culture. *Biochemical Pharmacology*, 72: 974-980.
- **CCE. (2001).** Commission des Communautés Européennes: propositions de la commission en matière de lutte contre la résistance antimicrobienne. Bruxelles, vol 885.
- **Colak, S.M., Yapici, B.M. and Yapici, A.N. (2010).** Determination of antimicrobial activity of tannic acid in pickling process. *Romanian Biotechnological Letters*, 15: 5325- 5330.
- **Cowan, M.M. (1999).** Plants products as antimicrobial agent. *Clinical. Microbiology, Review*. 12: 75-82.
- **Cuoco, G., Mathe, C. and Vieillescazes, C. (2014).** Liquid chromatographic analysis of flavonol compounds in green fruits of three *Rhamnus* species used in Stil de grain. *Microchemical Journal*, 115: 130–137.
- **Currie, A., Langford, G., McGhie, T., Apiolaza, L.A., Snelling, C., Braithwaite, B. and Vather, R. (2006).** Inheritance of Antioxidants in a New Zealand Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.). *Christchurch, New Zealand*, pp. 218-225.
- **Cushnie, T.P. et Lamb, A.J. (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal Antimicrobial Agents*, 26(5):343-356.
- **Delarras, C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Ed. Tec & Doc, Paris, p. 356-357.
- **Delmas, D., Rebé, C., Lacour, S., Filomenko, R., Athias, A., Gambert, P., Malki, C.M., Jannin, B., Daloz, D.L., Latruffe, N. and Solary, E. (2003).** Resveratrol-induced apoptosis complex in colon cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (42): 41482-41490.
- **Doss, A., Mubarack H.M. and Dhanabalan R. (2009).** Antibacterial activity of tannins from the leaves of *Solanum trilobatum* Linn. *Indian Journal of Science and Technology*, 2(2): 41-43.
- **Erdman Jr, J. W., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J. T., Folts, J., Harnly, J, Hollman, P., Keen, C. L., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson, G. and Burrowes, J. (2007).** Flavonoids and Heart Health:

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop. *The Journal of Nutrition* jn.nutrition.org, 137: 718-737.

- **Fiori, G.M.L., Fachin, A.L., Correa, V.S.C., Bertoni, B.W., Giuliatti, S., Amui, S.F., França, S.C. and Pereira, A.M.S. (2013).** Antimicrobial Activity and Rates of Tannins in *Stryphnodendron adstringens* Mart. Accessions Collected in the Brazilian Cerrado. *American Journal of Plant Sciences*, 4: 2193-2198.
- **Funatogawa, K., Hayashi, S., Shimomura, H., Yoshida, T., Hatano, T., Ito H. and Hirai, Y. (2004).** Antibacterial activity of hydrolysable tannins derived from medicinal plant against *Helicobacter pylori*. *Microbiology and Immunology*, 48(4): 251-261.
- **Ghosh, D. and Konishi, T. (2007).** Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16(2): 200-208.
- **Gubb, AS. (1913).** La flore algérienne, naturelle et acquise. Ed. A. Jourdan, Alger, p. 16-17.
- **Gulias, J., Traveset, A., Riera, N. and Mus, M. (2004).** Critical stages in the recruitment process of *Rhamnus alaternus* L. *Annals of Botany*, 93: 723-731.
- **Hagerman, A. et Butler, L.G. (1978).** Protein precipitation method of the quantitative determination of tannins. *Journal agricultural and food chemistry*, 26: 809-812.
- **Harnly, J. M., Doherty, R. F., Beecher, G. R., Holden, J.M., Haytowitz, D. B., Bhagwat, S. and Gebhardt, S. (2006).** Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *The Journal of Agricultural and food Chemistry*, 54(26): 9966-9977.
- **Harnly, J.M., Lin, L. and Bhagwat, S. (2007).** Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(1): 47-61.
- **Havsteen, B. H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96: 67-202.
- **Holderness, J., Hedges, J.F., Daughenbaugh, K., Kimmel, E., Graff, J., Freedman, B. and Jutila, M.A. (2008).** Response of $\gamma\delta$ T cells to plant-derived tannins. *Critical Review of Immunology*, 28(5): 377-402.
- **Kelly, E.H., Anthony, R.T., Dennis, J.B. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry,

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584.

- **Khanbabae, K. and Ree, T.R. (2001).** Tannins: Classification and Definition. *Journal of Royal Society of Chemistry*, 18: 641-649.
- **Khatkar, A., Nanda, A., Kumar, P and Narasimhan, B. (2014).** Synthesis, antimicrobial evaluation and QSAR studies of *p*-coumaric acid derivatives. *Arabian Journal of Chemistry*. Sous press.
- **Kosalec I., Kremer D., Locatelli M., Epifano F., Genovese S., Carlucci G., Randic M. and Zovko Konc M. (2013).** Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial activity of bark extracts of *Rhamnus alaternus*, *R. fallax*, *R. intermedia* and *R. pumila*. *Food Chemistry*, 136: 335-341.
- **Lev-Yadun, S., Neeman, G. and Izhaki, I.(2009).** Unripe red fruits may be aposematic. *Plant Signal Behav*, 4(9): 836–841.
- **Longo, L., Vasapollo, G and Rescio, L. (2005):** Identification of anthocyanins in *Rhamnus alaternus* L. berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1723-1727.
- **Macheix, J.J., A. Fleuriet, A., Jay-Allemand, C. (2005).** Nature et diversité des composés phénoliques des végétaux. In : Les composés phénoliques des végétaux. Ed : *Technique et documentation*. Lavoisier. 10-15.
- **Macheix, J.J., Fleuriet, A and Jay-Allemand, C. (2006).** Les composés phénoliques des végétaux. *Sciences des aliments*, 26: 189-190.
- **Malešev, D. and Kunti, V. (2007).** Investigation of metal–flavonoid chelates and the determination of flavonoids *via* metal–flavonoid complexing reactions. *Journal of serbian chemical society*, 72 (10) 921–939.
- **Masibo, M and He, Q. (2009).** In vitro antimicrobial activity and the major polyphenol in leaf extract of *Mangifera indica* L. *Malaysian Journal of Microbiology*, 5(2): 73-80.
- **Massimo, A., Carmela, F., Roberta, D.B., Raffaella, G., Claudio, G. and Roberta, M. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*, 43: 348-361.
- **Meddour, A., Yahia, M., Benkiki, N., Ayachi, A. (2013).** Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *capparis spinosa* l. *Lebanese science journal*, 14: 41-49.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Michalak, A. (2006).** Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Polish Journal of Environmental Study*, 15(4): 523-530.
- **Miralles, J., Martinez-Sánchez, J.J., Franco, J.A and Banon, S. (2011).** *Rhamnus alaternus* growth under four simulated shade environments: morphological, anatomical and physiological responses. *Scientia Horticulturae*, 127(4): 562–570.
- **Naczka, M. and Shahidi, F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*, 1054: 095-111.
- **Nijveldt, R. J., Nood, E. V., Hoorn, D., Boelens, P., Norren, K and Leeuwen, P. (2001).** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential application. *American Society for Clinical Nutrition*, 74: 418-425.
- **Nonaka, G. I (1989).** Isolation and structure elucidation of tannins. *Pure & Application Chemistry*, 61(3): 357-360.
- **Okoro, I.O., Osagie, A. and Asibor, E.O. (2010).** Antioxydant and antimicrobial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 9 (20): 2989-2993.
- **Orhan, D.D., ozcelik, B., hosbas, S. and vural, M. (2012).** Assessment of antioxidant, antibacterial, antimycobacterial, And antifungal activities of some plants used as folk remedies in Turkey against dermatophytes and yeast-like fungi. *Turkish journal of boilogy*, 36: 672-686.
- **Oumaskour, K., Boujaber, N., Etahiri, S. and Assobhei, O. (2012).** Screening of antibacterial and antifungal activities in green and brown algae from the coast of Sidi Bouzid (El Jadida, Morocco). *African Journal of Biotechnology*, 11(104): 16831-16837.
- **Owen, P.L. et Johns, T. (1999).** Xanthine oxidase inhibitory acivity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacologie*, 64: 149-160.
- **Ozçelik, B ., Deliorman Orhan, D ., Ozgen, S. and Ergun, F. (2008).** Antimicrobial Activity of Flavonoids against Extended-Spectrum β -Lactamase (ES β L)-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* , 7(4): 1151-1157.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Paolini, V., Dorchies, Ph and Hoste, H. (2003).** Effet des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvre. *Alter. Agri.*, 17-19.
- **Psotová, J., Lasovsky, J and Vicar, J. (2003).** Metal-chelating Propertys, lectrochemical Behaviour, Scavenging and cytoprtoective Activities of six Natural phenolic. *Biomedical Papers*, 147(2): 147-153.
- **Qin, C., Li, Y., Niu, W., Ding, Y., Zhang, R., Shang, X. (2010):** Analysis and characterisation of anthocyanins in mulberry fruit. *Czech Journal of Food Sciences*, 28: 117-126.
- **Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., Cazin, M., Cazin, J.C., Bailleul, F.O and Trotin, F. (2000).** Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat. *Journal of Ethnopharmacology*, 72: 35–42.
- **Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C. and Pouységu, L. (2011).** "Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis." *Angewandte Chemie - AInternational Edition*, 50(3): 586-621.
- **Ralston, L., Subramanian, S., Matsuno, M and Yu, O. (2005).** Partial Reconstruction of Flavonoid and Isoflavonoid Biosynthesis in Yeast Using Soybean Type I and Type II Chalcone Isomerases. *Plant Physiology*, 137(4): 1375-1388.
- **Reed, J.D. (1995).** Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of animal and science*. 73: 1516-1528.
- **Ribéreau-Gayon, J., Peyaud, E., Sudraud, P. et Ribéreau-Gayon, P. (1982).** Compositions phénoliques. *In Traité d'œnologie, sciences et techniques du vin*, pp. 477-499.
- **Ribéreau-Gayou, P. (1968).** Notions générales sur les composés phénoliques. *In composés phénoliques des végétaux*. Edition Dunod, Paris, PP. 105-133.
- **Richardson, J.E., Fay, M.F., Cronk, Q.C., Bowman, D and Chase, M.W. (2000).** A phylogenetic analysis of Rhamnaceae using rbcL and trnL-F plastid DNA sequences. *Am J Bot*, 87(9): 13-24.
- **Roupe, K., Remsberg, C. M., Yonez, A et Davies, N. M. (2006).** Pharmacometric of stilbènes: Seguing Towards the clinic. *Current Clinical Pharmacology*, 1(1): 81-101.
- **Sarni-Manchado, P and Cheynier, V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec & Doc, Paris, p. 3-4.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Sava, C., Sirbu, R. and Dumitrescu, C. (2006).** Analyse qualitative et quantitative des anthocyanes dans des produits naturels. *Scientific Study & research*, vol. VII (4): 785-798.
- **Scalbert, A. (1991).** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883.
- **Sereme, A., Millogo-Rasolodimby, J., Guinko, S and Nacro, M. (2010).** Anatomie et concentration des tanins des plantes tannifères du Burkina Faso. *Journal des sciences*, 10: 24 -32.
- **Skerget, M., Katnik, p., Hadolin, M., Hras, A.R., Simonic, M. and Knez, z. (2005).** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavanols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry*, 89: 191-198.
- **Stefek, M. (2011).** Natural flavonoids as potential multifunctional agents in prevention of diabetic cataract. *Interdisciplinary. Toxicology*, 4(2): 69–77.
- **Stocker, P., Yousfi, M., Djerridane, O., Perrier, J., Amziani, R., El Boustani, S and Moulin, A. (2004).** Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie*, 86(12): 19-25
- **Stojković, D., Petrović, J., Soković, M., Glamočlija, J., Kukić-Marković, J and Petrović, S. (2013).** In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(13):3205-3208.
- **Suay, I., Arenal, F., Asensio, F.J., Basilio, A., Cabello, M.A., Diez, M.T., Garcia, J.B., Gonzalez del Val, A., Gorrochategui, J., Hernandez, P., Pelaez, F and Vicente, M.F. (2000).** Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 129-139.
- **Sulaiman S.F., Sjak A.B., Ooi K.L and Supriatno Seow E.M. (2011).** Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. *Journal of food composition and analysis*, 24: 506-515.
- **Sutra, L., Federighi, M and Jouve, J. L. (1998).** Manuel de Bactériologie Alimentaire. Ed. Polytechnica, p. 53-81.
- **Tanner, G.J., Francki, K.T., Abrahams, S., Watson, J.M., Larkin, P.J and Ashton, A.R. (2003).** Proanthocyanidin biosynthesis in plants: purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(34): 31647-31656.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Toty, A.A., Guessennd, N., Bahi, C., kra, A.M., Otokore, D.A et Dosso, M. (2013).** Evaluation *in-vitro* de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de *harungana madagascariensis* sur la croissance de souches multi-résistantes. *Bulletin de la société royale des sciences de liège*, 82: 12-21.
- **Wertz, J.L., Richel, A. and Gerin, P. (2015).** Molécules issues de la valorisation de la lignine. Ed. Wallonie, p. 01-37.
- **Winkel-Shirley, B. (2000).** Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 218–223.
- **Xiao, Z.T., Zhu, Q and Zhang, H.Y. (2014).** Identifying antibacterial targets of flavonoids by comparative genomics and molecular modeling. *Open journal of genomics*, vol, 3.
- **Yen, G.C and Chen, H.Y. (1995).** Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 27–32.
- **Yi-ling, C and Pan-Kai, C. (1982).** Rhamnaceae. In: Chen Yi-ling, FL. Reipubl. *Popularis Sin*, 48(1): 1-169.

Annexe I : les courbes d'étalonnage utilisées pour les dosages des polyphénols totaux, les flavonoïdes et les tanins.

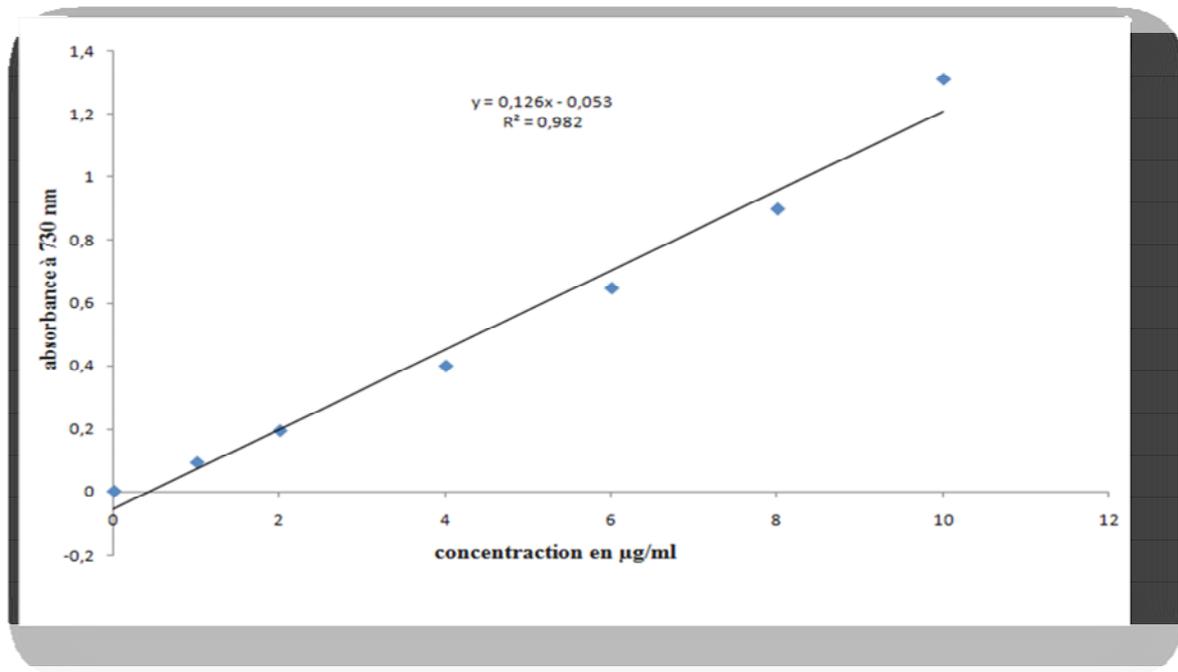


Figure 01 : courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux en utilisant l'acide gallique.

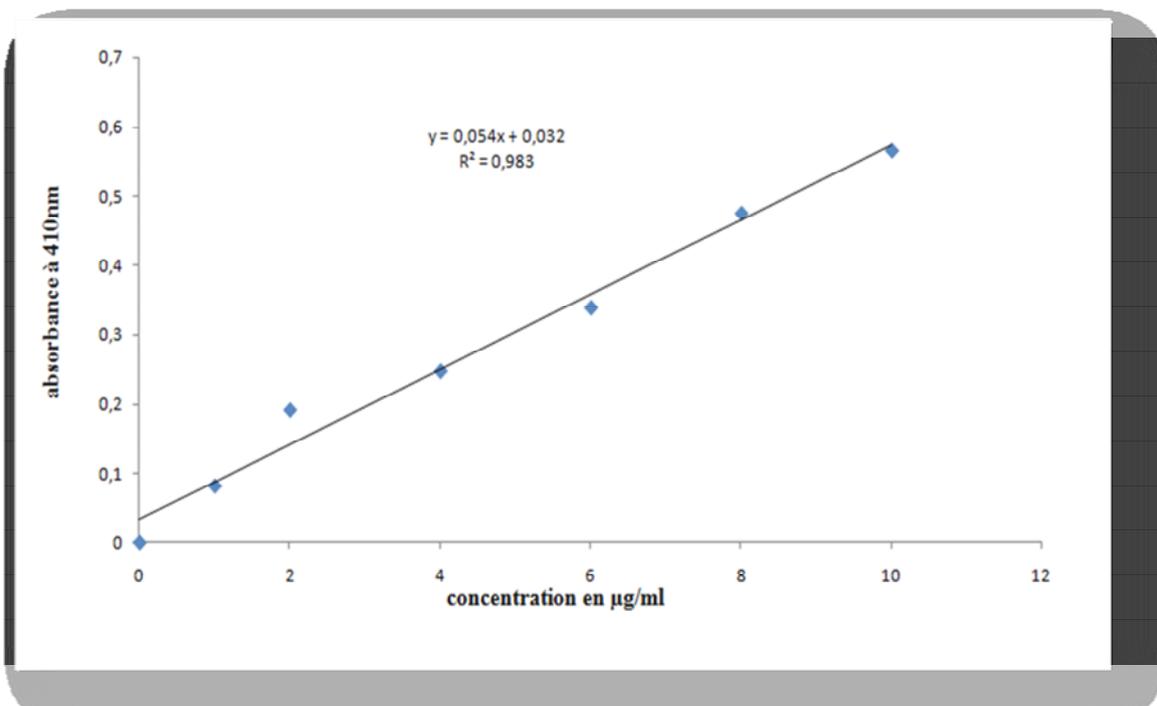


Figure 02 : courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes utilisant la quercitrine.

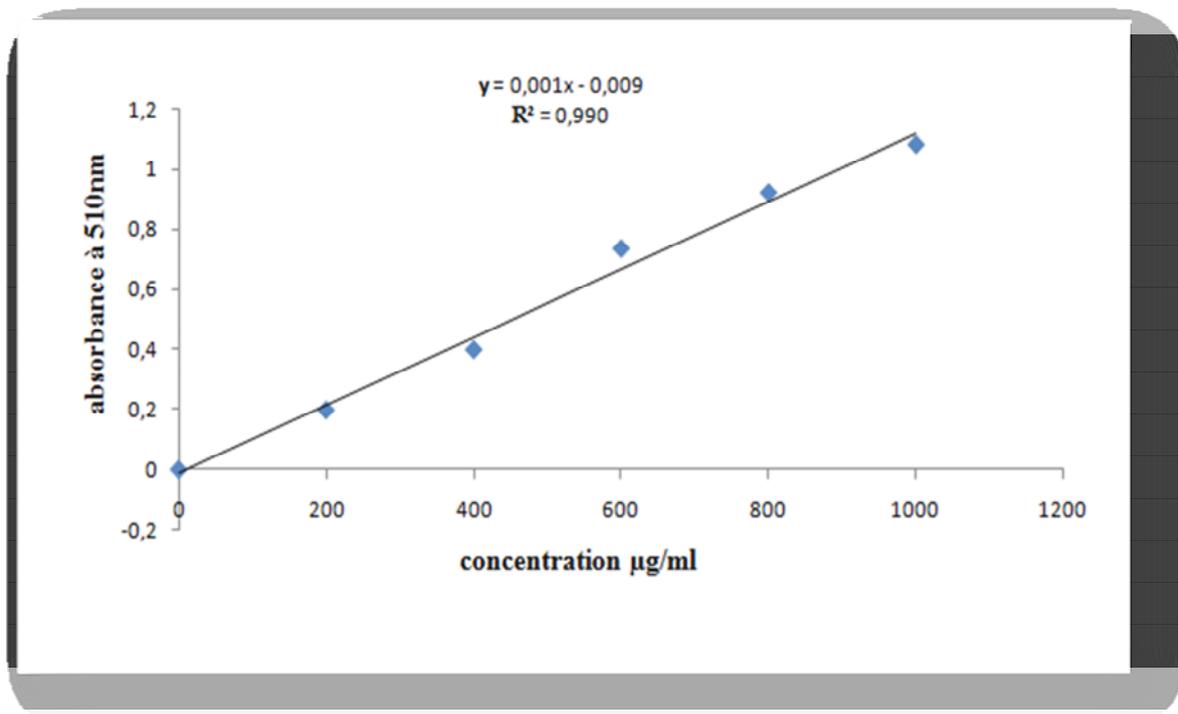


Figure 03 : courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins utilisant l'acide tannique.

Annexe II : Données générales sur les bactéries testées

✚ Escherichia coli :

Escherichia coli sont un groupe important et diversifié de bactéries qui infectent couramment l'intestin inférieur de sang chaud animaux, sont à Gram négatif, facultative anaérobie et non sporulé. La plupart des souches de E. coli sont inoffensives (bénins), mais certains, comme le sérotype 0157: H7, peut causer une intoxication alimentaire chez les humains, et sont parfois responsable des rappels de produits, tandis qu'un autre type appelé "Shiga" produisant la toxine, E. coli (STEC) provoque la maladie par faire une toxine appelée toxine de Shiga. E. coli sont utilisés en tant que organismes indicateurs pour tester des échantillons d'aliments pour fécaux la contamination. Comme tous les organismes à Gram négatif, les souches d'E. coli sont résistantes à de nombreux antibiotiques

✚ Staphylococcus aureus :

Staphylococcus aureus est une bactérie anaérobie facultatif, gram-positif, bactérie sphérique, trouvée dans l'air, la poussière, eaux usées, de l'eau, du lait, de la nourriture ou de l'équipement alimentaire, ainsi que sur surfaces environnementales, mais les humains ou les animaux (peau ou dans le nez) sont les principaux réservoirs avec environ 20 à 30% de la population générale jugée "staphylocoque supports ", Chaque année, quelque 500.000 patients dans les hôpitaux américains contractent un staphylocoque l'infection.

S. aureus peut sécréter plusieurs toxines, dont beaucoup sont associées à des maladies spécifiques. L'intoxication alimentaire par staphylococcique (staphyloenterotoxicosis / staphyloenterotoxemia) est une des conditions les plus aiguës provoquées par la entérotoxines produites par S. aureus.ont efficaces contre des organismes Gram-positifs.

Annexe III: matériel et réactifs utilisés

1-matériels

- ✚ Etuve
- ✚ Broyeur électrique (IKA. A11 BASIC)
- ✚ Tamiseur RETCH
- ✚ Balance de précision
- ✚ Plaque agitatrice
- ✚ Rotavapeur
- ✚ micropipette
- ✚ Vortex
- ✚ pH mètre
- ✚ spectrophotomètre UV-visible UNICO 1200
- ✚ Bain marie MEMMERT
- ✚ Autoclave
- ✚ Bec bunsen
- ✚ Four pasteur
- ✚ Centrifugeuse

2-Produits chimiques

- ✚ Méthanol pur (CH₃OH)
- ✚ Chloroforme pur
- ✚ Hexane
- ✚ Ethyle d'acétate
- ✚ butanol
- ✚ Acide gallique
- ✚ Réactif de Folin-ciocalteu
- ✚ Carbonate de sodium Na₂CO₃)
- ✚ DMSO
- ✚ La quercétine
- ✚ Chlorure d'aluminium (2%)
- ✚ Acide tannique
- ✚ Albumine de sérum bovin (BSA): 40mg / 40ml de tampon acétate
- ✚ Tampon d'acétate (0,2M)
- ✚ SDS (Sodium Dodecyle Sulfate) / TEA (triéthylamine)
- ✚ Chlorure de fer (0,01M)
- ✚ Eau physiologique (NaCL)

Annexe IV: préparation des solutions et réactifs

✚ Solution Acide gallique

1,5 mg de l'acide gallique + 1,5 ml d'eau distillée

✚ Solution folin ciocalteu (0,1)

2ml de réactif de folin + 18 ml d'eau distillé

✚ Solution carbonate de sodium (7,5%)

7,5 g de carbonate de sodium + 100 ml d'eau distillée

✚ Solution de quercétine

1 mg de la quercétine + 9 ml de méthanol

✚ Solution de chlorure d'aluminium (2%)

2 g de chlorure d'aluminium + 100 ml de méthanol

✚ Solution d'acide tannique

12 mg d'acide tannique + 6 ml de méthanol

✚ Solution NaCL (0,9%)

0,9 g de du chlorure de sodium + 100 ml d'eau distillée

Annexe V: fiches techniques de la composition des réactifs du dosage des paramètres lipidiques sanguins.

 **Fiche technique N°1**

Réactif pour le dosage de cholestérol total

R1	Pipe pH 6.9	90 mmol/L
Buffer		26 mmol/L
R2	Cholesterol esterase(CHE)	300U/L
Enzyme	Cholesterol oxydase(CHOD)	300U/L
	Peroxydase(POD)	1250U/L
	4-Aminophenazone(4-AP)	0.4mmol/L
CHOLESTEROL CAL	Cholestérol primaire standard aqueux	200mg/dL

 **Fiche technique N° 2**

Réactif pour le dosage des triglycérides.

R1	GOOD pH 7.5	50mmol/L
	P-chlorophenol	2 mmol/L
R2	Lipoproteines lipase(LPL)	150000U/L
	Glycerokinase(GK)	2500U/L
	Glycero-3-oxidase(POD)	440U/L
	4-aminophenazone(4-AP)	0.1mmol /L
	ATP	0.1mmol/L
TRIGLYCERIDES CAL	Triglycerides aqueux standard primaire	200mg/dL

Résumé

Rhamnus alaternus L. est un arbuste qui appartient à la famille des *Rhamnaceae*. C'est une plante médicinale largement utilisée en médecine traditionnelle à des fins thérapeutiques à cause de sa richesse en composés actifs. cela nous a conduit à l'extraction des composés phénoliques à partir de ses feuilles avec le méthanol, puis l'extrait méthanolique est fractionné avec différents solvants (Chloroforme, Acétate d'éthyle et Butanol), suivi d'une analyse phytochimique et enfin l'évaluation de l'activité antibactérienne. Le dosage des polyphénols totaux a montré une meilleure teneur qui est obtenue avec la fraction éthyle acétate ($1740,13 \pm 115,30$ mg EAG/g d'extrait sec), quant aux flavonoïdes le taux le plus élevé est aussi obtenu avec la fraction d'éthyle acétate ($224,59 \pm 15,61$ mg EQ/g d'extrait sec). Pour ce qui est de la teneur en tanins, le taux le plus élevé est retrouvé dans la fraction de chloroforme ($556,97 \pm 19,61$ mg EAT/g de l'extrait sec). L'étude de l'activité antibactérienne des extraits de *Rhamnus alaternus L.* sur deux souches bactériennes Gram positif (*S. aureus*) et Gram négatif (*E. coli*), a révélé que la souche à Gram positive (*S. aureus*), s'est révélée très sensible vis-à-vis des extraits d'acétate d'éthyle et de butanol avec des zones d'inhibitions de 18 et 12 mm respectivement. Par contre, la souche à Gram négative (*E. coli*), elle s'est révélée non sensible et aucune zone d'inhibition n'a été obtenue.

Mots clés : *Rhamnus alaternus L.*, Polyphénols, activité antibactérienne.

Summary

Rhamnus alaternus L. is a shrub that's belonging to the family of *Rhamnaceae*. It is a medicinal plant widely used in traditional medicine for therapeutic purposes because of richness in active compounds. This our led to extraction of phenolic compounds from the leaves with methanol and the methanol extract was fractionated with different solvents (Chloroform, Ethyl acetate and Butanol), followed by a phytochemical analysis and finally, evaluation of antibacterial activity. The determination of total polyphenols showed a better content which is obtained with the ethyl acetate fraction (1740.13 ± 115.30 mg EAG / g dry extract), as to the flavonoids the highest rate is also obtained with the ethyl acetate fraction (224.59 ± 15.61 mg EQ / g of dry extract). In terms of the tannin content, the highest rate is found in the chloroform fraction ($556.97 \text{ mg} \pm 19.61.61$ EAT / g dry matter). The study of the antibacterial activity of extracts of *Rhamnus alaternus L.* on both Gram-positive bacteria (*S. aureus*) and Gram-negative (*E. coli*) strain, revealed that the strain Gram positive (*S. aureus*), has revealed very sensitive in front of the Ethyl acetate extracts and Butanol with inhibitions areas 18 and 12 mm respectively. On the other hand, the Gram-negative strain (*E. coli*), it has proved insensitive and no zone of inhibition was obtained.

Keywords: *Rhamnus alaternus L.*, Polyphenols, antibacterial activity.

ملخص

Rhamnus Alaternus L. عبارة عن شجيرة تنتمي الى عائلة *Rhamnaceae* وهي نبتة طبية واسعة الاستعمال في الطب التقليدي لأغراض علاجية بسبب غناها بالمركبات الفعالة. هذا قادنا الى استخراج متعدد الفينول ابتداء من اوراقها باستعمال الميثانول وتجزئة المستخلص بمختلف المذيبات (الكوروفورم، خلات الايثيل و البوتانول) تليها تحاليل فيتوكيميائية واخيرا تقييم النشاط المضاد للبكتيريا.

اظهر تقرير متعدد الفينول الكلية ان افضل محتوى تم الحصول مع جزء خلات الايثيل ($1740,13 \pm 115,30$ ملغ مكافئ حمض قالك / غ مادة طازجة). كما تم الحصول على اعلى معدل لمركبات الفلافونويد ايضا في جزء خلات الايثيل ($224,59 \pm 15,61$ ملغ مكافئ الكرسيتين / غ مادة طازجة) من حيث محتوى التانين اظهرت اعلى معدل في جزء الكلوروفورم ($556,97 \pm 19,61$ التانينك / غ مادة طازجة) دراسة النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلصات *Rhamnus Alaternus L.* على كل من السلالات البكتيرية غرام+ (*S. aureus*) وغرام- (*E. coli*) كشف ان سلالة غرام+ (*S. aureus*) لديها حساسية للغاية اتجاه مستخلصات خلات الايثيل و البوتانول مع مناطق مثبطة 18 و 12 ملم على التوالي. عكسا لسلالة غرام- التي اثبتت انها غير حساسة لم يتم الحصول على اي منطقة مثبطة.

كلمات البحث: *Rhamnus alaternus L.*، بوليفينول، النشاط المضاد للبكتيريا