

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE KASDI MERBAH, OUARGLA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUE



Mémoire

MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Spécialité : Biochimie appliquée

Présenté par : **BENZAOUI Fatima et HOUARI Ahlam**

Thème

**Contribution à l'étude des activités biologiques de
Brocchia cinerea(Vis.) et *Matricaria pubescens*(Desf.)**

Soutenu publiquement

Le 30 /05/2016

Devant le jury :

**Ouled El HadjKhelilAmina
AnnouGhania
Bouziane Mebarka**

**Pr Présidente
MAA Examinatrice
M C(B) Encadreur**

**UKM Ouargla
UKM Ouargla
UKM Ouargla**

Année universitaire 2015/2016

Dédicace

Nous dédions ce travail

A nos parents, sources constantes d'encouragement, de soutien, de confiance et d'affection.

A nos familles

A nos amies

A tous les étudiants de la promotion Biochimie 2016

AHLAM&Fatima

Remerciements

En Premier lieu, nous tenons à remercier notre DIEU, notre créateur pour nous avoir donné la force pour accomplir ce travail.

Nous désirons exprimer notre profonde et vive reconnaissance à notre encadreur, Dr. Mebarka BOUZIANE qui a mis toute sa compétence à notre disposition, pour ces directives et Conseils judicieux et pour son suivi régulier à l'élaboration de ce travail.

Nous remercions aussi Mme Ouled El Hadj Khelil Amina, professeur à l'université KASDI MERBAH-Ouargla d'avoir accepté présider le jury de notre soutenance, également nous remercions Mme Annou Ghania Maître assistante classe A, de l'université KASDI MERBAH-Ouargla d'avoir examiné notre mémoire.

Nous remercions également Tous les enseignants de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université KASDI MERBAH-Ouargla.

Surtout M^{lle} Hadjaj Soumia d'e nous avoir aidé pour réalisation des analyses microbiologiques.

Nous voudrions aussi exprimer toute notre gratitude et nos remerciements à Mr Hadj Mahammed Mahfoud directeur du laboratoire Biogéochimie des milieux désertiques de l'université KASDI MERBAH-Ouargla ainsi que tous les membres qui nous ont beaucoup aidés à réaliser ce travail dans des bonnes conditions.

Nous remercions également tout le personnel du laboratoire de l'Hôpital Sliman Amirat à Touggourt pour les analyses biologiques.

*Nous adressons nos plus sincères remerciements à nos collègues
du laboratoire de Biogéochimie des Milieux Désertiques:
Nadia etchahra ..., pour leur aide, amitié, gentillesse et leurs
encouragements.*

Merci à nos parents pour l'encouragement.

Enfin, Nous remercions tous nos proches et amies.

SOMMAIRE

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction générale	01
Partie bibliographique	
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
I.1. Description des plantes étudiées	03
I.1.1. <i>Brocchiacinerea</i> (Vis.)	03
I.1.1.1. Description Botanique	03
I.1.1.2. Classification taxonomique	04
I.1.1.3. Usage traditionnel de <i>Brocchiacinerea</i> (Vis.)	04
I.1.1.4. Travaux antérieurs	04
I.1.2. <i>Matricariapubescens</i> (Desf.)	05
I.1.2.1. Description Botanique	05
I.1.2.2. Classification taxonomique	06
I.1.2.3. Usage traditionnel de <i>Matricariapubescens</i> (Desf.)	06
I.1.2.4. Travaux antérieurs	06
I.2. Les composés phénoliques	07
I.2.1. Généralité	07
I.2.2. Classement des polyphénols	07
I.2.3. Propriétés biologiques des polyphénols	09
I.2.4. Les flavonoïdes	09
I.2.4.1. Structure chimique des flavonoïdes	10
I.2.4.2. Intérêts et effets biologiques des flavonoïdes	12
I.2.5. Les tanins	13
I.2.5.1. Tannins hydrolysables (HT)	13
I.2.5.2. Tannins condensés (TC)	14
I.3. Activité antioxydante	15
I.3.1. Introduction	15

I.3.2. Stress oxydatif	15
I.3.3.Types de radicaux libres	16
I.3.4. Activité antioxydante	16
I.3.5. Les antioxydants	17
I.3.6. Classification des antioxydants selon la nature chimique	17
I.3.7. Modes d'action des polyphénols	18
I.4. Méthodes d'évaluation in vitro des propriétés antioxydants	18
I.4.1. La méthode de DPPH	19
I.4.2. La méthode de FRAP	19
I.5. Activité antimicrobienne	20
I.5.1.Les antibiotiques	21
I.5.2.Les alternatifs naturels	21
I.5.3.Présentation des microorganismes utilisés	22
I.5.4.Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne	23
I.5.4.1.Méthode de diffusion en milieu solide	23
I.5.4.2.Détermination de la concentration inhibitrice minimale CIM	23
Partie expérimentale	
Chapitre II : Matériel et méthodes	
II.1. Matériel et méthodes	24
II.1. Matériel végétal	24
II.2. Méthode d'extraction	24
II.2.1. Préparation des extraits	24
II.3.Etude quantitative	29
II.3.1.Dosage des polyphénols totaux	29
II.3.2.Dosage des flavonoïdes	29
II.3.3.Dosage des tanins condensés	30
II.4.Evaluation de l'activité antioxydante	31
II.4.1.Test au DPPH	31
II.4.2.Test FRAP	32
II.5.Test de l'activité antibactérienne	33

II.5.1. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque	33
II.5.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	34
Chapitre III : Résultat et discussion	
III.1. Résultats de rendement des extractions	35
III.2. Dosage des composés phénoliques	36
III.2.1. Teneurs en polyphénols totaux	36
III.2.2. Teneurs en flavonoïdes	38
III.2.3. Teneurs en tanins	41
III.3. Evaluation de l'activité antioxydante	43
III.3.1. Méthode de la réduction du fer (FRAP)	43
III.3.2. Test anti-radicalaire (Test du DPPH)	45
III.4. Evaluation de l'activité antibactérienne	48
III.4.1. Détermination de CMI	49
Conclusion	54
Références bibliographiques	56

Liste des abréviations

Abs	Absorbance
Acét	Acétone
AcOEt	Acétate d'éthyle
Aq	Aqueux
BuOH	Butanol
CMI	Concentration Minimal Inhibitrice
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
EC50	Concentration équivalente à 50% de DPPH inhibés
ERN	Espèces réactives de l'azote
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FRAP	FerricReducingAntioxidant Power
IP%	Pourcentage d'inhibition
MeOH	Méthanol
R%	Rendement
TPTZ	Tripyridyl-triazine
UV/Vis	Spectrophotométrie Ultraviolet- Visible
µg E AG/mg d'ext	Microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait
µg E cat/mg d'ext	Microgramme d'équivalent catéchine par milligramme d'extrait
µgE q/mg d'ext	Microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait

Liste des tableaux

N°	Intitulés	Pages
01	Exemples de classes des polyphénols.	08
02	Structures chimiques de quelques catégories de flavonoïdes.	11
03	Espèces chimiques réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN).	16
04	Rendements et quelques caractéristiques physiques des extraits préparés	35
05	Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits de <i>B. cinerea</i> (<i>B. c</i>)et de <i>M. pubescens</i> (<i>M. p</i>).	48

Liste des figures

N°	Intitulés	Pages
01	photos de l'espèce <i>Brocchiacinerea</i> (Vis.)	03
02	photo de l'espèce <i>Matricariapubescens</i> (Desf.)	05
03	Structure de base des flavonoïdes	10
04	Exemple de structure chimique des tanins hydrolysables	14
05	Exemple de structure chimique des tanins condensés	14
06	Structures de quelques antioxydants synthétiques	17
07	Principe réactionnel du test DPPH	19
08	Principe réactionnel du test FRAP	20
09	protocole d'extraction par l'eau	25
10	protocole d'extraction par le mélange méthanol/eau	26
11	protocole d'extraction par l'acétate d'éthyle et le butanol	27
12	protocole d'extraction par le mélange acétone/eau	28
13	Neutralisation du radical DPPH [*] en présence d'un antioxydant	31
14	Réduction du complexe Fe ⁺³ -TPTZ en Fe ⁺² -TPTZ par un antioxydant.	32
15	La courbe d'étalonnage de l'acide gallique obtenue pour le dosage des polyphénols	37
16	Taux de teneurs en polyphénols totaux des extraits de <i>B. cinerea</i> .	37
17	Histogramme de dosage des polyphénols totaux dans les extraits de <i>M. pubescens</i>	38
18	La courbe d'étalonnage de la quercetine obtenue pour le dosage des flavonoïdes	39
19	Histogramme du dosage des flavonoïdes dans les extraits de <i>B. cinerea</i>	39
20	Histogramme du dosage des flavonoïdes dans les extraits de <i>M. pubescens</i>	40
21	La courbe d'étalonnage de la catéchine obtenue pour le dosage des tanins condensés	41
22	Histogramme du dosage des tanins condensés dans les extraits de <i>B. cinerea</i>	42
23	La courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique obtenue par le test FRAP	44
24	Histogramme du pouvoir réducteur des extraits étudiés	44
25	Formes libre et réduite du DPPH	45

26	Histogramme de l'activité anti-radicalaire des extraits étudiés	46
27	Résultats des CMI des extraits de <i>B. Cinerea</i>	50
28	Activité antimicrobienne de l'extrait BuOH vis-à-vis <i>S. aureus</i> .	50
29	Activité antimicrobienne des extraits AcOEt et MeOH vis-à-vis <i>E. feacalis</i>	51
30	Résultats des CMI des extraits de <i>M. pubecsens</i>	51
31	Activité antimicrobienne de l'extrait AcOEt vis-à-vis <i>E. feacalis</i> .	52

Introduction

Introduction

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes (**Iserin, 2001**). La phytochimie est une étude basée sur les plantes, qui se situe à l'interface de nombreuses sciences appliquées comme la pharmacie, la chimie, la biologie, et la médecine.

Les plantes médicinales sont riches en métabolites secondaires (**Madi, 2010**). Ces derniers interviennent dans la défense contre les parasites pathogènes. On distingue plusieurs groupes de métabolites notamment, les alcaloïdes, les terpénoïdes, les phénols (simples phénols, acides phénoliques, quinones, flavonoïdes, tannins et coumarines) (**Toure, 2015**).

Au cours des dernières années, la résistance aux antibiotiques chez les micro-organismes pathogènes est devenue un problème de santé publique de plus en plus important dans le monde. Les composés antimicrobiens issus des plantes sont capables d'inhiber la croissance bactérienne en agissant sur des cibles cellulaires différentes de celles visées par les antibiotiques, actuellement, utilisés tels que les pénicillines, macrolides ou tétracyclines. Ils pourraient également présenter une valeur clinique significative dans le traitement des infections aux souches microbiennes résistantes (**Eloff, 1998**).

Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreux mécanismes pathologiques tels que l'athérosclérose, le cancer, les maladies auto-immunes ou encore les maladies de Parkinson et d'Alzheimer. L'utilisation des antioxydants de synthèse dans les domaines agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques qui devait apporter une solution à cette situation a été largement décriée ces dernières années. En effet, les antioxydants synthétiques sont suspectés à long terme d'effets tétragènes, mutagènes et cancérigènes (**Chavéron, 1999**). Certaines plantes constituent une source d'antioxydants naturels. Ces derniers sont apparus comme des alternatives saines aux antioxydants de synthèse.

Comme on peut le constater, la recherche de substances naturelles à activité antibactérienne et antioxydante issue de plantes constitue un enjeu scientifique important.

C'est dans ce cadre qu'une investigation est menée sur les composés phénoliques de deux plantes sahariennes spontanées *Matricaria pubescens* et *Brocchia cinerea*, L'intérêt de ces plantes

pour la thérapie et la recherche de nouvelles molécules, réside dans le fait qu'elles sont largement utilisées par les populations pour le traitement de nombreux maux et maladies infectieuses.

Ce travail rentre dans le programme de recherche de notre laboratoire (Biogéochimie des milieux désertiques), c'est un axe qui s'intéresse à la valorisation des plantes sahariennes à caractère médicinal. Notre travail s'échelonne comme suit :

➤ 1^{ère} Partie :

Dans laquelle une synthèse bibliographique est faite sur :

- ✚ les deux espèces « *Matricaria pubescens* » et « *Brocchia cinerea* ».
- ✚ Les produits naturels ciblés.
- ✚ Les activités antioxydante et antibactérienne.

➤ 2^{ème} partie :

Elle est constituée des étapes expérimentales suivies dans cette étude dans cet ordre :

- ✚ Extraction des polyphénols
- ✚ Dosage des polyphénols, des flavonoïdes et tanins condensés.
- ✚ Evaluation de l'activité antioxydante par deux méthodes, la réduction de fer (FRAP) et le piégeage du radical libre DPPH.
- ✚ Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion dans un milieu solide.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

I.1. Description des plantes étudiées

I.1.1. *Brocchiacinerea* (Vis.)

Brocchiacinerea (Vis.) est une espèce appartenant au genre *Cotula*, à la famille des Asteraceae existant en Algérie (Dendouguiet *al.*, 2012).

C'est une espèce saharo-arabe commune qui se développe dans le Sahara, zones désertiques et sablonneuses (Benzeraraet *al.*, 2012).

Cette plante connue sous le nom (Chouihya), est couramment utilisée dans la médecine populaire du sud algérien, aussi bien dans le reste des régions sahariennes du grand Maghreb (Benzeraraet *al.*, 2013).

I.1.1.1. Description Botanique :

B. cinerea est une plante annuelle herbacée laineuse de 5- 15 cm complètement, tomenteuses. Les feuilles et les tiges vert blanchâtre sont recouvertes de poils minuscules épais. Ses tiges sont dressées ou diffuse, ses fleurs toutes en tubes et ses feuilles sont d'épaisseur divisée à une partie supérieure avec deux ou trois segments, en la tige de la branche supérieure il y a des inflorescences jaunes. Cette plante se développe dans des conditions désertiques (végétales xérophiles) et favorise les sols de sable limoneux (Quezel et Santa, 1963) (Ozenda, 2004).



Figure 01 : photos de l'espèce *Brocchiacinerea*(Vis.) (Djellouliet *al.*, 2015)

I.1.1.2. Classification taxonomique (Ozenda, 1993) :

Embranchement	Spermaphytes
S/ embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Astérales
Famille	Asteraceae
Genre	<i>Brocchia</i>
Espèce	<i>Brochiacinerea</i> (Vis.)

I.1.1.3. Usages traditionnels de *Brochiacinerea* (Vis.)

B. cinerea est citée parmi les plantes médicinales les plus utilisées par la population locale saharienne, en raison de ses vertus médicinales (Abdenbi, 2014).

Elle est utilisée pour traiter les douleurs d'estomac, la fièvre, les maux de tête et migraines, la toux et l'inflammation des articulations (Chouikh et Chefrou, 2014). Elle présente des propriétés biologiques très variées, citons entre autres l'activité : anti-inflammatoire, analgésique, antiseptique, antibactérienne, antipyrétique (Benhammou, 2012).

Elle est très appréciée par les habitants des régions sahariennes, ils l'ajoute à leur boisson de thé vert pour la parfumer aussi elle est additionnée à certaines nourritures pour rehausser la saveur (Maizaet al, 1993; Larhsiniet al, 2002).

I.1.1.4. Travaux antérieurs

Cette plante contient de nombreux composés chimiques avec des avantages thérapeutiques tels que les flavonoïdes (Dendougui et al., 2012), les terpènes et les huiles essentielles qui donnent une spécificité des odeurs (Markouket al., 1999). Les extraits des feuilles de *B. cinerea* sont efficaces contre les champignons microscopiques pathogènes, ils ont montré une activité insecticide vis-à-vis des larves d'insectes (Bouziane, 2002). Au Maroc, cette espèce est très utilisée en médecine traditionnelle en tant qu'anti-inflammatoire, analgésique, antiseptique, antipyrétique et même antibactérien (Benhammou, 2012).

En outre, il est cité son utilisation pour le traitement des douleurs d'estomac, les migraines et les maux de tête (Chouikh et Chefrou, 2014).

I.1.2. *Matricariapubescens* (Desf.)

C'est une plante spontanée, elle pousse en abondance dans les régions sahariennes. Elle est très utilisée en médecine et préparations traditionnelles (Amiratetal., 2006).

I.1.2.1. Description Botanique :

Matricariapubescens (Desf.) est une espèce endémique, appartenant à la famille des Asteraceae, très connue en Afrique du Nord et qu'on rencontre particulièrement dans tout le Sahara septentrional et central. C'est une plante à tiges nombreuses couchées puis redressées et sous forme de touffes. Les feuilles découpées et velues sont d'un vert sombre. Involucre à bractées et ayant une marge membraneuse large, les fleurs toutes en tubes, de coloration jaune, sont groupées en capitules dont le diamètre est de 6 à 7 mm. Elle est commune dans tout le Sahara (Ozenda, 2004).



Figure 02 : photos de l'espèce *Matricariapubescens* (Desf.) (Makhloufi, 2009)

I.1.2.2. Classification taxonomique (Ozenda, 2004) :

Embranchement	Spermaphytes
S/Embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotyledones
Sous-classe	Compositae
Ordre	Astérales
Famille	Asteraceae
Genre	<i>Matricaria</i>
Espèce	<i>Matricariapubescens</i> (Desf).
Nom français	Camomille
Nom vernaculaire	Guretoufa, Ouazouaza

I.1.2.3. Usage traditionnel de *Matricariapubescens* (Desf.)

Dans une large mesure, l'utilisation de cette plante dans la médecine traditionnelle est très variée. Selon le nombre de personnes provenant de différentes parties du désert, elle est utilisée pour traiter la dysménorrhée, la toux et les maladies oculaires, les maladies rénales, les rhumatismes et les douleurs des maladies infectieuses et de l'abdomen, la sécheresse, la dentition, les allergies, et la morsure des scorpions.

Elle est, également, très appréciée par les habitants des régions sahariennes, elle renforce la saveur des soupes en particulier, au cours du mois de Ramadan ; le beurre fondu des chèvres filtré à travers les tiges et les feuilles de la plante devient très parfumé et se conserve mieux ; elle peut être ajoutée au thé. Elle est récoltée et commercialisée à grande échelle dans les marchés (Amirat, 2006 ; Lhuilier, 2007).

I.1.2.4. Travaux antérieurs

M.pubescens renferme une variété de métabolites secondaires biologiquement très intéressants, parmi ceux qui ont été caractérisés, on cite : les coumarines (Gherboujet *et al.*, 2012), Flavonoïdes : l'apigénine 7-glucoside et la lutéoline 7-glucoside, la quercétine et la quercitrine-3-Oglycoside) (Eberhard *et al.*, 2005 ; Gherboujet *et al.*, 2012), les amides (Benkiki, 2006) , les sesquiterpènes lactones et des terpènes (Wichtl et Anton, 1999).

I.2. Les composés phénoliques :

I.2.1. Généralités :

Les composés phénoliques, ou polyphénols, constituent une famille de molécules organiques largement présentes dans le règne végétal. Ils sont présents partout, dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles. Ce sont des métabolites secondaires produits par les plantes pour interagir avec les autres végétaux et les animaux (**Rezaire, 2012**).

Ces produits naturels font partie intégrante de notre alimentation dont les principales sources sont les fruits et légumes, les boissons (thé, café, jus de fruits), les céréales, et les légumes secs. Les fruits et les légumes contribuent d'environ par la moitié de notre apport en polyphénols, les boissons telles que : le jus de fruits et surtout le café, le thé apportant le reste (**Middleton et al., 2000**).

I.2.2. Classement des polyphénols :

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, présentant toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à six carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH). Ces structures peuvent également être acylées, glycosylées, ce qui donne une grande variété de structures et de polarités (**Abedini, 2013**).

Ils peuvent être classifiés, selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones en plusieurs classes de polyphénols, citons entre autres : les acides phénols, les quinones, les flavonoïdes, les coumarines, les anthocyanes, les tanins, les stilbènes. Le tableau 01 présente quelques catégories.

Tableau 01 : Exemples de classes de polyphénols(Nagendran 2006).

Classe	Arrangement du squelette carbonique	Exemple de structure
Coumarines	C6-C3	
Flavonoïdes	C6-C3-C6	
Lignanes	(C6-C3) ₂	
Biflavonoïdes	(C6-C3-C6) ₂	
Tanins condensés	(C6-C3-C6) _n	

I.2.3. Propriétés biologiques des polyphénols

Les composés phénoliques constituent une famille de substances naturelles très importante du point de vue thérapeutique et économique.

En effet, les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'industrie alimentaire (**Leong et Shui, 2002**). D'après les études multiples attestant de l'impact positif de la consommation de polyphénols sur la santé et la prévention des maladies, les industriels commercialisent maintenant des aliments enrichis en polyphénols ou des suppléments alimentaires. De plus, leur activité antioxydante assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique.

Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes pour la santé et la beauté de la peau.

En phytothérapie, une variété de vertus sont attribuées à ces composés, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes, les propriétés vasculoprotectrices, antispasmodiques et anti-inflammatoires sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux anthocyanes, tanins et autres coumarines, chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques (**Hennebelle et al., 2004**).

Par ailleurs, leur rôle au niveau des plantes qui les produisent est d'une grande importance. En fait, Les acides phénoliques, les stilbènes, les flavonoïdes, les tanins et les lignanes sont présents dans les feuilles, les fleurs, fruits et l'écorce de bois. Ces molécules contribuent à la croissance des végétaux et dans la lutte contre des agents pathogènes et des infections (**El Gharras, 2009**).

I.2.4. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes, comprenant au moins 6000 molécules, c'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ils sont présents chez toutes les plantes vasculaires et la plupart des Bryophytes (**Khater, 2011**).

Ils sont omniprésents dans les fruits, les légumes, les graines et d'autres parties de la plante (**Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006**).

Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres.

I.2.4.1. Structure chimique des flavonoïdes

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et de ce fait possèdent le même élément structural de base (**Abedini, 2013**). Cette structure de base respecte l'enchaînement : C6-C3-C6. Ils sont constitués de deux noyaux aromatiques désignés par les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, que désigne la lettre C (Figure 03).

Figure 03: Structure de base des flavonoïdes.

Ils sont classés en fonction du degré d'oxydation du noyau pyranique central. On les distingue aussi par le nombre et la position des groupements hydroxyles, par l'existence ou non de substituants sur la génine (**Abedini, 2013**).

Tableau 02 : Structure chimique de quelques catégories de flavonoïdes.

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH ₃	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidezine

I.2.4.2. Intérêts et effets biologiques des flavonoïdes :

La diversité structurale très riche de ces métabolites secondaires, est traduite par les intérêts qu'ils présentent et leurs applications assez variées, dans plusieurs domaines.

Sur le plan thérapeutique, plusieurs activités sont attribuées aux flavonoïdes. En effet, ils jouent un rôle très important dans le traitement : du diabète en inhibant l'aldose réductase, de la goutte en inhibant la xanthine oxydase, des inflammations en inhibant la lipoxigénase, la phospholipase et la cyclooxygénase. Egalement, ils sont utilisés pour la prévention de certaines maladies cardiovasculaires telles que l'hypertension (Quercétine), des thromboses (Myricétine et le Kaempférol), la fragilité des vaisseaux sanguins (Tangéretine, Rutine et Hespéridine) et de même dans le cas des allergies et des affections bactériennes et virales (**Anderson et al., 1996 ; Cowan, 1999 ; Yao et al., 2004**).

les flavonoïdes en tant qu'antioxydants, ils peuvent empêcher les dommages oxydatifs par différents mécanismes d'actions : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxydes et peroxydes (**Hodeketal., 2002**) ; soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires ; ou encore par l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (**Van Acker et al., 1996 ; Benavente-Garcia et al., 1997**). La Rutine et la Catéchine réagissent en synergie avec la vitamine C et E autant qu'antioxydants dans notre organisme. (**Belyagoubi, 2012**).

Par ailleurs, certains flavonoïdes sont impliqués dans les industries alimentaires, la Naringine, par exemple est très recherchée pour son amertume en chocolaterie et pour boissons tonifiantes (**Hadj Mahammed, 1996**). Les Anthocyanosides extraits de fruits (framboise, fraises,...) peuvent être utilisés comme additifs alimentaire (E163) dans les confitures et la confiserie, la néohesperidoside de quoi on synthétise la néohesperidinedihydrochalcone (E959), un édulcorant intense utilisable dans la plupart des produits alimentaires (jus de fruits, cidre,...)(**Brutneton, 1993**).

Chez les plantes qui les contiennent, les flavonoïdes sont des pigments permettant la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration par leur rôle de co-pigments. Leur présence dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, assure la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement ultraviolet UVB (280-320 nm) (**Bouziane, 2002**).

I.2.5. Les tanins :

Les tanins sont des polyphénols d'origine naturelle. Ils constituent un parmi les plus important groupe de ces composés (**Madi, 2010**).

Ces produits naturels sont largement distribués dans tout le règne végétal notamment, dans les arbres, arbustes et plantes légumineuses herbacées. Ils sont trouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (**Belyagoubi, 2012**).

Les tanins sont caractérisés par une saveur astringente, par des poids moléculaires et complexité structurale relativement élevée, en fait, ils peuvent se lier à des macromolécules telles que les protéines, les glucides structuraux et de l'amidon et diminuent leur disponibilité à la digestion.

En fonction de leur structure chimique et leurs propriétés, les tanins peuvent être classés en deux groupes, les tanins hydrolysables (HT) et tanins condensés (CT), connus aussi par les proanthocyanidines. Les premiers sont des esters de l'acide gallique (gallo et ellagitannins) tandis que, les autres sont des polymères de polyhydroxyflavan-3-ol. (**Madi, 2010**).

I.2.5.1. Tanins hydrolysables (HT) :

Ce sont des polyesters constitués d'un sucre, très souvent le D-glucose, et d'un nombre variable d'acide phénol qui, selon le cas, peut être soit l'acide gallique pour les gallotannins soit l'acide éllagique pour les tannins classiquement dénommés éllagitannins. La structure du premier exemple est représentée sur la figure 04 (**Bruneton, 1993 ; Cowan, 1999**).

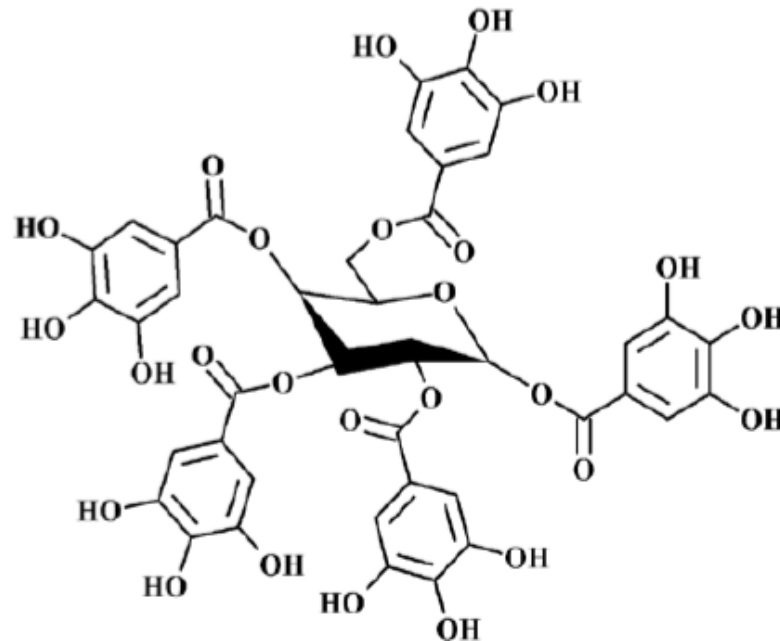


Figure 04: Exemple de structure chimique des tannins hydrolysables

I.2.5.2. Tanins condensés (TC) :

Ces métabolites secondaires sont appelés aussi, tannins catéchiques ou proanthocyanidols. Ils se différencient fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes.

Il s'agit des polymères flavaniques. Ils sont constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux, Gymnospermes et Fougères (**Bruneton, 1999**).

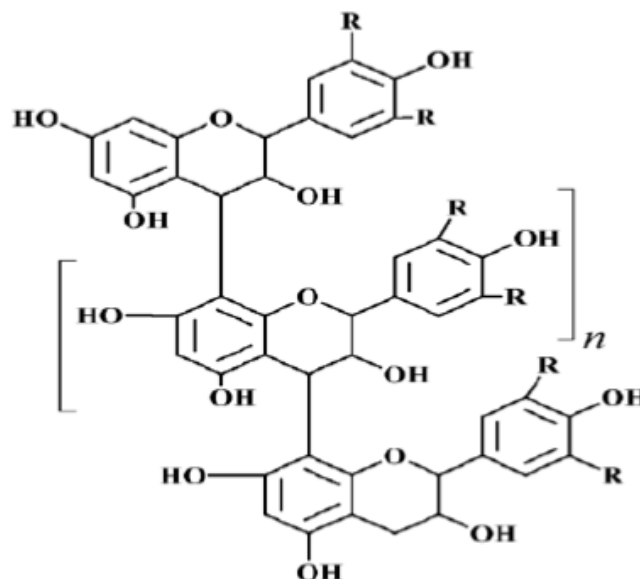


Figure 05: Exemple de structure chimique des tannins condensés

I.3. Activité antioxydante :

I.3.1.Introduction :

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique. Mais nos cellules convertissent une partie de cet oxygène en métabolites toxiques : les radicaux libres organiques (**Albert et al., 2003 ; Apel et Hirt, 2004 ; Michael et Murph, 2009**)

Dans les conditions normales, la production de ces espèces chimiques est contrôlable, en fait elles sont des intermédiaires indispensables à l'organisme où ils sont impliqués, à des faibles quantités, dans des processus métaboliques. Cependant, l'excès de la production des espèces chimiques réactives peut devenir toxique pour les composants majeurs de la cellule, les lipides, les protéines et les acides nucléiques, et donne lieu à ce qu'on appelle le stress oxydatif. Celui-ci est soupçonné d'être la cause dans diverses pathologies à savoir, les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), le diabète, les cancers, les maladies inflammatoires, le vieillissement, etc(**Bechthold, 2012**).

I.3.2. Stress oxydatif :

Dans l'organisme, la production des radicaux libres est contrôlée par ses systèmes de défenses. En effet, dans les conditions normales, on assiste à un équilibre de la balance antioxydants/prooxydants(**Mohammedi, 2006**).

Dans certaines situations, cette production augmente fortement, entraînant un stress oxydatif que l'on définit comme un déséquilibre entre la production et la destruction de ces espèces chimiques. Ce déséquilibre est la conséquence de nombreux facteurs, notamment les polluants présents dans l'air que nous respirons, l'eau et les aliments que nous consommons. Les rayons ultraviolets du soleil, d'autres radiations, le tabagisme et l'exercice excessif sont également des facteurs qui augmentent considérablement la présence des radicaux libres dans notre système (**Haigh, 1986;Krishnaiah et al, 2011**).

I.3.3. Types de radicaux libres :

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. Ce déséquilibre n'est que transitoire et il est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule. Les radicaux libres sont très instables et ils sont doués d'une forte réactivité, qui peut mener à un désordre dans les structures moléculaires.

Ces espèces chimiques peuvent se présenter sous plusieurs formes. Quelques une parmi les plus répondues sont rassemblées dans le tableau 03.

Tableau 03 : Espèces chimiques réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN).

(Madi, 2010)

Espèces chimiques réactives	Formule chimique
Radical Oxygène	O_2^\bullet
hydroxyl	OH^\bullet
hydroperoxyde moléculaire	HOO^\bullet
Hydroperoxyde	$ROOH$
Radical alkoxyde	RO^\bullet
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical oxyde nitrique	NO^\bullet
Peroxinitrite	$ONOO^-$
Hypochlorite	ClO^-

I.3.4. Activité antioxydante :

Pour faire face à ces espèces néfastes (ERO et ERN), le corps humain possède tout un arsenal de défenses que l'on qualifie d'antioxydant. Mais bien que le terme « antioxydant » soit fréquemment utilisé, il est difficile de lui donner une définition précise, car il couvre un large nombre de molécules et des domaines très divers comme l'alimentation, l'industrie chimique, l'industrie pharmaceutique.

L'antioxydant est une substance qui en faibles concentrations, en présence du substrat oxydable, ralentit ou empêche significativement l'oxydation des substrats matériels » (Halliwell, 1995).

Donc la capacité antioxydante sera, brièvement, définie par le pouvoir de capter ou de piéger ces radicaux libres là où ils sont produits.

I.3.5. Les antioxydants :

Les antioxydants sont des composés puissants qui peuvent neutraliser les radicaux libres impliqués dans le processus oxydatif, et nous aident ainsi à garder une vie active et saine. Quelques antioxydants sont fabriqués par le corps humain, d'autres tels que les vitamines et les polyphénols, doivent être apportés par notre alimentation.

Les antioxydants exercent leur protection à différents stades de l'oxydation et par l'intermédiaire de mécanismes différents.

I.3.6. Classification des antioxydants selon la nature chimique :

La classification de tous les antioxydants connus est difficile, ils sont classés généralement par leur mécanisme d'action ou par leur nature chimique (El Kalamouni, 2010).

α-Antioxydants synthétiques :

Plusieurs antioxydants synthétiques sont officiellement autorisés pour l'utilisation dans l'alimentation. Leur présence s'avère également nécessaire au sein des produits alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques afin d'éviter leur dégradation.

Cependant, des études toxicologiques ont jugé certains antioxydants synthétiques comme sources de danger (Barlow, 1990; Evans *et al*, 1992). La recherche de nouveaux antioxydants naturels tels que les polyphénols est l'objectif de nombreux industriels et scientifiques.

Parmi les antioxydants phénoliques de synthèse qui sont autorisés dans certains aliments le BHT (3,5-ditertiobutyl-4-hydroxytoluène), BHA (3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole), sont l'un et l'autre soluble dans les lipides et résistent bien à la chaleur.

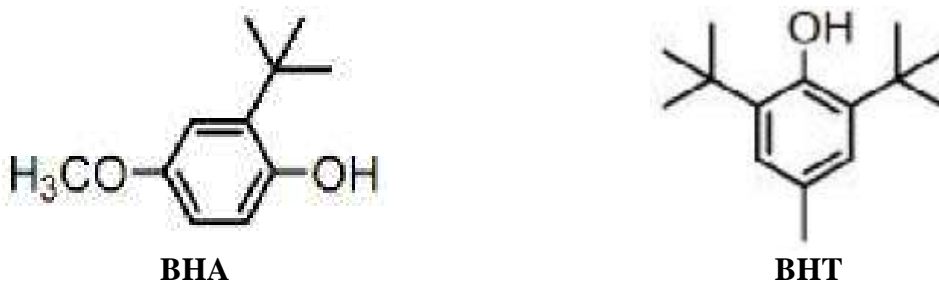


Figure 06: Structures de quelques antioxydants synthétiques

b-Antioxydants d'origine végétale :

Les plantes constituent des sources très importantes d'antioxydants, les antioxydants naturels dont l'efficacité est très reconnue aussi bien dans l'industrie agroalimentaire que pour la santé humaine tels que : les tocophérols, les caroténoïdes et les polyphénols qui sont capables de neutraliser les radicaux libres. En effet les groupes hydroxyles des polyphénols sont bien des donneurs d'atomes d'hydrogène. Ils peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactives de l'azote.



La forme radicalaire produite, ayant une très grande stabilité structurale, est moins dangereuse que le radical initial (Gardès-Albert et al., 2003).

I.3.7. Modes d'action des polyphénols :

Les composés phénoliques exercent une activité antioxydante via plusieurs mécanismes:

- Le piégeage direct des ERO et ERN.
- L'inhibition des enzymes génératrices d'EOR et ERN.
- La chélation des ions de métaux de transitions, responsables de leur production.
- L'induction de la biosynthèse d'enzymes antioxydantes (Achat, 2013).

I.4. Méthodes d'évaluation *in vitro* des propriétés antioxydants :

L'examen des données bibliographiques fait apparaître de nombreuses méthodes spectrométriques de détermination de l'activité antioxydante. Parmi les tests les plus utilisés, nous présenterons ceux couramment cités et qui ont été utilisés au cours de notre étude: la méthode au DPPH (DiphénylPicrylhydrazyle) et la méthode de FRAP (FerricReducingAntioxidant Power).

I.4.1. La méthode de DPPH :

Le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (capteur de proton) est un radical libre, stable au cours du temps et largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante d'un composé quelconque (Cotelleet *al.*, 1996 ; Trouillas *et al.*, 2003), le radical DPPH en solution est coloré en violet.

En présence d'antioxydant (donneurs de proton); le radical DPPH est réduit en formant une liaison moléculaire stable (Figure 07). Le produit réduit présente une coloration qui tire vers le jaune. On mesure à l'aide d'un spectromètre UV-vis à 517 nm, la diminution de la coloration de la solution qui est proportionnelle à la quantité d'antioxydant. L'activité antioxydante de l'extrait est comparée à celle d'un antioxydant de référence en termes d'équivalence ou en termes d'inhibition.

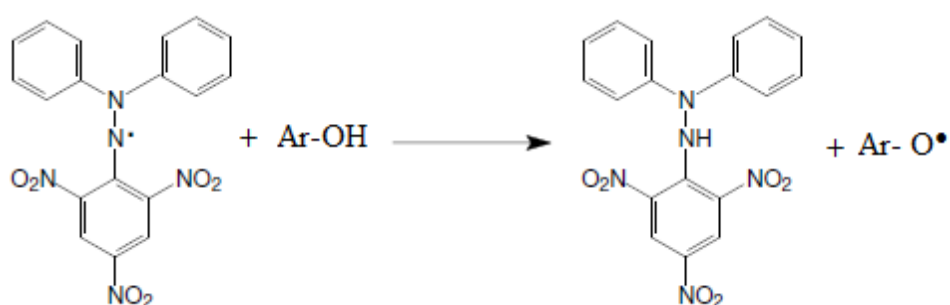


Figure 07: Principe réactionnel du test DPPH.

I.4.2. La méthode de FRAP :

Les métaux sont en général les meilleurs initiateurs de réactions en chaîne susceptibles de déséquilibrer la balance du stress oxydatif en faveur de prooxydants. Parmi ces métaux, le cation ferrique Fe^{3+} est le plus actif et on le retrouve souvent dans les aliments d'origine végétale ou animale. Le pouvoir réducteur d'un extrait vis-à-vis du cation ferrique peut être considéré comme un indicateur de son activité antioxydante.

L'activité antioxydante, non enzymatique, inhibitrice de radicaux libres et de la peroxydation lipidique, est généralement contrôlée par des réactions d'oxydo-réduction ; la méthode FRAP peut être une bonne méthode pour investiguer le pouvoir antioxydant d'un extrait en évaluant son pouvoir de réduction du cation ferrique.

Le dosage consiste à réduire le complexe tripyridyltriazine ferrique $[\text{Fe}^{+3}\text{-TPTZ}]$ de couleur jaune en complexe ferreux $[\text{Fe}^{+2}\text{-TPTZ}]$ de couleur bleu, sous l'action d'un antioxydant par un transfert d'électron (Figure 08). La variation de la coloration est mesurée à 593 nm.

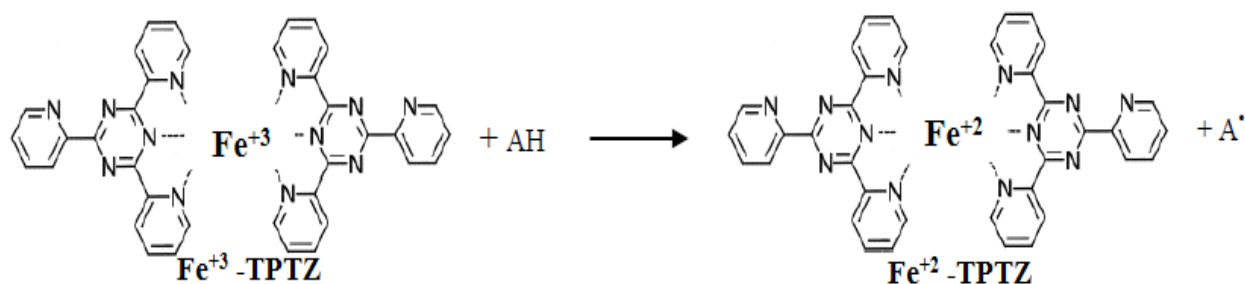


Figure 08: Principe réactionnel du test FRAP (Toure, 2015).

I.5. Activité antimicrobienne :

Le terme antimicrobien fait référence à un ensemble de composés qui ont la capacité d'éliminer ou de réduire la prolifération de microbes. Les microbes visés par un antimicrobien peuvent être des bactéries, des virus, des mycètes ou des parasites. Les traitements antibiotiques font partie également des antimicrobiens. Ils ciblent les champignons ou les bactéries.

L'utilisation des antibiotiques conduit dans la très grande majorité des cas à la sélection de populations microbiennes résistantes. Cette résistance est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition des gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages). Ces résistances ont conduit à chercher de nouveaux agents antimicrobiens possédant une efficacité plus importante que les drogues synthétiques d'une part et bien acceptés par l'organisme d'autre part (García-Ruiz *et al.*, 2008 ; Kempf et Zeitouni., 2009).

I.5.1. Les antibiotiques :

Les antibiotiques sont par définition, des produits microbiens, ou leurs dérivés, capables de tuer les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance (Prescott *et al.*, 1995). Leur

action étant spécifique et dirigée contre les micro-organismes, ils ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes.

L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action. Plus un antibiotique agit sur des espèces bactériennes différentes, plus son spectre est large.

L'action des antibiotiques peut s'exercer sur des structures ou des mécanismes essentiels à la croissance ou à la survie des bactéries. Ainsi, ceux qui inhibent la croissance bactérienne sont qualifiés de «bactériostatiques» alors que ceux qui tuent les bactéries sont dits «bactéricides» (Guinoiseau, 2011).

I.5.2. Les alternatifs naturels :

La maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques ce qui a constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale. Suite à cette préoccupation concernant les effets indésirables des molécules synthétiques destinées à la lutte contre les infections bactériennes, il semble donc important de trouver une alternative à l'utilisation des antibiotiques classiques.

Les remèdes à base de plantes constituent une alternative dans les systèmes de soins primaires et donc, une voie prometteuse pour le développement des médicaments traditionnellement améliorés. Récemment, beaucoup de chercheurs s'intéressent aux plantes médicinales pour leur richesse en antioxydants naturels à savoir les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, etc. qui possèdent des activités antimicrobiennes.

De ce fait, l'exploitation de nouvelles molécules bioactives ayant des effets secondaires limités ou inexistantes depuis des sources naturelles et leur adoption comme une alternative thérapeutique aux molécules synthétiques sont devenues des objectifs prioritaires pour les recherches scientifiques et les industries alimentaires et pharmaceutiques (Boutlelis, 2014).

I.5.3. Présentation des microorganismes utilisés :

I.5.4.Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne :

I.5.4.1.Méthode de diffusion en milieu solide :

La méthode de diffusion à partir d'un disque solide a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne des germes pathogènes vis-à-vis des antibiotiques et des extraits bruts.

La diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieu de cultureensemencé résulte d'un gradient de l'antimicrobien. Quand la concentration de l'antimicrobien devient très diluée qu'il ne peut plus inhiber la croissance de lasouche testée, la zone d'inhibition est démarquée(**El Kalamouni, 2010**).

I.5.4.2.Méthode des microdilutions en milieu solide :

Le principe de méthode CMI en milieu solide, l'extrait étant ici incorporé dans un milieu de culture solide. L'intérêt de cette technique en milieu solide réside dans la possibilité d'étudier un grand nombre de souches bactériennes (**Mogode, 2005**).

La CMI n'est pas, pour une bactérie donnée, une constante biologique. Elle est définie par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) comme étant la plus faible concentration d'une gamme de dilutions d'antibiotique de demi en, demi qui entraîne l'inhibition de toute croissance bactérienne visible.

La méthode par dilution successive en milieu solide est la méthode de référence pour déterminer la sensibilité bactérienne aux antibiotiques. Cette détermination exige une standardisation rigoureuse du protocole expérimental (influence de l'inoculum, du délai séparant ensemencement et observation, milieu de culture), toute modification des conditions expérimentales rendant l'interprétation difficile.

D'autres méthodes sont applicables : dilutions successives en milieu liquide (croissance bactérienne appréciée par l'apparition d'un trouble).

Chapitre 2

Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes :

II.1. Matériel végétal :

La reconnaissance botanique a été faite par Mr Ouladbelkheir agronome de la faculté de biologie à l'université de Ouargla, des échantillons de référence ont été déposés au niveau de l'herbarium de notre laboratoire Biogéochimie des milieux désertiques à l'université de Ouargla.

Après le séchage à l'ombre dans un endroit aéré, les parties aériennes de *M. pubescens* et de *B. cinerea* ont été broyées (ϕ tamis = 4mm) puis conservés jusqu'à leur utilisation.

II.2. Méthode d'extraction :

II.2.1. Préparation des extraits :

Afin d'extraire le maximum de polyphénols contenus dans les deux plantes, une variété de solvants organiques a été utilisée en suivant différents protocoles d'extraction.

II.2.1.1. L'extrait aqueux :

Une quantité de 10 mg de la poudre de l'espèce *B. cinerea* est mise à macérer dans 100 ml d'eau bouillant, pendant 2 heures à température ambiante. L'extrait aqueux est récupéré après filtration du mélange à l'aide d'un papier filtre. Permettant ainsi d'obtenir un extrait caractérisé par une couleur brune foncée, qui est considéré comme étant l'extrait brut. Les étapes sont résumées dans la figure 09 :

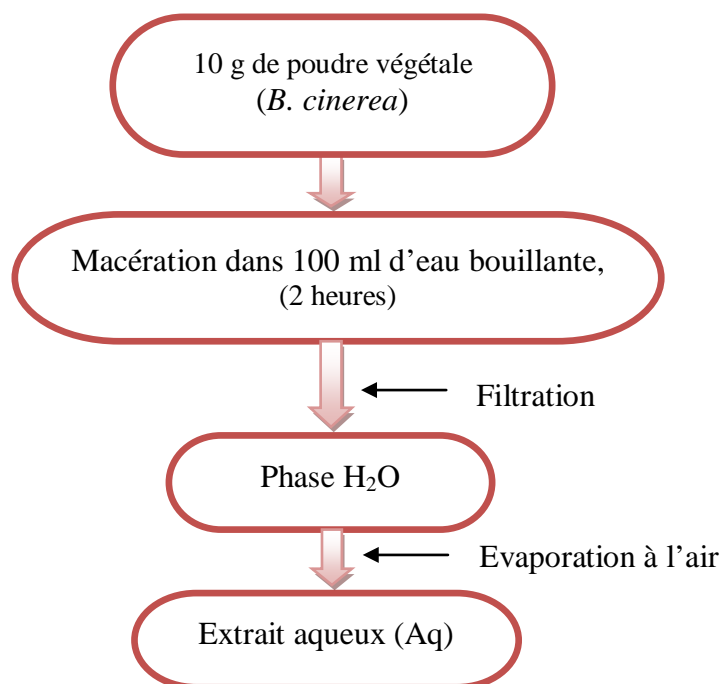


Figure 09 : Protocole d'extraction par l'eau.

II.2.1.2. l'extrait hydrométhanolique :

06g de la poudre végétale sont mis à macérer dans un mélange méthanol/eau 70%, pendant 24 h à température ambiante (2 fois). L'extrait hydro-alcoolique est récupéré après filtration du mélange à l'aide du papier filtre. Le solvant est éliminé par évaporation à l'air libre. Permettant ainsi d'obtenir un extrait caractérisé par une couleur brune foncée, qui est considéré comme étant l'extrait brut. Les étapes précédentes sont regroupées dans la figure 10 :

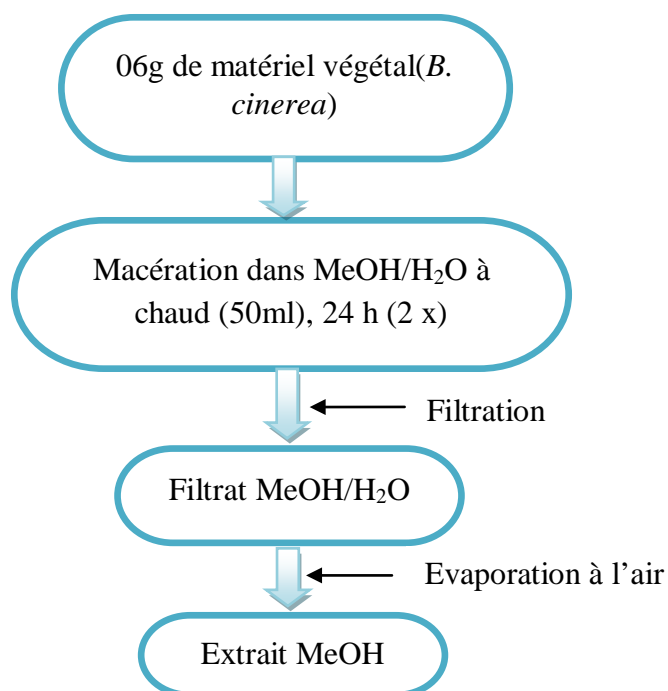


Figure 10: Protocole d'extraction par le mélange méthanol/eau.

II.2.1.3. L'extrait à l'acétate d'éthyle et aubutanol :

25g de chaque espèce sont mises à macérer dans un mélange méthanol/eau (200ml) à chaud, pendant 24 h (2 fois). L'extrait hydro-alcoolique est récupéré après filtration du mélange à l'aide du papier filtre, le méthanol est éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un rotavapeur. La phase aqueuse est soumise à l'extraction liquide-liquide, dans un premier temps avec l'acétate d'éthyle et par la suite, l'extraction est réalisée par le butanol.

Ces différentes étapes sont représentées sur la figure 11:

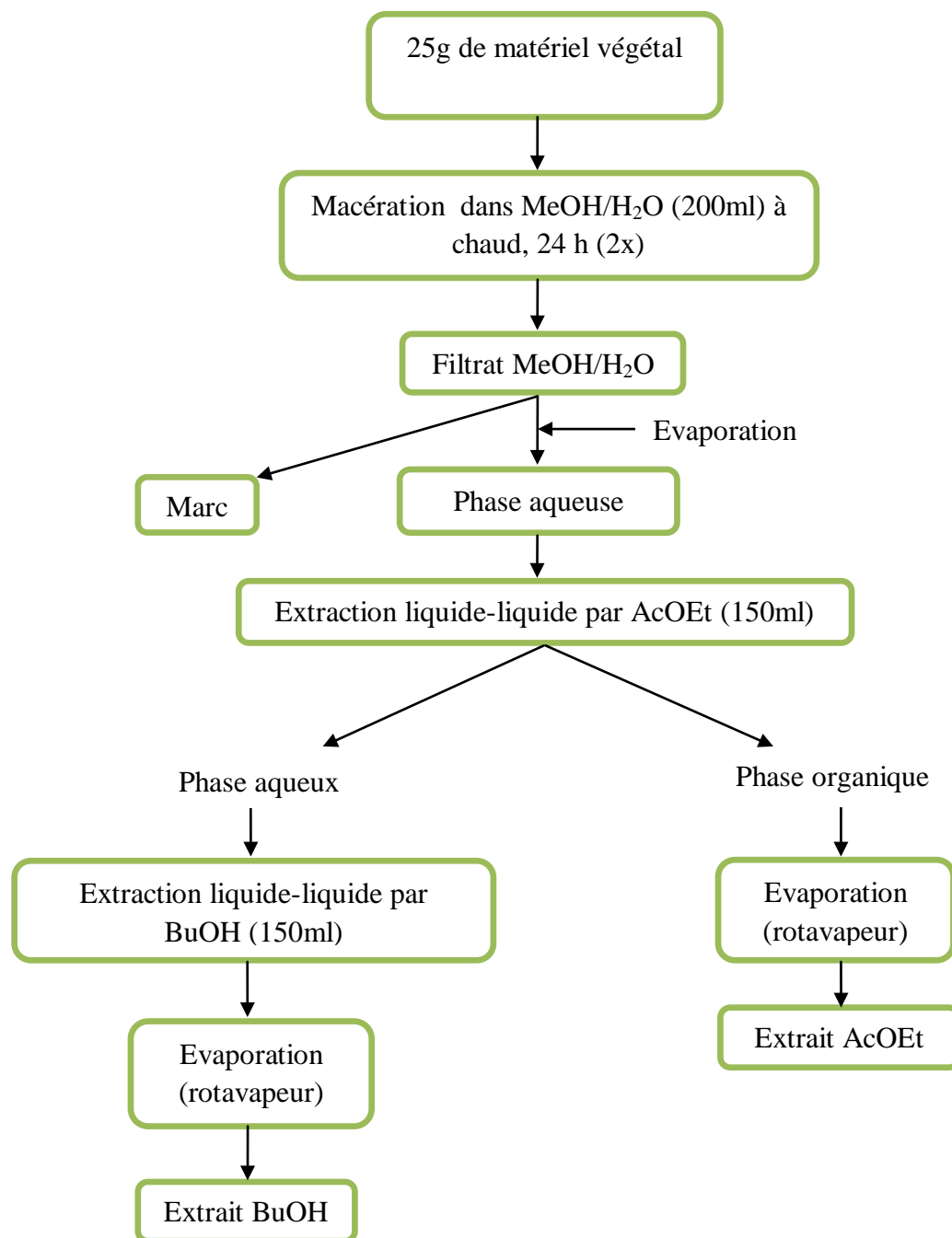


Figure 11: Protocole d'extraction par l'acétate d'éthyle et le butanol.

II.2.1.4. L'extrait acétonique :

5g de poudre de *B. cinerea* sont mis à macérer dans un mélange 80% acétone/eau, dans un bain ultrasons pendant 45 min à 10 °C.

Après filtration, on procède à une deuxième extraction identique sur le marc. Les deux filtrats réunis sont évaporés pour obtenir l'extrait hydro-acétonique final, caractérisé par une couleur jaune foncé. Les étapes précédentes sont présentées dans la figure 12:

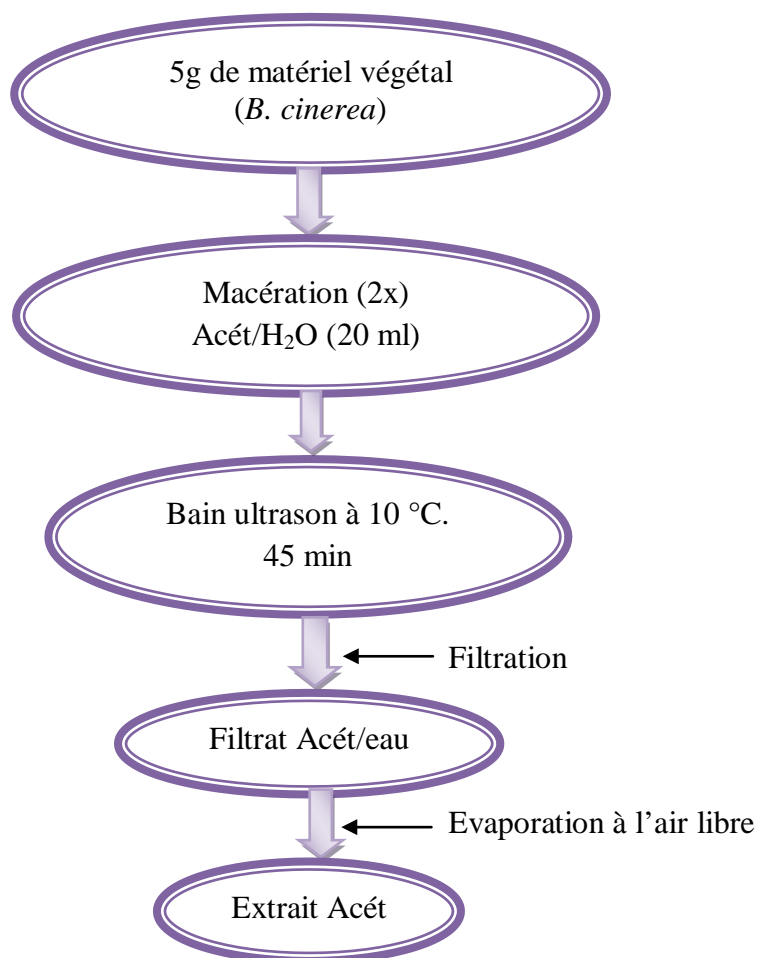


Figure 12: protocole d'extraction par le mélange acétone/eau.

II.3. Etude quantitative :

II.3.1. Dosage des polyphénols totaux :

II.3.1.1. Principe :

Le réactif Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Ribéreau-Gayon, 1968**). La coloration produite, dont l'absorption maximale est mesurée à 765 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits de végétaux.

II.3.1.2. Méthode :

Pour le dosage des polyphénols totaux, la méthode consiste à prendre un volume de 1500 μ l du réactif de Folin (10 fois dilué) à lequel sont ajoutés 300 μ l d'échantillon. 10 min après, 1200 μ l d'une solution de carbonate de sodium (20 mg/100ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 1h d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765 nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (250 μ g/ml) et elle est exprimée en μ g d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (μ g EAG/mg d'extrait).

II.3.2. Dosage des flavonoïdes :

II.3.2.1. principe :

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode basée sur la formation de complexes entre les composés phénoliques et le trichlorure d'aluminium. Les complexes produits sont de couleur jaune absorbent dans le visible à 415 nm (**Alyafi, 2007**).

II.3.2.2.Méthode :

La méthode du trichlorure d'aluminium (**Bahorunetal,1996**) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits étudiés . 1,5 ml de la solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol) sont ajoutés à 1.5 ml de l'échantillon.

Après 40 minutes de réaction à l'obscurité, l'absorbance est lue à 415 nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0,1mg/ml) et elle est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{gEq/mg}$ d'extrait).

II.3.3.Dosage des tanins condensés :

II.3.3.1.Principe :

Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupement aldéhydique de vanilline sur le carbone 6 du cycle A de la catéchine pour former un complexe chromophore rouge qui absorbe à 500nm (**Schofieldet al., 2001**).

II.3.3.2.Méthode :

A 200 μl de chaque extrait, on ajoute 1500 μl de vanilline (4%), dissoute dans le méthanol, et 750 μl d'acide hydrochlorique concentré. Après 15min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance est mesuré à 500nm. La concentration des tanins condensés (proanthocyanidines) est déduite à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la catéchine et sont exprimées en microgramme d'équivalent catéchine par un milligramme d'extrait ($\mu\text{g E cat/mg}$)(**Schofieldet al., 2001**).

II.4. Evaluation de l'activité antioxydante :

Pour évaluer l'effet antioxydant des extraits des plantes *B.cinerea* et *M.pubescens*, deux méthodes couramment utilisées ont été réalisées : en utilisant le radical 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est la première, tandis que l'autre est celle du FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

II.4.1. Test au DPPH :

II.4.1.1. Principe :

Le radical 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2,2 diphényl-1- picrylhydrazyle) de couleur violette se réduit en 2,2 diphényl -1- picryl hydrazine de couleur jaune (Maataouiet al., 2006).

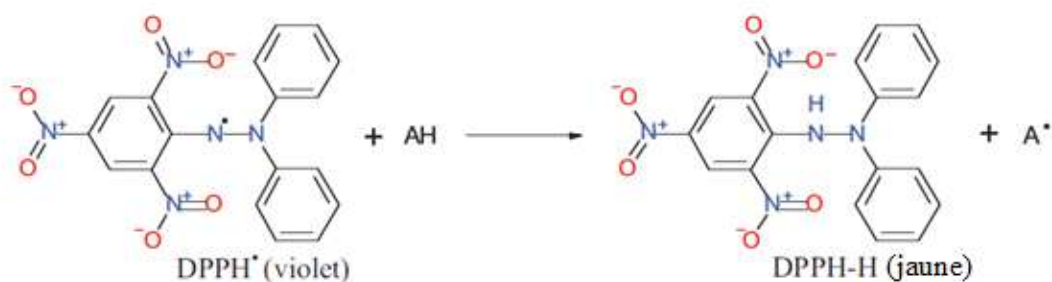


Figure 13 : Neutralisation du radical DPPH• en présence d'un antioxydant.

II.4.1.2. Méthode :

La solution du DPPH est préparée par solubilisation de 5.91 mg de DPPH dans 250ml de méthanol. 100 μ l de l'échantillon sont ajoutés à 2.9 ml de DPPH. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif qui contient uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517nm.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (réduction) du DPPH (IP%), calculé selon la formule (01) suivante :

$$IP\% = \frac{(A_{cont} - A_{échant})}{A_{cont}} \times 100 \dots \dots \dots (01)$$

IP% : pourcentage d'inhibition.

A_{échant} : absorbance de l'échantillon.

A_{cont} : absorbance du contrôle négatif.

II.4.2. Test FRAP :

II.4.2.1. Principe :

L'essai FRAP (Ferricreducingantioxidant power) est réalisé selon la méthode décrite par **Thaiponget *al.*, 2006**. Cette méthode mesure le pouvoir réducteur des antioxydants présents dans un mélange par leur capacité de réduire le tripyridyl-triazine ferrique (Fe^{+3} -TPTZ) en tripyridyl-triazine ferreux (Fe^{+2} -TPTZ) mesurable par spectrophotométrie UV-vis à 593 nm.

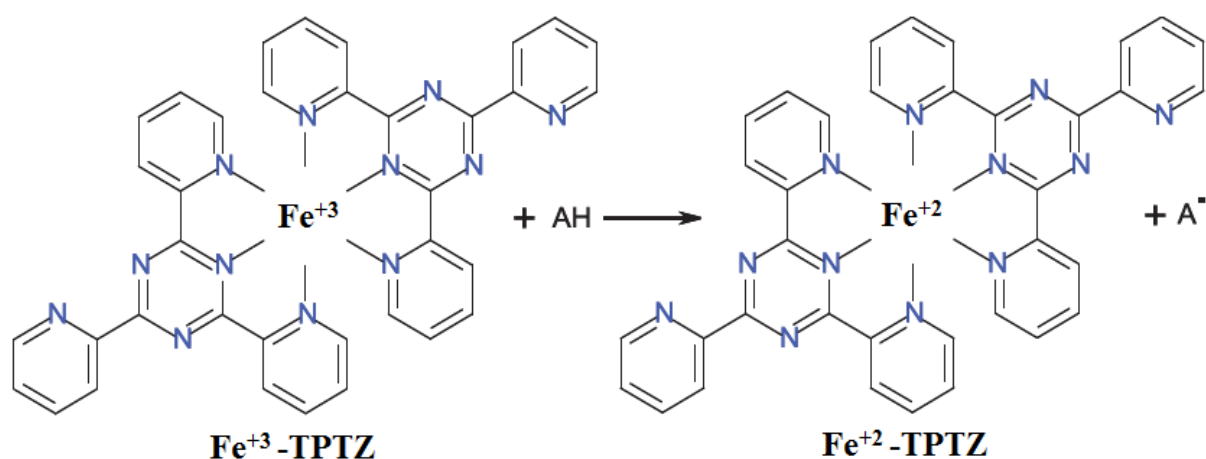


Figure 14 : Réduction du complexe Fe^{+3} -TPTZ en Fe^{+2} -TPTZ par un antioxydant.

II.4.2.2. Méthode :

Pour effectuer ce test, 150 μl de l'échantillon sont ajoutés à 2850 μl de solution de travail FRAP (15 ml de solution TPTZ, 15 ml de solution ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) et 150 ml de solution tampon acétate pH = 3.6) maintenue à 37°C. L'absorbance a été mesurée à 593 nm après avoir laissé incuber la réaction dans un bain thermostaté à 37°C à l'obscurité pendant 30 minutes.

II.5. Test de l'activité antibactérienne :

Comme il a été précédemment cité, les composés phénoliques sont doués d'un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. Dans cette optique, les extraits préparés de *B.cinerea* et de *M. pubescens* ont été mis en contact avec quelques souches bactériennes pathogènes, La mise en évidence et l'évaluation de labioactivé des différents extraits a été réalisé par une méthode très répandue dans ce domaine.

II.5.1. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque :

II.5.1.1. Principe :

Cette méthode est très courante dans les laboratoires de microbiologie. Elle est peu couteuse, facile à réaliser. Elle est très informative, elle permet la détermination de la résistance ou la sensibilité des souches microbiennes vis-à-vis les composés testés et/ou les extraits qui les contiennent.

Le principe de cette technique est le même que celui du test d'antibiogramme, dont les disques sont chargés des extraits et déposés à la surface des milieux de cultures solides ensemencés par des espèces bactériennes bien déterminées.

Les extraits commencent à diffuser dès son application sur le milieu de culture, et pour favoriser la croissance bactérienne, les boites sont incubées dans l'étuve pendant 24 heures ou plus selon la bactérie.

L'effet des extraits sur la croissance bactérienne se traduit par l'apparition d'une zone appelée « zone inhibition » dépourvue des bactéries.

II.5.1.2. Protocole :

Les différents extraits organiques issus des deux plantes *B. cinerea* et *M. pubescens* sont solubilisés dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). La gélose de Muller Hinton est coulée dans des boîtes de pétri et inoculée avec une suspension microbienne pure fraîchement préparée. Trois boîtes sont utilisées pour chaque souche.

Des disques de papier Whatman N°3 (Ø 5 mm) stérilisés à 120°C pendant 30 min ont été imbibés de 10 µl d'extraits. Puis ces disques déposés à la surface de la géloseensemencée, l'ensemble est incubé pendant 24 heures à 37°C.

Dès l'application des disques imprégnés, l'extrait diffuse de manière uniforme et après 24 heures d'incubation, l'apparition, autour des disques, d'une zone d'inhibition circulaire dans laquelle il n'y a pas de croissance de micro-organismes dénote la sensibilité de ceux-ci à cet extrait. Plus la zone d'inhibition est grande, plus le germe est sensible.

II.5.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) :

Cette méthode permet la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) à partir d'une gamme de concentrations d'extrait.

À partir de la solution mère (1 mg/ml), on a préparé une gamme de concentrations correspondant à : 0.5, 0.25, 0.125 mg/ml.

La CMI a été déterminée seulement pour les extraits les plus actifs constatés lors de l'étude en milieu solide. Tous les essais sont réalisés deux fois après incubation à 37°C pendant 24 heures. La CMI est définie comme la plus petite concentration d'extrait pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin sans extrait.

Chapitre 3

Résultats et discussion

III. Résultat et discussion :

III.1. Résultats de rendement des extractions :

Les parties aériennes des plantes *B. cinerea* et *M. pubescens* ont été soumises à l'extraction de leurs composés phénoliques avec une variété de solvants de polarités différentes: Méthanol/eau, Butanol, Acétate d'éthyle, Acétone/eau, Eau.

Les extraits obtenus ont été conservés à 4 °C jusqu'à leur analyse.

Chaque extrait a été caractérisé par son rendement, sa couleur et son aspect. Ces résultats sont présentés dans le tableau 04:

Tableau 04 : Rendements et quelques caractéristiques physiques des extraits préparés.

Extrait	R%		Aspect	Couleur
	<i>B. cinerea</i>	<i>M. pubescens</i>		
Acét	17.3	--	Solide	Jaune foncé
AcOEt	1,89	0.53	Liquide visqueux	Marron clair
BuOH	0.95	3.12	Liquide visqueux	Marron foncé
MeOH	9.45	--	Liquide visqueux	Jaune miel
Aq	5.68	--	Solide (poudre)	Brune foncée

Le choix de la méthode et du solvant d'extraction est fondamental pour un processus optimal. Il dépend principalement de la source et du type des composés à extraire, en outre il doit assurer un rendement élevé sans dégradation de ces composés (Routray, Orsat. 2011).

Les taux des rendements calculés ont montré que les solvants utilisés possèdent des pouvoirs et des sélectivités d'extraction différents.

Selon la nature chimique des composés phénoliques, ciblés dans cette étude, le mélange hydroacétonique a été le meilleur solvant à extraire ces produits (R% = 17.3%) dont les tanins sont les plus probables. Suivi du mélange méthanol/eau pour lequel on a enregistré un taux de rendement égal à 9.45%, dans cet extrait on suppose la présence des polyphénols de haute polarité mais de classes très variées. L'acétate d'éthyle et le butanol sont plus sélectifs pour les hétérosides des flavonoïdes, souvent le premier est utilisé pour extraire les flavonoïdes mono- et di-glycosylés, tandis que l'autre cible les flavonoïdes polyglycosylés. Les rendements d'extraction par ces deux solvants indiquent une présence modeste de ces classes flavoniques.

En comparaison avec les résultats obtenus par Bensizerara *et al.*, 2013 dont la valeur du rendement de l'extrait n-butanol (6,0%) est plus élevée que notre résultat, cependant la valeur signalée pour l'extrait acétate d'éthyle (1,2%) est inférieure que celle enregistrée dans cette étude. Belyagoubiet *al.*, 2011 quant à eux, ils ont trouvé eux aussi un taux supérieur (15.79 %) pour l'extrait MeOH.

Concernant *M. pubescens*, l'extrait AcOEt l'a montré moins rentable avec un taux de 0.53% par rapport à *B. cinerea*. Cependant le rendement de son extrait butanolique est noté supérieur avec une valeur de 3.12%.

Le rendement d'extraction n'est que relatif, il semble être lié à différents facteurs intrinsèques tel que : les propriétés génétiques des plants et extrinsèques tels que : l'origine géographique, les conditions et la durée de stockage du matériel végétal et aux conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée.

III.2. Dosage des composés phénoliques :

III.2.1. Teneurs en polyphénols totaux :

La spectrophotométrie UV/Vis a permis de quantifier le taux des polyphénols présents dans les extraits préparés pour cette étude.

La courbe d'étalonnage (figure 15) établie à l'aide d'une série de concentrations de l'acide gallique à partir d'une solution mère à 250 µg/ml, nous a permis d'estimer la teneur en composés phénoliques de chaque extrait de *B. cinerea*. Elle a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en µg équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (µgEAG/mg d'extrait).

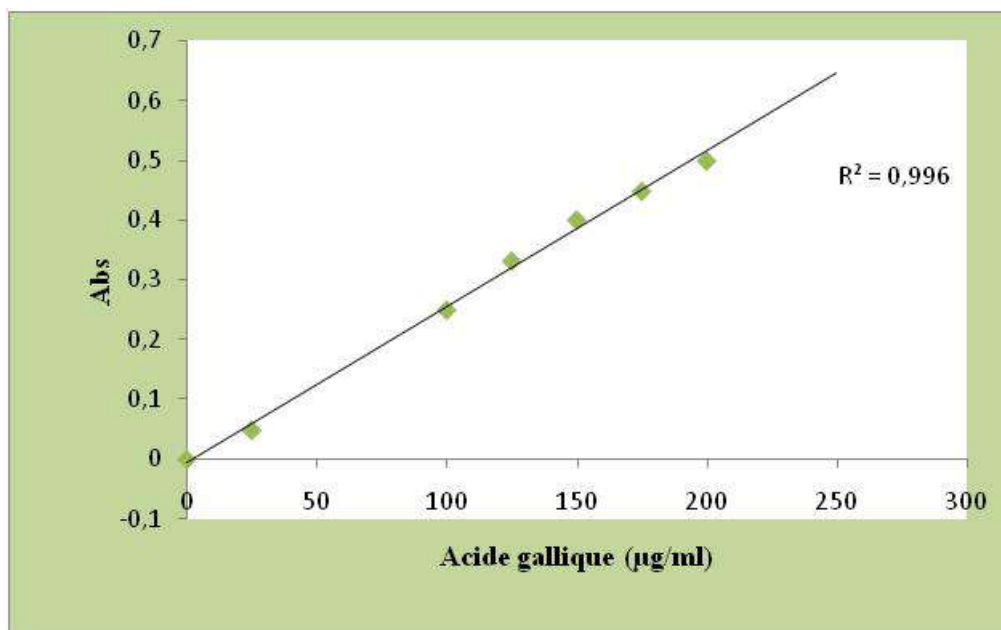


Figure 15: La courbe d'étalonnage de l'acide gallique obtenue pour le dosage des polyphénols.

D'après les teneurs enregistrées, il est à constater que tous les extraits de la plante *B. cinerea*, contiennent des polyphénols mais avec des quantités différentes. Les taux obtenus sont représentés graphiquement sur la figure 16 :

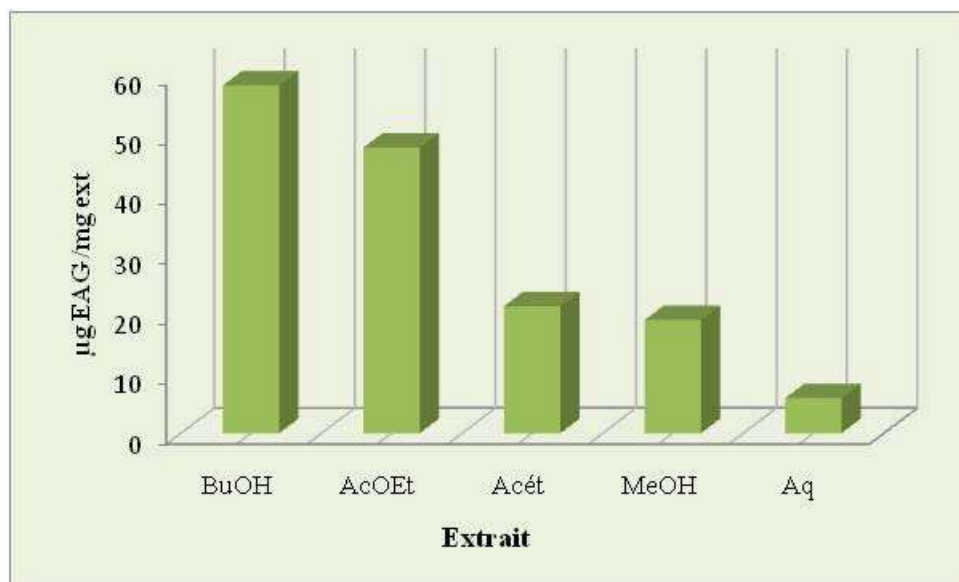


Figure 16 : Taux de teneur en polyphénols totaux des extraits de *B. cinerea*.

Des valeurs variables sont obtenues pour les extraits testés, d'après les quelles, on s'aperçoit clairement que les plus grandes teneurs sont présentes dans les extraits BuOH et l'extrait AcOEt, celles enregistrées pour l'extrait d'Acétone et l'extrait de MeOH se sont

présentées inférieures aux précédentes. Mais la quantité de ces composés dans l'extrait Aqa été la plus faible (5,88 μg EAG/mg ext).

Les résultats mentionnés sont en accord avec les remarques faites sur la sélectivité des solvants utilisés, en effet le butanol et l'acétate d'éthyle ont bien entraîné une bonne quantité de polyphénols capables de réagir avec le réactif de Folin-ciocalteau.

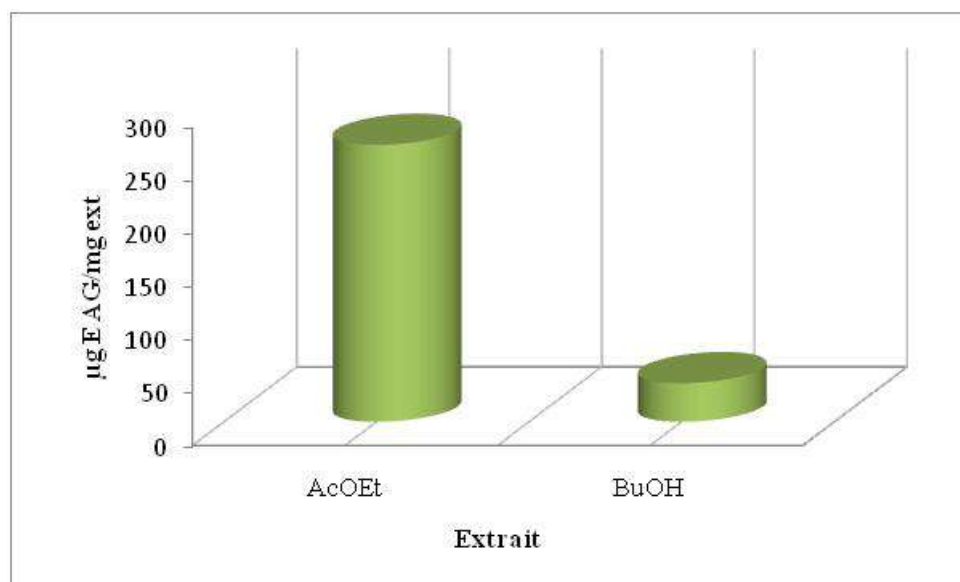


Figure 17: Histogramme de dosage des polyphénols totaux dans les extraits de *M. pubescens*

Inversement aux résultats obtenus pour *B. cinerea*, les taux du dosage des polyphénols des extraits de *M. pubescens* (Figure 17) montrent que l'extrait AcOEt représente le taux le plus élevé par rapport à celui du BuOH qui n'a présenté cette faible quantité. Notons que la quantité de polyphénols dans l'extrait d'AcOEt de *M. pubescens* est remarquable, comparée à tous les autres extraits préparés dans notre travail.

III.2.2. Teneurs en flavonoïdes :

La teneur des extraits en flavonoïdes a été déterminée par la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl_3). Pour cela, une courbe d'étalonnage pour la quercétine, en tant que standard, a été tracée (figure 18).

De ce fait, les valeurs calculées sont exprimées en μg équivalent de quercétine /mg d'extrait. (μg Eq/ mg ext.).

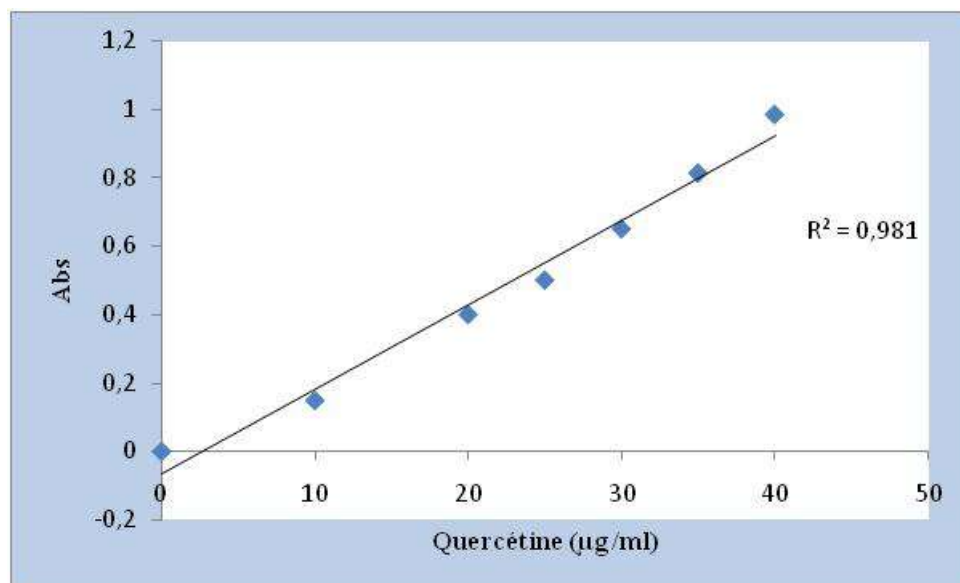


Figure 18: La courbe d'étalonnage de la quercétine obtenue pour le dosage des flavonoïdes.

Les teneurs en flavonoïdes calculées sont représentées en histogrammes sur la figure 19 :

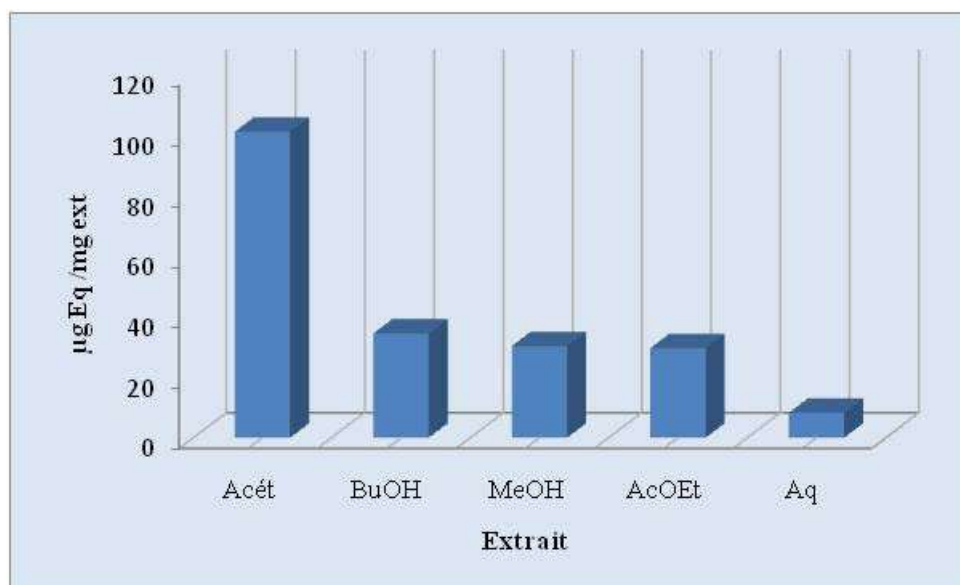


Figure 19 : Histogramme de dosage des flavonoïdes dans les extraits de *B. cinerea*

Les résultats mentionnés sur l'histogramme 19, permettent de constater que l'extrait Acétone, renferme une forte teneur en flavonoïdes par rapport aux autres extraits dont les taux

varient entre : 14,82 et 34,52 $\mu\text{gEq}/\text{mg}$ ext pour respectivement, l'extrait AcOEt et celui du BuOH. La plus faible teneur est contenue dans l'extrait Aq.

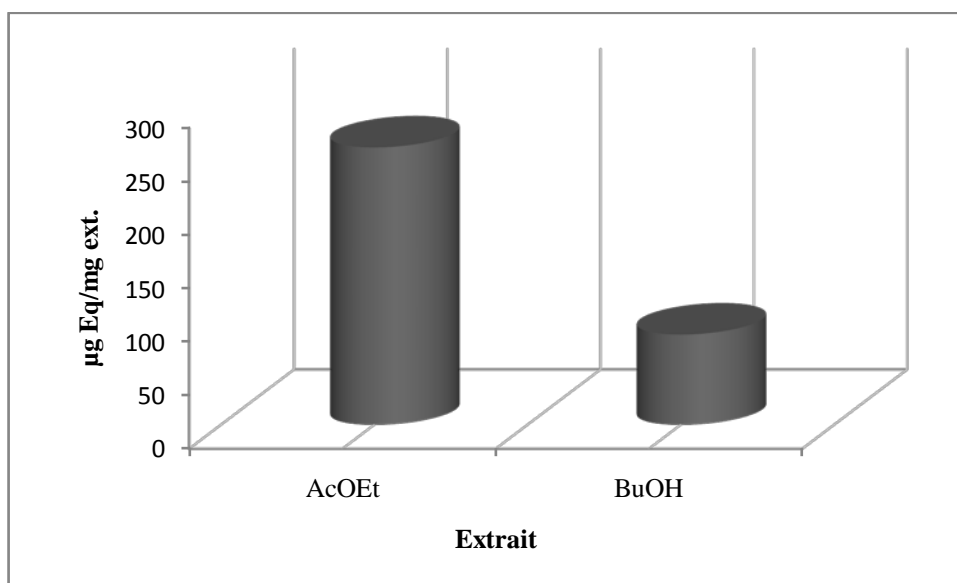


Figure 20 : Histogramme de dosage des flavonoïdes dans les extraits de *M. pubescens*

La figure 20 indique que la quantité des flavonoïdes dans l'extrait AcOEt de la plante *M. pubescens* est plus importante à celle de son extrait Butanolique.

Cependant, cette dernière valeur est très appréciable par rapport au taux des extraits de *B. cinerea*.

Globalement, les résultats illustrés ci-dessus pour les deux espèces, ont dévoilé que les extraits AcOEt et BuOH de la plante *M. pubescens* sont les plus riches en polyphénols et même en flavonoïdes.

III.2.3. Teneurs en tanins :

Afin de déterminer la teneur des extraits de *B. cinerea* et de *M. pubescens* en tanins condensés, la catéchine est utilisée en tant que standard pour ce type de composés. En effet une courbe d'étalonnage a été tracée à l'aide d'une série de concentrations filles de la solution mère de cet étalon à 500 µg/ml. La courbe ainsi obtenue est reproduite sur la figure 21. Les teneurs calculées sont exprimées en µg équivalent de catéchine /mg d'extrait.

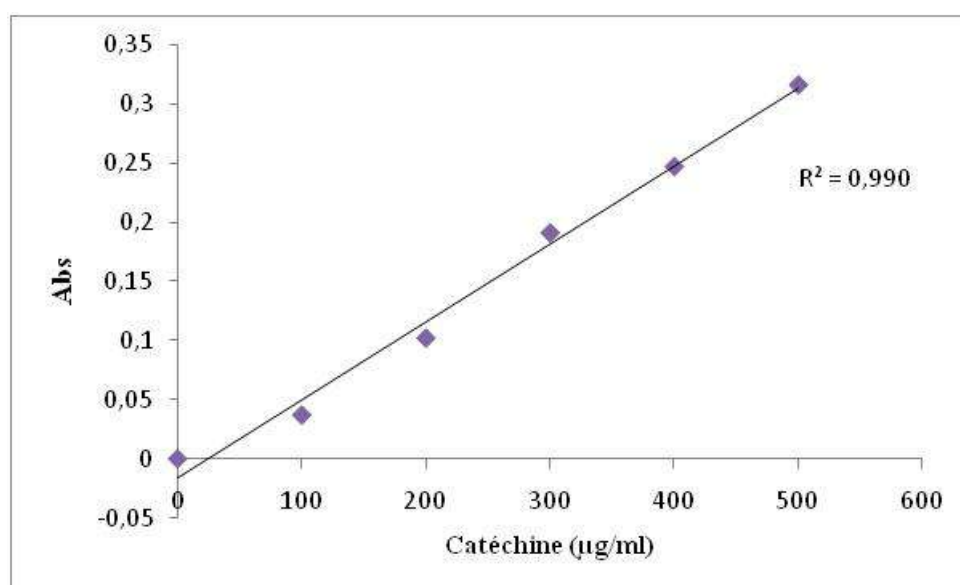


Figure 21: La courbe d'étalonnage de la catéchine obtenue pour le dosage des tanins condensés.

De cette courbe on a pu déduire les taux de teneurs en tanins de tous nos échantillons. Ceux de *B. cinerea* sont rassemblés sur la figure 22. Tandis que pour *M. pubescens* on n'est arrivé à enregistrer aucune valeur. Ce qui indique probablement, l'absence de ces substances dans les extraits testés pour cette espèce.

Souvent, l'extraction des tanins condensés est délicate à réaliser. Elle dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé et des conditions opératoires (**Chavan, 2001**).



Figure 22: Histogramme de dosage des tanins condensés dans les extraits de *B. cinerea*.

Au moyen de ce dosage, on a vérifié quantitativement la composition de la plante *B. cinerea* en tanins, en effet elle possède des quantités appréciables. Ceci est justifié peut être par l'affinité de ce type de composés de structures variées aux solvants utilisés.

Les plus grandes quantités sont notées pour les extraits : MeOH, AcOEt et BuOH, suivis par les extraits hydroacétonique et aqueux .

Généralement, les solvants d'extraction entraînent des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique (Djeridane *et al.*, 2007).

En conclusion, les dosages réalisés ont donné une idée quantitative sur les classes phénoliques testées. Cependant, leur présence doit être confirmée par d'autres méthodes plus pointues.

III.3. Evaluation de l'activité antioxydante :

A cause des effets nocifs des antioxydants synthétiques, la recherche d'alternatifs d'origine naturelle a fait l'objet d'un nombre considérable de travaux de recherche.

La capacité antioxydante des extraits de plantes dépend principalement, de leur composition chimique ainsi que les conditions de réalisation des tests d'évaluation *in vitro*. En effet, plusieurs produits naturels ont prouvé leur activité antioxydante, mais les plus répandus sont les composés phénoliques. (Zhao, 2014)

Souvent, les antioxydants réagissent avec les ERO et les ERN par différents processus. D'où la nécessité d'utilisation d'au moins deux méthodes distinctes (Wong et Koh, 2006).

Dans la présente étude, le test DPPH et le test FRAP ont été effectués pour l'évaluation des capacités antioxydantes des deux espèces *M. pubescens* et *B. cinerea*.

III.3.1. Méthode de la réduction du fer (FRAP) :

Le test FRAP utilise le composé 2,4,6-tripyridyl-triazine (TPTZ) qui est capable de former un complexe avec le fer, le suivi par UV-vis du changement de couleur du complexe produit selon l'état d'oxydation du fer, aide à mesurer l'aptitude des échantillons à réduire le fer ferrique dans le complexe (Fe^{3+} -TPTZ) au fer ferreux dans (Fe^{2+} -TPTZ) caractérisé par sa couleur bleue absorbant à 593 nm.

Dans cette étude, on a opté pour tester le pouvoir réducteur des cinq extraits de *B. cinerea* et de deux extraits de *M. pubescens*. L'acide ascorbique (AA) est utilisé comme antioxydant étalon, duquel une série de concentrations a été préparée à partir d'une solution mère à 100 µg/ml. La figure 23 illustre le graphe produit.

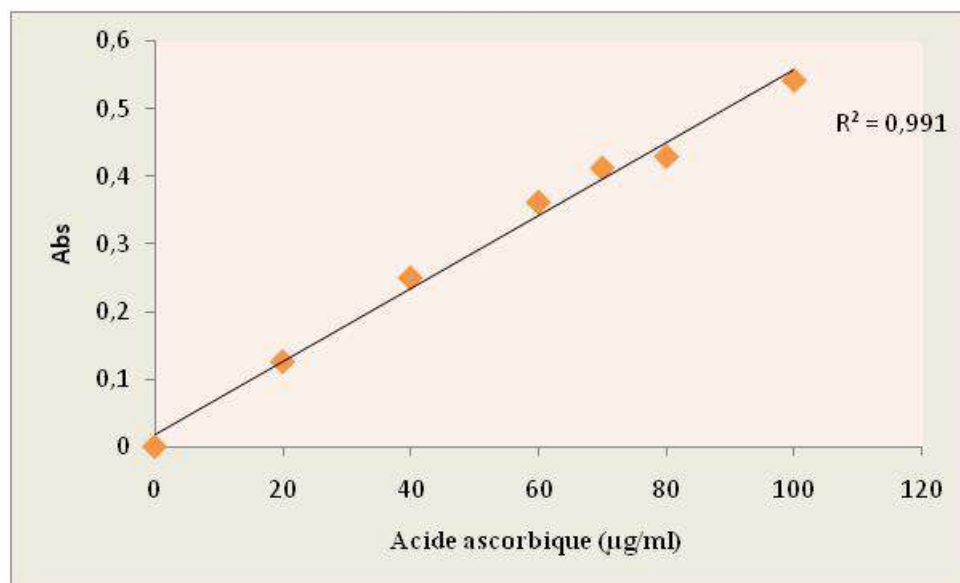


Figure 23: La courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique obtenu par le test FRAP.

Les résultats obtenus par la méthode de FRAP sont représentés graphiquement sur la Figure 24:

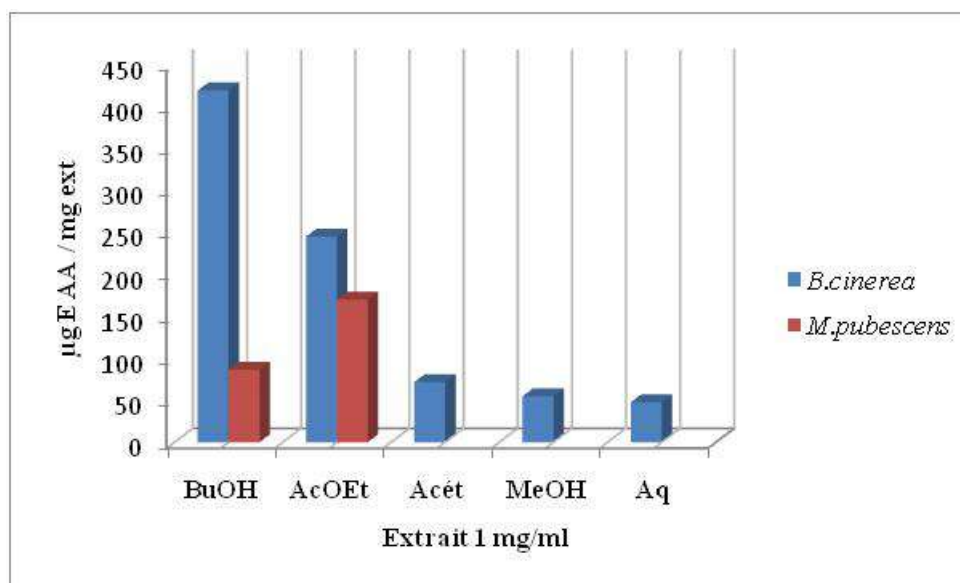


Figure 24 : Histogramme du pouvoir réducteur des extraits étudiés.

Ces échantillons se sont présentés les plus réactifs par rapport à cette activité. Cette constatation peut être justifiée par l'action des composés phénoliques présents dans ces extraits en quantités considérables, signalées en dessus. Concernant les autres extraits dans le cas de *B. cinerea*, l'histogramme les a montrés avec des effets moins importants.

III.3.2. Test anti-radicalaire (Test du DPPH) :

L'activité antioxydante des différents extraits de *B. cinerea* vis-à-vis le radical DPPH a été évaluée par spectrophotométrie UV-vis en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette, correspondant à sa forme radicalaire, à la couleur jaune qui représente sa structure neutre. Cette transformation est mesurable à 517 nm.

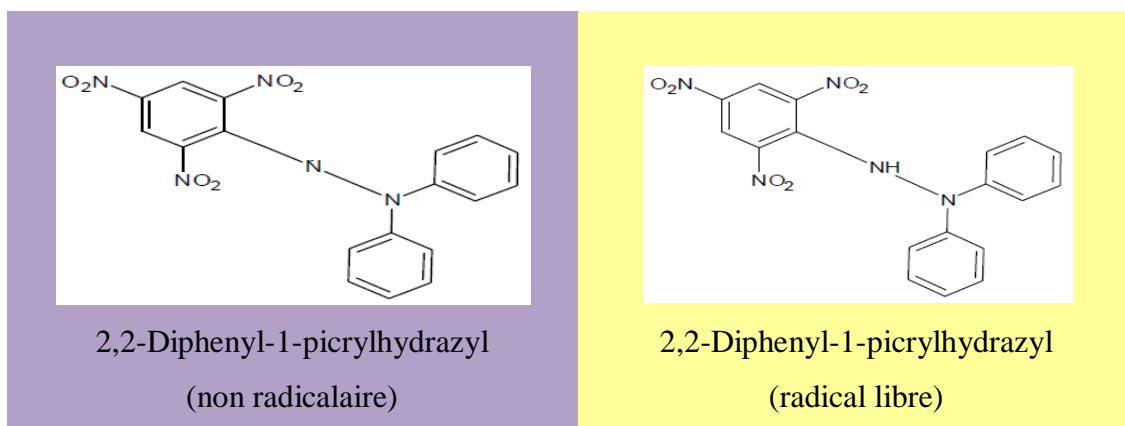


Figure 25 : Formes libre et réduite du DPPH.

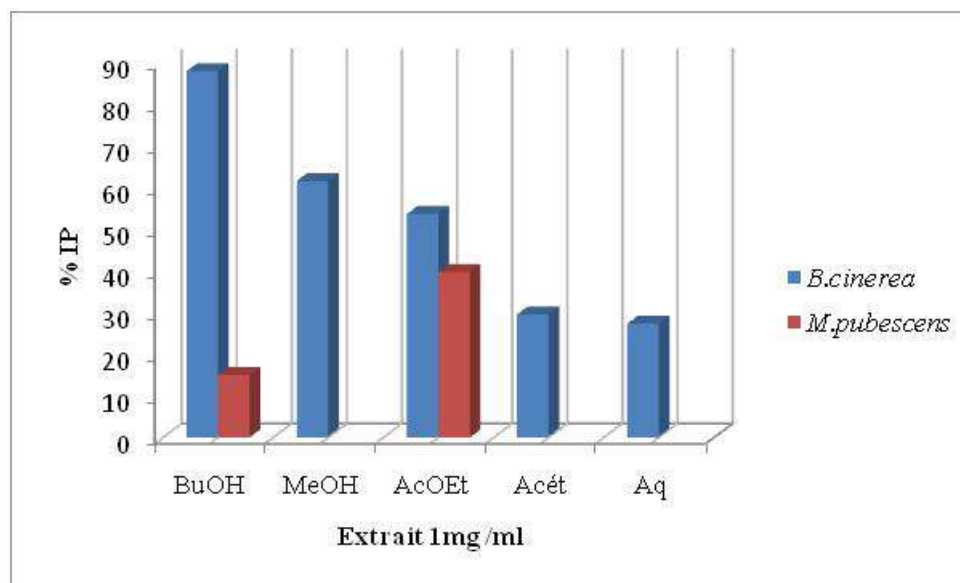


Figure 26: Histogramme de l'activité anti-radicalaire des extraits étudiés.

Du point de vue structurale, il est probable que les phénoliques supposés être présents dans ces échantillons n'ont pas le pouvoir de neutraliser les radicaux DPPH libres.

Bien qu'elles soient présentes, les substances phénoliques agissent de différents mécanismes avec les réactifs des tests estimant la capacité antioxydante.

Globalement, nous constatons que les composés de type flavonoïdes glycosylés contenus dans la première plante, sont doués d'un pouvoir antioxydant important, notamment dans l'extrait butanolique et celui de l'AcOEt. Leur activité antioxydante dépend, essentiellement, du nombre des groupements hydroxyles, leur position, et les substituants liés au squelette moléculaire.

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, nous avons calculé la concentration efficace à 50% d'inhibition des radicaux DPPH (EC50).

Pour des fins comparatives, l'acide ascorbique a été utilisé en tant qu'antioxydant standard. Son EC50 de l'ordre de 0.042 $\mu\text{g/ml}$, est déduite d'une courbe d'étalonnage, tracée pour cette raison, dans les mêmes conditions expérimentales.

III.4. Evaluation de l'activité antibactérienne

Les résultats des tests antibactériens des extraits préparés à partir de *B. cinerea* et de *M. pubescens* sont rassemblés dans le tableau 05 :

Tableau 05: Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits de *B. cinerea* (*B. c*) et de *M. pubescens* (*M. p*).

	<i>B. c</i>	<i>M. p</i>	<i>B. c</i>	<i>M. p</i>	<i>B. c</i>	<i>M. p</i>	<i>B. c</i>	<i>M. p</i>
BuOH	5.00±0.00	5.00±0.00	9.00±1.00	11.0±1.00	8.00±0.10	11.0±0.01	12.00±0.50	9.0±0.00
MeOH	5.00±0.00	5.00±0.00	8.33±0.88	5.00±0.00	8.00±0.10	5.00±0.00	10.00±1.00	5.00±0.00
Acét	5.00±0.00	5.00±0.00	7.00±0.00	5.00±0.00	7.00±0.01	5.00±0.00	8.33±0.00	5.00±0.00
AcOEt	5.00±0.00	7.00±0.00	7.00±0.00	5.00±0.00	7.00±0.01	12.33±1.00	7.66±0.88	5.00±0.00
Aq	5.00±0.00	5.00±0.00	7.66±0.88	5.00±0.00	7.00±0.01	5.00±0.00	7.00±0.00	5.00±0.00

La sensibilité marquée pour les espèces bactériennes, mentionnées sur le tableau 04, vis-à-vis de l'extrait butanolique de *B. cinerea* est peut être expliqué par la quantité remarquable en polyphénols que contient cet extrait par rapport aux autres. Ces constatation permettent de noter que l'effet antibactérien des cinq extraits varie presque dans le même sens que leur quantité en polyphénols.

Globalement, les résultats obtenus montrent que le pouvoir antibactérien n'est pas le même, sachant que la même concentration d'extrait est appliquée pour les quatre bactéries. On constate que l'inhibition de croissance bactérienne dépend de deux facteurs ; la bactérie utilisée, et la nature du produit testé.

Généralement, l'absence d'une zone d'inhibition ne signifie pas nécessairement l'inactivité de l'échantillon testé, parfois certains produit, qui diffusent plus lentement dans le milieu de culture (**Bensizerara et al., 2013**).

III.4.1. Détermination de CMI

L'activité antimicrobienne des extraits de deux espèces *B. Cinerea* et *M. Pubescens* a été évaluée sur des souches bactériennes Gram positive, Gram négative à l'aide de la méthode de diffusion en milieu solide afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI). Cette valeur est définie comme étant la concentration minimale d'extrait qui inhibe toute croissance visible après 24 heures d'incubation à 37°C.

Les résultats illustrés dans les figures 27 et 30 montrent que les extraits de deux plantes ont des activités antimicrobiennes de degrés variables contre des différents microorganismes testés. Les résultats obtenus dans la figure 27.



Figure 28 : Activité antimicrobienne de l'extrait BuOH vis-à-vis *S. aureus*.



Figure 29 : Activité antimicrobienne des extraits AcOEt et MeOH vis-à-vis *E. faecalis*

A la lecture des résultats obtenus, on remarque que les extraits de l'espèce *M. pubescens* ont été considérés comme des agents antibactériens modérés.



Figure 31 : Activité antimicrobienne de l'extrait AcOEt vis-à-vis *E. fecalis*.

D'après Toyang, (2012) et Holetz, (2002), les extraits ayant une CMI inférieure à 100 $\mu\text{g/ml}$ ont une bonne activité antibactérienne. Entre 100 et 500 $\mu\text{g/ml}$, on parlera d'une activité antibactérienne modérée. Entre 500 et 1000 $\mu\text{g/ml}$, l'activité antibactérienne est dite faible et enfin l'extrait est considéré comme inactif pour une CMI de plus de 1000 $\mu\text{g/ml}$.

En tenant compte de cette classification, notre étude confirme que les extraits de l'espèce *B. cinerea* et *M. pubescens* présentent de bonnes activités vis-à-vis une ou plusieurs souches. En outre, tous les extraits testés, ont été considérés comme des agents antibactériens modérés (CMI \leq 500 $\mu\text{g/ml}$).

D'après le travail de Bensizerara *et al.* (2013), l'extrait du n-butanol a été démontré une valeur de CMI (250 $\mu\text{g/ml}$) contre *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Dans notre étude le même résultat a été trouvé pour *S. aureus* néanmoins la bactérie *P. aeruginosa* possède une activité avec une CMI de 500 $\mu\text{g/ml}$.

Markouket *et al.* (1999) ont indiqué que l'extrait d'acétate d'éthyle de *B. cinerea* collectée depuis Zagora (Maroc) a présenté un effet antibactérien avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 200 $\mu\text{g/ml}$ vis-à-vis *P. aeruginosa*. Ce résultat est très proche de notre résultat dont l'extrait d'acétate d'éthyle présente une activité, vis-à-vis les mêmes microorganismes.

Cette différence de comportement des souches vis-à-vis des substances naturelles est due peut être à la différence de structures de la paroi des souches à gram positif et gram négatif et aussi selon la nature chimique des substances testées.

En conclusion, il est à noter que l'étude microbiologique et phytochimique, ont permis d'illustrer la potentialité bioactive des deux plantes étudiées. En effet, il est possible d'utiliser des préparations à base de ces plantes pour soigner des maladies d'origines bactériennes.

Conclusion



Conclusion

De nos jours, un grand nombre de plantes médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et en agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

Pour cela, notre contribution à la recherche de composés naturels biologiquement actifs a été réalisée. Elle vise la mise en évidence des activités antioxydante et antibactérienne de certains extraits préparés à partir des deux plantes *Brocchiacinerea* (Vis.) et *Matricariapubescens* (Desf.).

Les composés phénoliques ont été ciblés par les différentes extractions réalisées. Pour cet effet, des solvants de polarités différentes ont été employés, seuls ou mélangés avec de l'eau, tels que : MeOH/H₂O, BuOH, AcOEt.

Pour *B.cinerea* ont été préparés les extraits suivants : (MeOH, AcOEt, BuOH, Acétet, Aq) et pour *M.pubescens* ceux-ci BuOH et AcOEt. Chaque extrait a été caractérisé par sa couleur et son rendement, dont le taux le plus élevé est obtenu dans le cas de *B. cinerea* pour l'extrait Acét (17.3%) et pour l'extrait BuOH (3.12%) dans le cas de *M. pubescens*.

Les différents extraits contiennent des quantités variables de composés phénoliques confirmées par les résultats des dosages effectués sur eux. En effet, c'est la plante *M. pubescens* qui s'est montrée très riche en polyphénols totaux.

On a procédé à l'évaluation l'activité antioxydante *in vitro* des extraits. Les pourcentages d'inhibition dans le cas de *M. pubescens* variaient de 15.04% à 39.82 %. Par la méthode FRAP, les valeurs dépassent 170 µg EAA/ mg,

Les extraits bruts de deux plantes ont été testés *in vitro*, par la méthode de diffusion à partir d'un disque solide pour leur pouvoir inhibiteur

Les résultats indiquent que les extraits testés possèdent une activité antimicrobienne, plus au moins importante, sur toutes les souches testées. Les CMI obtenues sont de l'ordre de 125 µg/ml pour l'extrait BuOH de la plante *M.pubescens* contre d'*E. cloacae*, et de 250 µg / ml l'extrait AcOEt et MeOH de *B. cinerea*.

Notons enfin que ce travail nous a permis d'avoir une bonne expérience dans le domaine de la phytochimie, en termes de préparation d'extraits à base de plantes et de maîtrise des techniques de dosage spectrophotométrique. Pareillement, cette étude a étendu nos connaissances aux applications de la microbiologie pour la recherche de substances naturelles bioactives.

À la suite de ces résultats, il serait donc intéressant d'étendre l'éventail des tests antioxydants et antimicrobiens ainsi que l'isolement et la caractérisation des composés actifs dans les différents extraits en vue d'identifier les différentes molécules responsables des différentes activités biologiques de ces plantes.

Notre contribution va ouvrir des horizons de recherche très ciblés dans le domaine des plantes utilisées en médecine traditionnelle dans les zones arides.

Références

bibliographiques

- Abdenbi A, Abdelwahed D, Bouaaza M & Touati B., 2014.** Screening phytochimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de *cotulacinerea*(gartoufa) dans la region de bechar. 2(2) :49-54.
- Abedini A, 2013.** Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens*Poit. (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes. Thèse de docteur en Pharmacognosie., Université Lille Nord De France. P : 53,54.
- Achat S, 2013.**Polyphénols de l'alimentation : Extraction, pouvoir antioxydant et interaction avec des ions métallique. Thèse de docteur en Sciences Alimentaires., Université A. Mira-Bejaia.P 22.
- Alyafi Alzhri. G., 2007.** Determination of chemical composition of Prangos and the possibility to use in the applied field, Damascus University. P 54.
- Amirat M, Debbakh O, et Naghmouche Salah A, 2006.** Analyse qualitative de quelques produits chimiques contenus dans la plante (*Matricaria pubescens*), Mémoire de DES, Université de Ouargla, p. 67.
- Anderson, C.M., Hallberg, A., Hogberg, T. ,1996.** Advances in development of pharmaceutical antioxidants. *Adv. Drug. Res*, 28 : 65-180
- Apel K, Hirt H, 2004.**Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction,*Annu. Rev. Plant Biol*, 55:373–399.
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M., Gazin, M., 1996.**Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim. Forsch.* 46 1086-1089.
- Barlow, S.M. ,1990.** "Toxicological aspects of antioxidants used as food additives." *Ed.Hudson, B.J.F, Food Antioxidants*: 253-307.
- Belyagoubi N, 2012.** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien.THÈSE de docteur en Biologie ., Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen. P : 8, 9,11.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F.R., Ortuno, A., Del Rio, J.A. ,1997.** Uses and properties of *Citrus* flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 45 : 4505–4515.
- Bensizerara D, Menasria T, Melouka M, Cheriet L and Chenchouni H., 2013.** Antimicrobial Activity of Xerophytic Plant (*Cotulacinerea*Delile) Extracts Against Some Pathogenic Bacteria and Fungi. 6(4) : 266 – 271.

- Bensizerara D., Menasria T., Melouka M., Cheriet L. & Chenchouni H., 2012.** Antimicrobial activity of xerophytic plant (*Cotulacineae* Delile, 1831) extracts against some pathogenic bacteria and fungi. *Asian Pac J Trop Biomed*, 1-5.
- Boutlelis D. A., 2014.** Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L. Thèse de docteur En Biologie Végétale., Université Badji Mokhtar - Annaba.
- Bouziane M., 2002.** Caractérisation structurale de quelques molécules organiques dans la plante: *Cotulacineae* de la région d'Ouargla. Mémoire magister en Chimie Organique Faculté des Sciences et Sciences de l'ingénieur. Université d'Ouargla (Algérie).
- Bruneton, J., 1999.** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales. 3ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.
- Chouikh A, Chefrou A., 2014.** Seasonal, biometric and dynamic monitoring of the *Shihia* plant *Cotulacineae* Del (1831) and its accompanying plants in the Saharan region Oued-Souf (south-east of Algeria). 3(7) :826-833.
- Cotelle N., Bernier J.L., Catteau J.P., Pommery J., Wallet J.C. & Gaydou E.M., 1996.** Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medicine*. 20:35-43.
- Cowan, M.M., 1999.** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol Re*, 12(4): 564-582.
- Dendougui H, Seghir S, Jay M, Benayache F, Benayache S., 2012.** Flavonoids from *Cotulacineae* Del. *Int J Med Arom Plants*; 2(4): 589-595.
- Djellouli M, Benmehdi H, Mammeri S, Moussaoui A, Ziane L, Hamidi N., 2015.** Chemical constituents in the essential oil of the endemic plant *Cotulacineae* (Del.) from the southwest of Algeria. *Asian Pac J Trop Biomed*; 5(10): 870-873.
- El Gharras, H., 2009.** "Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review." *International Journal of Food Science and Technology* 44(12): 2512-2518.
- EL kalamouni C, 2010.** Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse Pour l'obtention du Docteur en Sciences des Agroressources., Université De Toulouse. P 58, 59, 70.
- Evans, R.J. et Reynhout, G.S., 1992.** "Alternates to synthetic antioxidants." *Food Science and Human Nutrition*, 29: 27-42.

- Garcia-Ruiz A., Bartolomé B., Martinez-Rodriguez A.J., Pueyo E., Martin-Alvarez P.J., and Moreno-Arribas M.V. ,2008.** Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*.19:835–841.
- Gherbouj O, Benkiki N, Seguin E, F., 2012.**Tillequin, Z. Kabouche., *journal chemistry of natural compounds*3, 470-471.
- Guinoiseau E, 2011.** Molécules antibactériennes issues d’huiles essentielles : séparation, identification et mode d’action. Thèse de doctorat en Biochimie - Biologie moléculaire. Université De Corse. P : 5.
- HadjMahammed M., 1996.**Thèse de doctorat, USHTB, Alger.
- Halliwell, B. ,1995.** "Antioxydantcharacterisation."*Methodology and mechanism, 49:* 1341-1348.
- Hart T., Shears P. 2002.** Atlas de poche de Microbiologie Flammarion Médecine Sciences. Paris. P.213.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F. , 2004.** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1: 3-6.
- HerziN, 2013.** Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l’extraction au CO₂-supercritique et des techniques conventionnelles.Thèsede docteur de enGénie Chimique-Procédés., Université de Toulouse.
- Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M. ,2002.** Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem. Biol. Interact*, 139: 1–21.
- Hudson, B.J.F, Food Antioxidants: 253-307.*
- Kempf S. Zeitouni. ,2009.** Coût biologique de la résistance aux antibiotiques: analyse et conséquences Pathologie Biologie : *article in press.*
- Khater F, 2011.** Identification Et Validation Fonctionnelle De Nouveaux Genès Potentiellement Impliqués Dans La Biosynthèse Des Composés Phénoliques.Thèse de docteur du centre international d’études supérieures en sciences agronomiques, P : 19.
- Krishnaiah D, sarbatly R, Nithyanandam R., 2011.**A review of the antioxidant potential of medicinal plant species, *Food and Bioproducts Processing*, 89 (3), 217-233.
- Lambin S., German A. 1969.** Précis de microbiologie. Tome 1.2ème Ed. Masson, Paris.
- Larhsini M, Markouk M, Jaouhari JT, Bekkouche K, Lazrek HB, Jana M., 2002.**The Antipyretic Activity of Some Moroccan Medicinal Plants. *Phytother Res*. 16: 97-98.
- Leong, LP., Shui, G., 2002.** An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem*, 76: 69-75.

- Lhuillier A, 2007.** Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: *Agauriasalicifolia* hook f exoliver, *Agauriapolyphliabaker* (ERICACEAE), *Tambourissatrichophyllabaker* (MONIMIACEAE) et *Embeliaconcinnabaker* (MYRSINACEAE). Thèse de doctorat Université de Toulouse. p 20-28-152-153.
- M.G. Albert, D. B. Rousselot, Z. Abedinzadeh, D. Jore., 2003.** Espèces réactives de l'oxygène : comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *Actualité chimique*, 91-96 Nov-Dec.
- Maataoui, B.S., Hmyene, A., Hilali, S., 2006.** Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*, 7(1): 3-8.
- Madi A, 2010.** Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Saugé) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister, Université Mentouri Constantine. P 18, 26.
- Maiza K, Brac de la Perrière RA, Hammiche V., 1993.** Pharmacopée traditionnelle saharienne: Sahara septentrional. 2nd proc of European Conf on Ethnopharmacology & 11th Int Conf Of Ethnomedecine. Heidelberg, France, p. 169-171.
- Makhloufi A, 2009.** Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Thèse de docteur en biologie, Université Aboubaker Belkaid. p : 14.
- Markouk M, Lazrek HB, Jana M., 1999.** Analgesic Effect of Extracts from *Cotulacinaerea* (L). *Phytother Res.* 13: 229-230.
- Michael. P, Murph. Y., Biochem. J., 2009.** How mitochondria produce reactive oxygen species. 417, 1-13.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000.** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*, 52: 673-839.
- Mogode D. J. 2005.** Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (Caesalpinaceae) utilisée dans le traitement des dermatoses au Tchad. Thèse de pharmacie, FMPOS,
- Mohammedi Z. 2006.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de Magistère de l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen.

- N.Benkiki., 2006.**"Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Rutamontana*,*Matricariapubescens* et *Hypericumperfoliatum*".Thèse doctorat .Université el hadj lakhderBatna ,p : 8,112-125.
- Ozenda P, 2004.** Flore et végétation du Sahara. 3^{ème} Ed. CNRS édition.750005 Paris, 92, 438,662.
- Prescott L.M., Harley J.P. & Klein D.A., 1995.**Microbiologie. De Boeck ed. p 1014.
- Quezel S. et Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertique méridionales. CNRS, Paris, 1168 p.
- R. Haigh., 1986.**Safety and necessity of antioxidants: *EEC approach, Food and Chemical Toxicology*, 24 (10-11), 1031-1034.
- Rezaire A, 2012.** Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpusbataua (patawa)*. Thèse pour le doctorat en Phytochimie. P : 63.
- Ribéreau-Gayon P. ,1968.** Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris 254 pp.
- Routray, W., Orsat, V., 2011.***Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review*. Food and Bioprocess Technology. 1-16.
- Schofield P ., Mbugua D-M ., Pell A N.(2001).**Analyses of condensed tannins: a review *.Animal Food and Technology*, 91:21-40.
- Teixeira L.M., Carvalho M., DA Siqueira G., Facklam R.R. 2007.** Enterococcus. In P. R. Murray (Ed.), Manual of Clinical Microbiology, pp : 430-442.
- Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L., Hawkins Byrne D., 2006.***J. Food CopositionAnd Analysis*, 19.
- Toure D, 2015.** Etudes Chimique Et Biologique Des Huiles Essentielles De Quatre Plantes Aromatiques Médicinales De Côte D'ivoire.Thèse pour le Docteur En Biochimie., Université Félix HOUPHOUËT- BOIGNY. P: 20, 21.
- Trouillas P., Calliste C.A., Allais D.P., Simon A., Marfak A., delage C. &Duroux J.L., 2003.**Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen plant extracts used in the Limousin countryside as herbel tea. *Food and chemistry*. 3: 399-407.
- Tsimogiannins, D.I., Oreopoulou, V. ,2006.** The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovat Food SciEmerg Tech*, 7: 140-146.
- U.D. Chavan, F. Shahidi and M. Naczk., 2001.**Extraction of condensed tanins from beach pea (*Lathyrusmaritimus* L.) as affected by different solvents.*J. Food Chem*. Vol. 75. 509-512.

- Van Acker, S., van Balen, G.P., van den Berg, D.J., van der Vijgh, W.J.F., 1996.** Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem. Pharmacol*, 56 : 935– 943.
- Yao, L.H., Jiang, Y.M., SHI, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S., 2004.** Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr*, 59 : 113-122.
- Zhao T, 2014.** Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques et médicinales oubliées ou sous-utilisées de Midi-Pyrénées (France) et Chongqing (chine). Thèse de docteur En Sciences des Agroressources., Université De Toulouse. P : 14.

Résumé :

Le travail effectué constitue une contribution à la mise en évidence des activités biologiques des deux espèces *Matricariapubescens* (Desf.) et *Brocchiacinerea* (Vis.)

Pour cela, nous avons ciblé leurs composés phénoliques par différents types d'extractions. En effet, cinq extraits sont préparés pour *B.cinerea* et deux pour *M. pubescens*.

L'analyse quantitative a permis de doser dans ces extraits les composés phénoliques totaux, les flavonoïdes et les tanins. Celle-là a révélé que *M. pubescens* est très riche en polyphénols totaux avec 261,60 µg EAG/mg ext.

La mise en évidence et l'évaluation de l'activité antioxydante par les tests de DPPH et FRAP, ont révélé des pouvoirs antiradicalaires variables pour les extraits testés avec des valeurs comprises entre 15.04% et 88.13%. Pareillement, le pouvoir réducteur des échantillons testés a été plus au moins important dont les valeurs les plus significatives sont : 170 et 418,88 µg EAA/ mg, pour respectivement, *M. pubescens* et *B. cinerea*.

Les tests microbiologiques effectués dans ce travail ont montré un effet antimicrobien appréciable des plantes *M. pubescens* et *B.cinerea* sur les souches microbiennes testées: *Staphylococcus aureus* Gram+, *Pseudomonas aeruginosa* Gram-, *Enterobacter cloacae* Gram-, *Enterococcus faecalis* Gram+.

Mots clés : Plantes médicinales, *Brocchiacinerea*, *Matricariapubescens*, extraction, activité antimicrobienne, activité antioxydante, polyphénols.

Abstract

The work done is a contribution to the identification of biological activities of both species *Matricariapubescens* (Desf.) and *Brocchiacinerea* (Vis.).

For this, we have targeted their phenolic compounds by different types of extractions. Indeed, five extracts are prepared for *B. cinerea* and two for *M. pubescens*.

Quantitative analysis has assayed in these extracts total phenolics, flavonoids and tanins. This one revealed that *M. pubescens* is very rich in total polyphenolics with 261,60 µg EAG / mg ext.

The highlighting and evaluation of the antioxidant activity by DPPH and FRAP tests, revealed varying anti-radical powers for tested extracts with values between 15.04% and 88.13%. Similarly, the reducing power of the tested samples was most to least important of which the most significant values were 170 and 418.88 µg EAA / mg, respectively for *M. pubescens* and *B. cinerea*.

In this study, microbiological tests showed a significant antimicrobial effect of both plants *M. pubescens* and *B. cinerea* on tested bacterial strains: *Staphylococcus aureus* Gram+, *Pseudomonas aeruginosa* Gram-, *Enterobacter cloacae* Gram-, and *Enterococcus faecalis* Gram+.

Key words: Medicinal plants, *Brocchiacinerea*, *Matricariapubescens*, extraction, antimicrobial activity, antioxidant activity, polyphenol.

المخلص :

العمل المنجز عبارة عن مساهمة في تحديد النشاط البيولوجي لكل من *Matricariapubescens* (Desf.) و *Brocchiacinerea* (Vis.).

لأجل ذلك استهدفنا المركبات الفينولية بطرق استخلاص متنوعة. فحضرنا خمسة مستخلصات من نبتة *B. Cinerea* واثنتين لـ *M. pubescens*.

التحليل الكمي سمح لنا بتقدير الفينولات الكلية في هذه المستخلصات، وكذا كمية الفلافونيدات والعفص. فأظهرت أن *M. pubescens* غنية بالفينولات الكلية حيث قدرت كميتها بـ 261.63 µg EAG / mg ext.

اثبات و تحديد النشاط المضاد للأكسدة عن طريق الاختبارين DPPH وFRAP، كشف أن للمستخلصات قدرة تثبيط للجذور الحرة محصورة بين 15.04% و 88.13%. وبالمثل، أظهرت أن للعينات المدروسة قدرة مهمة على ارجاع الحديد قدرت بـ 170 و 418.88 µg EAA / mg في نبتة *M. pubescens* و *B. cinerea* علالتوالي.

أما فيما يخص الاختبار الميكروبيولوجي فقد أظهرت وجود تأثير ذي قيمة للنبتين *M. pubescens* و *B. cinerea* على السلالات الميكروبية المختبرة: *Staphylococcus aureus* Gram+, *Pseudomonas aeruginosa* Gram-, *Enterobacter cloacae* Gram-, *Enterococcus faecalis* Gram+.

الكلمات الدالة: النباتات الطبية، *Brocchiacinerea*، *Matricariapubescens*، استخلاص، نشاط مضاد الميكروبات، النشاط المضاد للأكسدة، البوليفينول.