



Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources

Effet de la méthode d'extraction sur la teneur en polyphénols, flavonoïdes, et les activités biologiques d'une plante aromatique et médicinale: *Rhamnus alaternus*

Présenté par :

- JANATI HOUDA

Encadré par :

- Dr. ZEOUK IKRAME

- Pr. EL-GUENDOZI SOURAYA

Soutenu le : 05/07/2022

Devant le jury composé de :

- Dr. ZEOUK IKRAME
- Pr. EL-GUENDOZI SOURAYA
- Pr. BOUCHAMMA ELOUAZNA

Année universitaire
2021/2022

Faculté des Sciences et Techniques Fès

B.P. 2202, Route d'Imouzzer FES

☎ 212 (35) 60 80 14 – 212 (35) 60 96 35

✉ 212 (35) 60 82 14

www.fst-usmba.ac.ma

DEDICACE

Je dédie mon travail à :

Mes très chers parents,

Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur vos sacrifices, de l'amour et de l'affection dont vous n'avez jamais trouvé cessé de m'entourer toutes au long de ces années d'études. J'espère que vous trouvez dans ce travail un vrai témoignage de mon profond amour et éternelle reconnaissance.

Mes sœurs, et mon frère

Ma tante JALILA et mon modèle dans la vie, pour leurs précieux encouragements et Pour se tenir à côté de moi jusqu'à la fin de ce travail.

Ma chère amie HAJAR, à qui je souhaite bonne chance pour sa soutenance.

Tous mes chers amis,

Pour tous les instants inoubliables, que j'ai passés avec vous, je vous remercie Fayrouz et Hassania,

A tous ceux qui m'aiment,

A tous ceux que j'aime,

Remerciements

Je remercie DIEU tout puissant, maître des cieux et de la terre, qui m'a permis de mener à bien ce travail.

Tout d'abord je tiens surtout à adresser mes plus vifs remerciements à mon encadrante Dr. **ZOUEK IKRAME**, responsable de laboratoire de l'industrie pharmaceutique à l'Agence Nationale des Plantes Médicinales et Aromatiques qui m'a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, pour sa grande patience, pour sa disponibilité, son dynamisme, son soutien, ses conseils et sa confiance judicieux qui m'ont permis de mener à bien ce travail

Je remercie vivement, Madame **EI-GUENDOZI SOURAYA** Professeur à la faculté des Sciences et techniques de Fès, pour son encadrement, ses remarques et conseils, tous très constructifs, m'ont beaucoup aidée.

Je remercie également Madame **BOUCHAMMA ELOUAZNA**, Professeur à la faculté des Sciences et techniques de Fès d'avoir accepté de juger ce modeste travail et participer au jury.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous les enseignants qui ont assuré ma formation. Je remercie aussi tous les personnels de l'agence nationale des plantes aromatiques et médicinales qui m'ont aidé à faire ce travail.

Je remercie toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.
Un grand merci à tous

Avant-propos

Organisme d'accueil : ANPMA

Mon stage s'est déroulé à l'AGENCE NATIONALE DES PLANTES MEDICINALES ET AROMATIQUES –TAOUNATE. Après ma rapide intégration, j'ai eu l'occasion de réaliser plusieurs tâches qui ont constitué une mission de stage globale. Lors des deux premières semaines, j'ai pris le temps d'observer et comprendre le déroulement et les étapes de l'extraction des plantes. Après j'ai effectué différentes méthodes d'extraction et distillation sur les plantes (*Rhamnus alaternus*), et aussi quelques activités biologiques.

1. Généralité sur l'ANPMA :

L'ANPMA (agence nationale des plantes médicinales et aromatiques) se situe environ 80 km au nord de la ville de Fès, dans la province de Taounate, est une agence qui a pour vocation tout ce qui concerne la filière des plantes médicinales et aromatiques et les produits naturels



Figure 1: Agence Nationale des Plantes Médicinales et Aromatiques (ANPMA) de TAOUNATE

2. Missions d'ANPMA :

- Effectuer et promouvoir des travaux de recherche/ développement.

- Organiser des séminaires, des conférences et des expositions dans les domaines des plantes médicinales et aromatiques, ainsi que dans les autres domaines utilisant les produits naturels.
- Valoriser et promouvoir des plantes médicinales et aromatiques, l'utilisation et l'intégration du produit naturel dans les différents secteurs socio-économiques par la création des pépinières de projets
- Etablir des relations de coopération avec les organismes nationaux et internationaux.
- Coordonner à l'échelle nationale les activités relatives aux plantes médicinales et aromatiques.

3. Activités d'ANPMA :

- Optimisation des techniques de ramassage, de culture, de récolte, de séchage et de conditionnement.
- Préparation et formation de nouveaux produits naturels à valeur ajoutée, destinés aux secteurs pharmaceutique, parfumerais, cosmétique, agro-alimentaire et chimique.
- Réalisation des études phytochimiques.
- Développement des prototypes d'équipements spécifiques à la nature des PMA.
- Promotion de la conservation, la valorisation, l'utilisation et l'intégration des produits naturels par la création des pépinières dans le cadre des projets de développement régional et / ou national relatif aux différents laboratoires.

❖ Laboratoire de recherche :

- Botanique
- biochimie
- Phytochimie
- Phytobiotechnologie
- pharmacologie
- industrie pharmaceutique
- bioactifs et molécule d'intérêt

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1: Classification botanique de <i>R. alaternus</i> L..... | 10 |
| Tableau 2 : Poids d'extrait sec et rendement correspondant des deux méthodes d'extraction des polyphénols et des flavonoïdes à partir de la plante <i>Rhamnus alaternus</i> | 21 |
| Tableau 3 : Teneur en flavonoïdes et polyphénols de <i>Rhamnus alaternus</i> dans différents extraits par sonication et par macération (mg EQ/ml)..... | 23 |
| Tableau 4 : Activité antioxydante exprimée par CI_{50} | 24 |
| Tableau 5 : Diamètre de zone d'inhibition des extraits sur <i>Staphylococcus aureus</i> en mm..... | 27 |

Listes des figures

| | |
|--|----|
| Figure 2 : Schéma illustrant la méthode de macération..... | 05 |
| Figure 3 : Schéma du montage d'hydrodistillation..... | 06 |
| Figure 4 : Schéma de l'extracteur Soxhlet..... | 07 |
| Figure 5 : Bain ultrasonique Branson..... | 07 |
| Figure 6 : <i>Rhamnus alaternus</i> L. (Penzig, 1902)..... | 10 |
| Figure 7 : Partie aérienne de <i>Rhamnus alaternus</i> L : (A-sèche, B- poudre)..... | 14 |
| Figure 8 : Agitation des solutions..... | 15 |
| Figure 9 : Filtration des extraits..... | 15 |
| Figure 10 : Evaporateur rotatif..... | 15 |
| Figure 11 : Sonication des extraits dans un bain d'eau | 16 |
| Figure 12 : Histogramme descriptive d'activité antioxydante des extraits..... | 25 |
| Figure 13 : Zone d'inhibition autour des puits contenant l'extrait à tester vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> | 26 |

Liste des abréviations

ANPMA : Agence nationale des plantes médicinales et aromatiques

R.alaternus : *Rhamnus alaternus*

PMA : plante médicinale et aromatique

min : Minutes

mm : Millimètre

PLE : Extraction par liquide pressurisé

ASE : Extraction accélérée par solvants

SWE : Extraction par eau subcritique

SFE : Extraction par fluide supercritique

MAE : Extraction assistée par microondes

°C : Degré Celsius

% : Pourcentage

h : Heure

CI50 : Concentration inhibitrice 50%

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

FCR : Folin-Ciocalteu.

I% : Pourcentage d'inhibition

NaCl : chlorure de sodium

R% : Rendement exprimé en %

DMSO: Dimethylsulfoxyde

E. coli: *Escherichia coli*

S.a : *Staphylococcus aureus*

DO : Densité optique.

Abs : Absorption

EAG: Equivalent en acide gallique

EQ : Equivalent en quercétine

ET: Ecart type

My : Moyenne

mg : Milligramme

ml : Millilitre

UV : Ultraviolet

Sommaire

| | |
|--|----|
| Introduction générale | 01 |
| Partie I: Synthèse bibliographique | 03 |
| 1. Procédés d'extraction des plantes..... | 04 |
| 1.1. Techniques classiques..... | 04 |
| 1.1.1. Macération..... | 04 |
| 1.1.2. Décoction..... | 05 |
| 1.1.3. Infusion..... | 05 |
| 1.2. Techniques conventionnelles..... | 05 |
| 1.2.1. Hydrodistillation..... | 06 |
| 1.2.2. Entraînement à la vapeur d'eau..... | 06 |
| 1.2.3. Extraction par Soxhlet..... | 06 |
| 1.2.4. Sonication..... | 07 |
| 1.2.6. Percolation..... | 08 |
| 1.3. Techniques innovantes..... | 08 |
| 1.3.1. Extraction par liquide pressurisé..... | 08 |
| 1.3.2. Extraction accélérée par solvants..... | 08 |
| 1.3.3. Extraction par eau subcritique..... | 08 |
| 1.3.4. Extraction par fluide supercritique..... | 09 |
| 1.3.5. Extraction assistée par microondes..... | 09 |
| 2. Généralité sur <i>Rhamnus alaternus</i> | 10 |
| 2.1. Classification..... | 10 |
| 2.2. Usage traditionnel..... | 11 |
| 2.3. Activités pharmacologiques..... | 11 |
| Partie II : Matériel et méthodes | 13 |
| 1. Matériel végétal..... | 14 |
| 2. Extraction..... | 14 |
| 2.1. Extraction par macération..... | 14 |
| 2.2. Extraction par sonication..... | 15 |
| 2.3. Calcul de rendement..... | 16 |
| 3. Criblage phytochimique..... | 16 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1. Dosage des polyphénols..... | 16 |
| 3.2. Dosage des flavonoïdes..... | 17 |
| 4. Activité antibactérienne..... | 17 |
| 4.1. Méthode de diffusion par puits..... | 17 |
| 4.2. Souche bactérienne et conditions de culture | 17 |
| 4.3. Activité antibactérienne..... | 18 |
| 5. Activité antioxydante..... | 19 |
| Partie III : Résultats et discussion..... | 20 |
| 1. Rendement..... | 21 |
| 2. Criblage phytochimique..... | 22 |
| 3. Activité antioxydante..... | 24 |
| 4. Activité antimicrobienne..... | 26 |
| Conclusion et perspectives..... | 29 |

Introduction générale

Les plantes médicinales sont en général le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (Abd et al., 2021). Ces molécules présentent un intérêt parce que la résistance aux antibiotiques est devenue un problème de santé publique. La valorisation des plantes médicinales en vue d'exploiter leurs extraits ou leurs principes actifs représente donc un potentiel économique énorme.

Ainsi, les métabolites secondaires des extraits de plantes ont suscité ces dernières années un intérêt accru comme source potentielle de molécules naturelles bioactives pouvant constituer une alternative aux produits de synthèse. A titre d'exemple, les polyphénols sont doués de multiples vertus thérapeutiques, ils jouent un rôle très important, principalement, dans la lutte contre les cancers, les maladies cardiovasculaires et la peroxydation lipidique. Expliquant de ce fait leur grande utilisation dans la fabrication des médicaments. Ils interviennent aussi dans la protection des plantes contre les différentes attaques microbiennes (surtout fongiques) risquant de causer la perte d'une grande quantité de végétation (Sahraoui Amel et Sadki Amel, 2019).

Cependant, l'évaluation des propriétés pharmaceutique, antioxydante et antimicrobienne demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connue dans la médecine traditionnelle. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs (Abd et al., 2021).

Le genre *Rhamnus* (Rhamnaceae) inclut des espèces végétales médicinales bien connue possédants diverses propriétés biologiques (Abd et al., 2021). C'est pour cette raison nous sommes intéressés à étudier l'espèce *Rhamnus alaternus* L, qui est utilisé en médecine traditionnelle pour valoriser ses propriétés médicinales et thérapeutiques.

R. alaternus une des plantes les plus utilisée dans le bassin méditerranéen, grâce à ses bienfaits, notamment dans le traitement des complications hépatique, contre la jaunisse et certaines affections dermatologiques (Sahraoui Amel et Sadki Amel, 2019). La qualité thérapeutique d'un extrait naturel est liée à l'efficacité et à la sélectivité du procédé d'extraction utilisé (Messaoudi et al., 2019). Dans ce cadre, l'objectif de la présente étude est d'avoir une étude comparative de deux techniques d'extraction de *R. alaternus*. La comparaison porte plus précisément sur le rendement d'extraction des métabolites visés, des tests phytochimiques

quantitatifs pour déterminer le taux des polyphénols ainsi que celui des flavonoïdes, et l'efficacité antibactérienne et antioxydante des extraits obtenus.

Après description de lieu de stage, nous avons adopté un plan classique pour la présentation du présent travail :

- **Partie I** : Synthèse bibliographique sur les différentes méthodes d'extraction (classiques, conventionnelles, innovantes), et la matière végétale étudiée, ses métabolites secondaires, en particulier les polyphénols et les flavonoïdes ainsi que ses propriétés pharmacologiques ;
- **Partie II** : Partie expérimentale, qui consiste à présenter les techniques expérimentales d'extraction, de la mise en évidence des flavonoïdes et polyphénols par le criblage phytochimique, du test antimicrobien et enfin du pouvoir antioxydant ;
- **Partie III** : Résultats et discussion ;

Et on finira par une Conclusion et l'ensemble des perspectives.

PARTIE I: SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

Partie I: Synthèse bibliographique

La présente partie est une synthèse bibliographique permettant de définir les différents termes abordés dans ce sujet. Dans un premier chapitre, nous présenterons un aperçu des connaissances concernant les procédés d'extraction des plantes et dans un deuxième chapitre, nous présenterons la plante étudiée (*Rhamnus alaternus*), sa classification, son usage traditionnel, et ses activités pharmacologiques.

1. Procédés d'extraction des plantes

L'extraction est une opération ancienne utilisée pour retirer des plantes et de certains organes d'animaux, des produits alimentaires, pharmaceutiques ou odoriférants, sous formes de breuvages, drogues ou parfums en utilisant différents solvants comme l'eau, les alcools, les solvants organiques et/ou chlorés, etc. Son principe repose sur le transfert d'un composé d'une phase à une autre ; d'une phase liquide à une autre phase liquide ou d'une phase solide à une phase liquide. En effet, le procédé d'extraction est basé sur la différence de solubilités des composés d'un mélange dans un solvant. Il existe plusieurs techniques d'extraction des composés de haute valeur ajoutée présents dans les plantes. Ces techniques peuvent être dites classiques, conventionnelles (utilisées depuis longtemps) et nouvelles (développées plus récemment)(Analytique & Bendia, 2020).

1.3. Techniques classiques :

1.3.1. Macération :

La macération consiste à laisser séjourner à froid (température ambiante) un solide dans un liquide pour en extraire les constituants solubles dans ce liquide (**Figure 2**). C'est une méthode d'extraction des principes actifs ou des arômes d'un corps solide par dissolution dans un liquide froid (eau, huile, alcool, saumure...)(Nadjla et Président, 2020). La macération peut aussi être employée pour que le corps solide absorbe le liquide et en soit parfumé. Alors c'est une extraction qui se fait à température ambiante et qui a l'avantage de préserver les substances thermosensibles. En tenant en compte que la macération se fait par dissolution d'espèces chimiques dans un liquide jouant le rôle de solvant, il est donc nécessaire que les espèces chimiques y présentent une solubilité suffisante pour que le transfert puisse se faire. A la fin du processus il est nécessaire de retirer du solvant les résidus solides, ils sont en général éliminés par filtration.

/

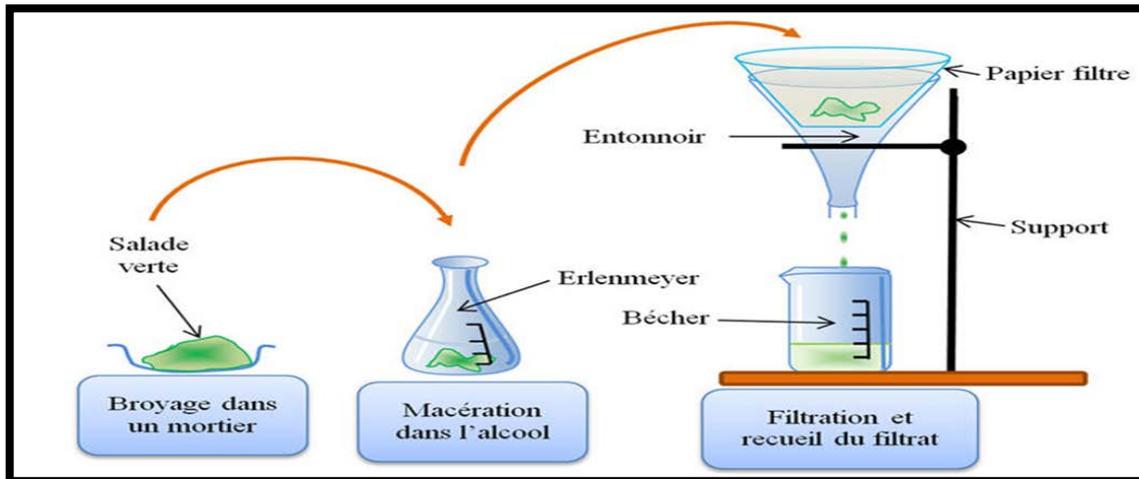


Figure2 : Schéma illustrant la méthode de macération

1.1.2. Décoction:

Elle convient pour l'extraction de matières végétales dur ou très dur : bois, écorce, racines, ou des plantes avec des constituants peu solubles. Elle consiste à faire bouillir les plantes fraîches ou séchées dans de l'eau pendant 10 à 30 min, pour bien extraire les principes médicinales (Nadjla et Président, 2020). Mais cette méthode ne peut s'appliquer à tous les principes actifs car la montée en température pourrait les dégrader ou les modifier. Il faut que les substances extraites ne soient pas thermolabiles, c'est à dire non sensibles à la chaleur.

1.1.3. Infusion:

L'infusion est une méthode d'extraction des principes actifs ou des arômes d'un végétal par dissolution dans un liquide initialement bouillant qui se refroidit. Après cette opération, le produit est filtré pour obtenir un infusé (Nadjla et Président, 2020).

1.2. Techniques conventionnelles :

Parmi de nombreuses techniques d'extraction, l'extraction par solvants organiques est la méthode la plus conventionnelle et également la plus utilisée.

1.2.1. Hydrodistillation :

Cette méthode consiste à distiller un composé par entraînement à la vapeur d'eau ; la plante se trouve dans un réacteur où elle est en contact direct avec l'eau bouillante (**Figure 3**). Selon la densité ou la quantité de la plante utilisée, elle peut flotter ou être complètement immergée dans l'eau. Elle est généralement conduite à pression atmosphérique. Le chauffage permet l'éclatement et la libération des molécules volatiles contenues dans la matière végétale (**Sabrina Bendia, 2020**).

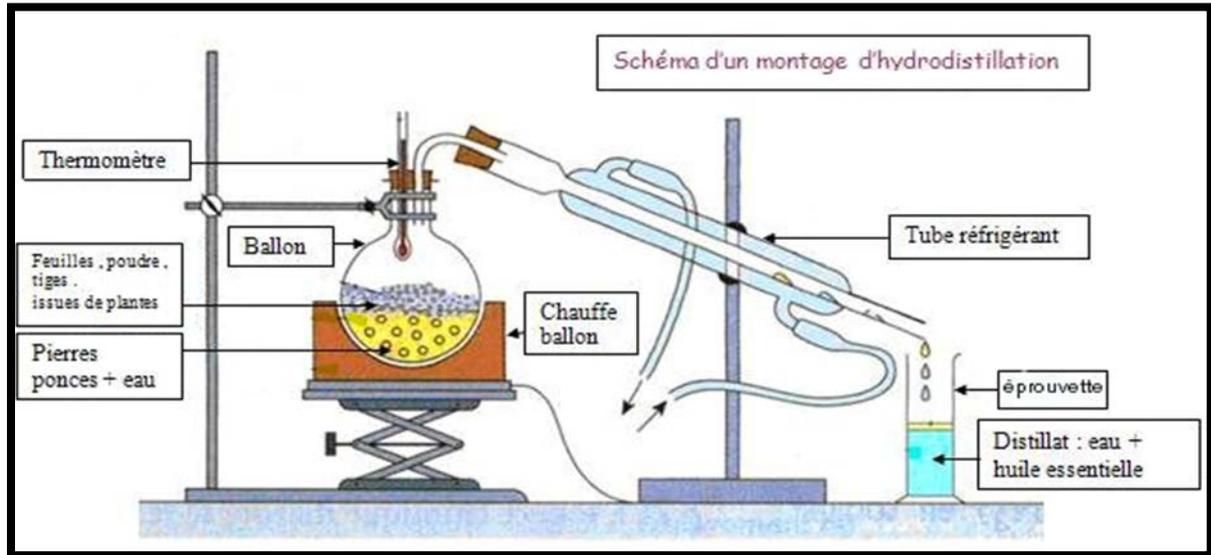


Figure 3 : Schéma du montage d'hydrodistillation

1.2.2. Entraînement à la vapeur :

C'est le moyen le plus répandu pour extraire les molécules volatiles des PAM. Le matériel végétal n'est pas en contact avec l'eau, mais la vapeur d'eau produite par une chaudière est injectée et traverse la matière végétale de bas en haut, éclate les cellules et entraîne les molécules volatiles

1.2.3. Extraction par Soxhlet :

C'est un appareil qui porte le nom de son inventeur Franz Von Soxhlet, il permet l'extraction à chaud d'un solide par un solvant. Les extraits prélevés seront traités avec un évaporateur rotatif pour éliminer toutes les traces des solvants d'extraction.

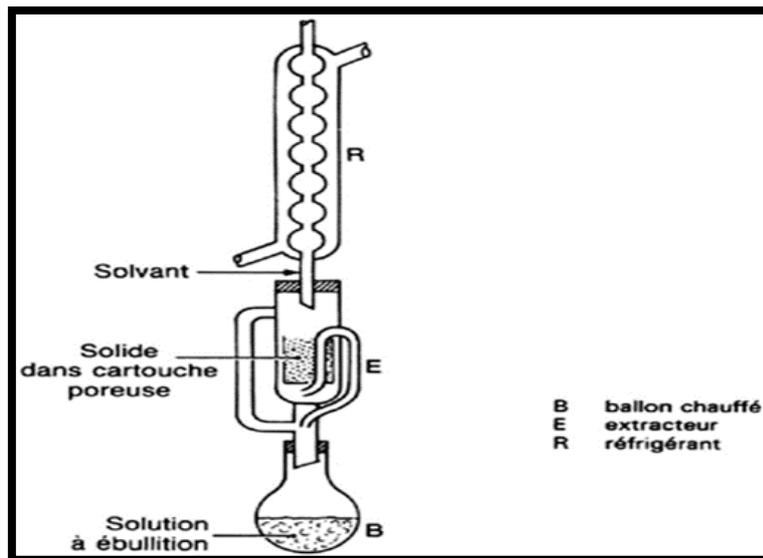


Figure 4 : Schéma de l'extracteur Soxhlet

1.2.4. Sonication :

Il s'agit d'une méthode d'intensification du processus qui libère des composants bioactifs. Elle consiste à détruire les cellules par les ultrasons qui sont des ondes de même nature que le son mais dont la gamme de fréquence se situe entre 20 kHz et plusieurs centaines de mégahertz. Cette gamme est trop élevée pour que l'oreille humaine puisse la percevoir. La sonication est réalisée à l'aide d'un appareil appelé sonicateur qui permet de transformer l'énergie électrique en vibration mécanique longitudinale le long d'une sonde. Cette dernière permet de casser les cellules biologiques en suspension. Il est indispensable de travailler à basse température et d'effectuer des pauses entre les cycles de sonication afin d'éviter la surchauffe de l'échantillon, ou par le bain ultrasonique.



Figure 5 : Bain ultrasonique Branson

1.2.5. Percolation :

Elle consiste à faire passer lentement un solvant à travers une couche de substance finement pulvérisée, habituellement contenue dans une cartouche de papier poreux et épais ou une pochette de papier filtre (**Sabrina Bendia, 2020**).

1.3. Techniques innovantes :

1.3.1. Extraction par liquide pressurisé (PLE, Pressurized Liquid Extraction) :

C'est une extraction solide liquide sous pression, dans ces conditions, le solvant reste liquide au-delà de son point d'ébullition sous pression atmosphérique. Cela permet alors de travailler à des températures plus élevées et donc de diminuer considérablement le temps d'extraction. Les solvants d'extraction utilisés en PLE sont hexane, méthanol, éthanol...ect. L'eau peut aussi être utilisée (**Triaux, 2019**).

1.3.2. Extraction accélérée par solvants (Accelerated Solvent Extraction – ASE) :

C'est une technique qui utilise les solvants conventionnels à des températures (50 – 200 °C) et des pressions 100 – 150 bar) élevées. La pression est maintenue assez élevée pour maintenir le solvant à l'état liquide à température élevée. Pendant l'ASE, le solvant reste toujours en dessous de ses conditions critiques. Les avantages de cette technique devant les techniques conventionnelles sont les suivants : on évite les échauffements locaux et on consomme de plus petites quantités de solvant en comparaison à l'extraction par Soxhlet et par batch avec agitation. Ses inconvénients sont liés à sa non-sélectivité, ce qui impose des procédures supplémentaires de nettoyage des extraits. Les températures opératoires élevées peuvent mener à une dégradation des solutés thermolabiles (**P.I.Penchev, 2010**).

1.3.3. Extraction par eau subcritique (SWE, Subcritical Water Extraction) :

La SWE est une variante de l'extraction accélérée par solvant (ASE) dans laquelle de l'eau chaude est utilisée à des températures comprises entre 100°C (point d'ébullition de l'eau) et 374.1°C (point critique de l'eau), et c'est sous l'effet de fortes pressions que l'eau est maintenue sous sa forme liquide. L'eau à température ambiante est un solvant polaire. Cependant, lorsque l'eau est chauffée dans une atmosphère pressurisée à des températures de l'ordre de 250-300°C, sa polarité diminue. Ainsi la SWE permet l'extraction de molécules moyennement polaires à non polaires sans utiliser de solvants organiques. De plus, une augmentation de la température permet une meilleure pénétration de la matrice et une meilleure solubilisation des analytes dus à la diminution de la viscosité et des tensions de surface (**Michel, 2011**).

1.3.4. Extraction par fluide supercritique (SFE, Supercritical Fluid Extraction) :

L'état supercritique d'un composé organique pur est atteint lorsque celui-ci est placé dans des conditions de pression et de température supérieures aux valeurs de ses points critiques. Au-delà de ces valeurs le fluide est dit supercritique et possède des propriétés à la fois proche d'un gaz et d'un liquide qui vont être intéressantes pour l'extraction de molécules à partir de matière végétale. De plus, l'extraction peut être hautement sélective car il est possible de moduler le pouvoir solvant du fluide supercritique en modifiant les valeurs de pression et/ou de température. La SFE est principalement utilisé avec le CO₂ supercritique, car celui-ci est peu coûteux (sous-produit de l'industrie), non-inflammable, largement présent dans l'atmosphère, facile à éliminer et nécessite des conditions critiques faciles à atteindre. Pendant le processus d'extraction, le fluide est pompé de manière continue à travers l'échantillon, et libère ainsi les composés d'intérêt qui sont récupérés sous forme concentrés après une étape de dépressurisation qui élimine le CO₂ sous forme gazeuse (Michel, 2011).

1.3.5. Extraction assistée par microondes (MAE, Mcrowaves-Assisted Extraction) :

La mise en place de l'extraction assistée par microondes (MAE) est similaire à l'UAE, elle ne diffère seulement par la nature des ondes envoyées sur l'échantillon. En effet les microondes de la MAE ont une fréquence entre 300 MHz et 300 GHz. Le phénomène physique de l'extraction n'est alors pas le même. L'énergie diffusée par les microondes va permettre de chauffer le solvant d'extraction au contact de la matière végétale, solubilisant ainsi les composés d'intérêt dans le solvant. La matrice solide peut elle aussi être sensible aux microondes, c'est alors elle qui sera chauffée préférentiellement ce qui conduira à la libération des substances à extraire dans le solvant (Triaux, 2019).

2. Généralité sur *Rhamnus alaternus*

Rhamnus alaternus est un arbuste ou arbrisseau dioïque persistant répandu dans les garrigues et les sous-bois de nos régions méditerranéennes, bien connu des méridionaux sous les noms d'alerne ou Nerprun alaterne (**Figure 5**). Il est démontré comme une importante espèce écologiquement adaptée dotée d'une grande diversité génétique. *R. alaternus* est une plante médicinale largement utilisée par la population marocaine, notamment dans la médecine traditionnelle.

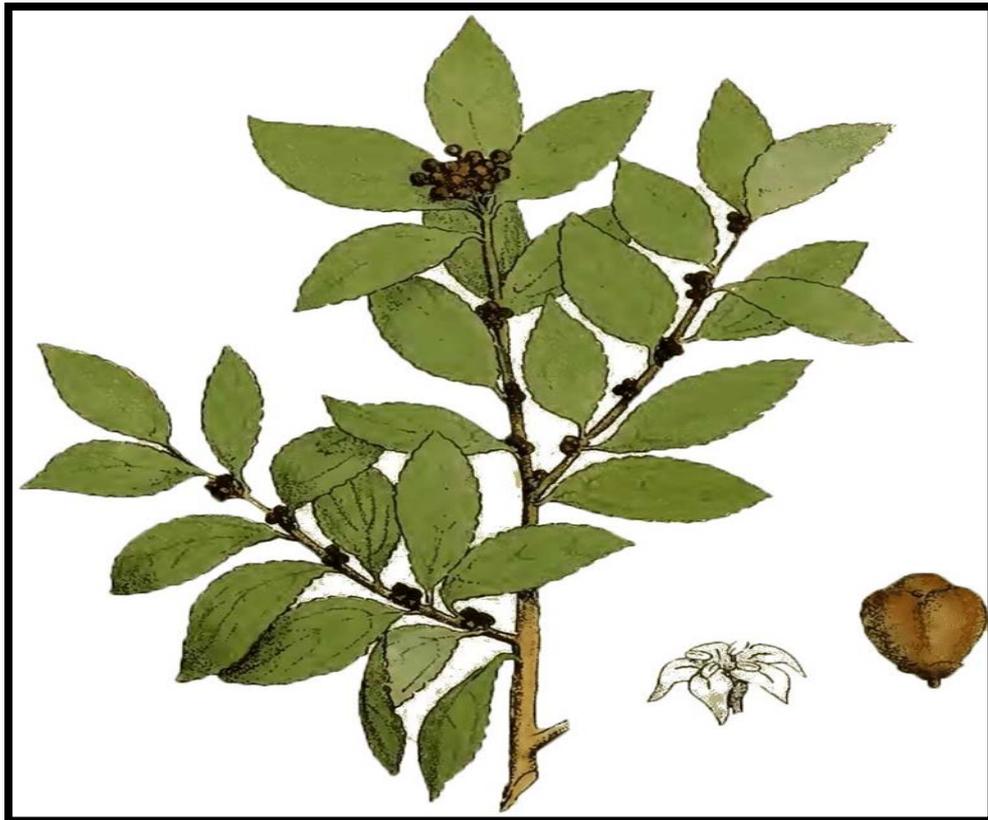


Figure 6 : *Rhamnus alaternus* L. (Penzig, 1902)

2.1. Classification :

Tableau 1: Classification botanique de *R. alaternus* L

| | |
|---------|--------------------------|
| Règne | Plantae |
| Classe | Magnoliopsida |
| Ordre | Rhamnales |
| Famille | Rhamnaceae |
| Genre | Rhamnus |
| Espèce | <i>Rhamnus alaternus</i> |

2.2. Usage traditionnel :

(Zeouk et al., 2021) ont révisé l'utilisation traditionnelle de *R. alaternus* et ils ont noté qu'en médecine traditionnelle cette plante a été utilisée depuis longtemps pour le traitement de diverses maladies. La littérature ethno pharmacologique que la décoction de sa partie aérienne a été utilisée par la population locale en Navarre Espagne comme agent antihypertenseur, l'infusion de la même partie a été largement utilisée pour abaisser l'hypertension artérielle à traiter l'hypercholestérolémie. De plus, une décoction rapide de la partie aérienne et les racines de *R. alaternus* ont été utilisées comme remèdes dépuratifs dans la même enquête ethnopharmacologique (Akerreta et al., 2007). Dans la médecine du Sud-Ouest algérien, la décoction de feuilles de *R. alaternus* est considérée comme un bon médicament pris par voie orale pour le traitement de l'hépatite (Benarba, 2016). Similaire, (Boudjelal et al., 2013) ont remarqué l'utilisation de *R. alaternus* par décoction de feuilles contre les maladies hépatiques. Pourtant, dans le centre-ville de Tlemcen (Algérie), l'infusion de feuilles de *R. alaternus* (Elyebdri et al., 2017) et sur le territoire de Fluminimaggiore, la décoction de son écorce a été utilisée pour traiter l'ictère qui a été rapporté depuis l'Antiquité dans le nord d'Israël. De plus, la décoction préparée à partir de la branche de ce plante a été prise par voie orale à jeun pour le traitement de troubles musculo-squelettiques. Les troubles gastro-intestinaux ont également été traités par les feuilles de *R. alaternus*. (Zeouk et al., 2021) ont montré que le cataplasme préparé à partir de feuilles de *R. alaternus* était largement utilisé par les populations du centre du Maroc pour traiter les infections cutanées. Au Nord-Est de l'Algérie, (Chermat et Gharzouli, 2021) ont également confirmé l'utilisation des feuilles et des fruits de cette espèce pour soigner les maladies de la peau en plus de l'amygdalite.

2.3. Activité pharmacologique

Dans la même revue rapportée par Zeouk et al (2019), l'ensemble des activités pharmacologiques de *R. alaternus* a été décrit comme suit :

- **Activité antioxydante :**

R. alaternus est connue par sa forte activité antioxydante. Ses feuilles contiennent de nombreuses composés bioactifs tels que les anthraquinones et les flavonoïdes (Ammar et al., 2009). Il a été démontré que ces composés jouent un rôle dans le mécanisme d'action antioxydant en raison de leurs structures (Huang et Frankel 1997 ; Montoro et coll. 2005). Par exemple, les flavonoïdes étaient considérés comme bons donateurs d'électrons et d'hydrogène, ce caractère apporte à la fin de la chaîne radicalaire en convertissant les radicaux libres et ROS à des composés plus stables (Kelly 2010). Dans une étude rapportée par (Ammar et al., 2018), un nouveau alaternoside (1,6 dihy droxy-3

méthyl 6 [2'-Me (heptoxy)] anthraquinone) et deux composés connus (physcion-8-O-rutinoside et kaempferol-7-methyl-lether) ont été isolés des feuilles et des racines de l'écorce de *R.alaternus* et ont montré une importante activité antioxydante avec une IC₅₀ de 9,46 µg/ml, 27,68 µg/ml et 2,35 µg/ml respectivement.

- **Activité antihyperlipidémique :**

L'hyperlipidémie est définie comme une augmentation de la concentration de cholestérol total qui peut ou non s'accompagner d'une élévation de la concentration des triglycérides (Nelson 2013). L'hyperlipidémie pourrait être un facteur de risque majeur pour le développement de maladies cardiovasculaires graves problème de santé publique (Burckhardt 2015). Dans une étude menée par (Tacherfout et al., 2018), l'extrait méthanolique de feuilles de *R. alaternus* a montré une bonne activité antihyperlipidémique grâce à une forte diminution des niveaux des lipides dans le sang (Zeouk et al., 2021).

- **Activité antimicrobienne :**

Actuellement, les microorganismes se développent et deviennent plus en plus résistants aux agents antimicrobiens. L'activité antimicrobienne de *R. alaternus* n'est pas beaucoup rapportée. Une étude de l'activité antibactérienne de neuf extraits et fractions des feuilles de *R. alaternus* ont montré que cette espèce présentait antibactérien puissant contre cinq pathogènes à Gram positif et les bactéries Gram négatif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 et *Salmonella typhimurium* NRRLB) qui causent de graves maladies et une altération des aliments. (Kolsalec et al., 2013) ont évalué le potentiel antimicrobien d'extrait méthanolique d'écorce de *R. alaternus* contre les bactéries, dermatophyte et des souches de levure, et ont démontré que tous les micro-organismes examinés étaient sensibles à des valeurs de CMI comprises entre 0,625 et 2,5 mg/ml, *R. alaternus* étaient plus efficaces contre le dermatophyte *Microsporum gypseum* et la levure *Candida albicans* (CMI = 0,625 mg/ml). Cette activité prometteuse pourrait s'expliquer par la richesse de l'écorce de *R. alaternus* en composés bioactifs (Zeouk et al., 2021).

PARTIE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Partie II : Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de feuilles de la plante *Rhamnus alaternus* récolté du moyen atlas central du Maroc.



Figure 7: Partie aérienne de *Rhamnus alaternus* L :

A : Sèche

B : Poudre

2. Extraction

2.1. Extraction par macération

La macération (extraction solide-liquide) est une opération qui consiste à laisser séjourner la matière végétale (broyat) dans le méthanol pour extraire les principes actifs. Techniquement, 10 g de la poudre des feuilles a été mise en macération dans 100 ml de méthanol (ratio 1 :10) sous agitation continue (500 rpm) à température ambiante pendant 24 heures (**Figure 8**). Le mélange résultant a été filtré par du papier filtre Whatman N°1 (**Figure 9**), ensuite le solvant utilisé a été éliminé par évaporation sous vide, à 40°C (**Figure 10**). L'extrait brut a été conservé dans un réfrigérateur à 4°C jusqu'à utilisation ultérieure (**Yeo et al., 2014**).



Figure 8 : Agitation des solutions



Figure 9 : Filtration des extraits

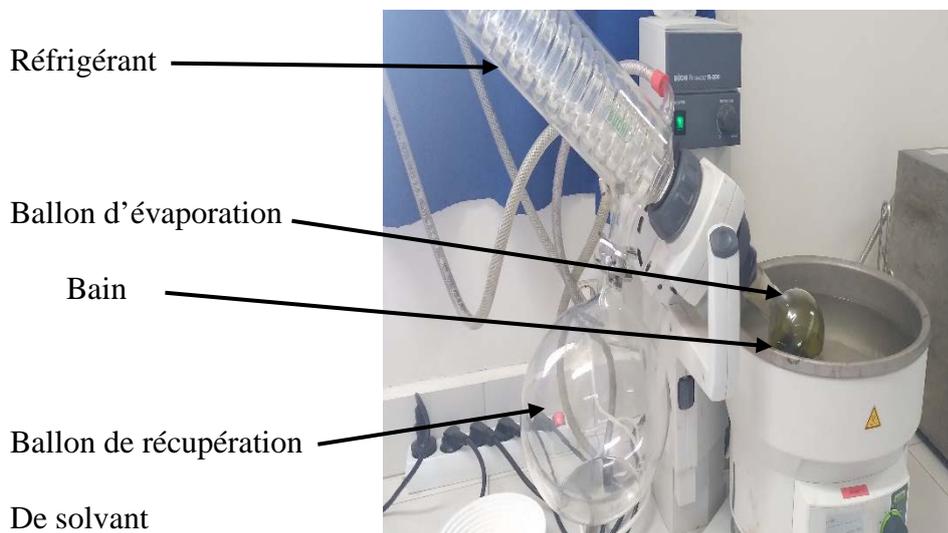


Figure 10 : Evaporateur rotatif

2.2. Extraction par sonication :

La méthode d'extraction de (Vinatoru et al., 1997) a été adoptée avec quelques modifications, pour ce faire, 10 g de chaque extrait ont été mis en solution avec 100 ml du méthanol, puis l'ensemble a été émergé dans un bain à sonication pendant 45 min à 30°C (Figure 11). Le mélange résultant a été filtré et conservé de la même manière que l'extrait macéré.



Figure 11 : Sonication des extraits dans un bain d'eau

2.3. Calcul du rendement

Le pourcentage de rendement pour chaque extrait (**Tableau 2**) a été déterminé par la formule suivante :

$$R (\%) = \frac{M}{M_0} \times 100$$

Avec :

R : Rendement en %

M: Masse en g de l'extrait brut sec

M₀ : Masse en g de la poudre de l'extrait

3. Criblage phytochimique :

3.1. Dosage des polyphénols :

Le dosage des polyphénols dans les deux extraits a été réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu (**Singleton et al., 1999**). Le protocole consiste à préparer 200 µl de chaque extrait (1 mg/ml) dans le méthanol et mis dans des tubes à essais ; puis 1.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (10%) ont été rajoutés dans chaque tube suivi d'une agitation vigoureuse, puis le mélange est laissé agir pendant 5 min à l'obscurité avant d'ajouter 1.5 ml de carbonate de sodium à 5%. Après 2 heures d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, les valeurs de DO sont déterminées par un spectrophotomètre UV-visible à 750 nm. Dans les mêmes conditions

opératoires, la gamme d'étalonnage par l'acide gallique a été réalisée. Toutes les mesures sont réalisées en triplicata. Les résultats sont exprimés en μg équivalent en acide gallique/ mg d'extrait.

3.2. Dosage des flavonoïdes :

L'estimation de la teneur en flavonoïdes contenus dans les deux extraits a été réalisée par la méthode de **(Bahorun et al., 1996)**. Techniquement, 0.5 ml de chaque extrait a été mis dans un tube à essai ; 0.1 ml de chlorure d'aluminium à 10 %, 0.1 ml de potassium d'acétate (1M) ainsi que 4.3 ml d'eau distillée ont été rajoutés, après une agitation du mélange les tubes sont incubés pendant 30 min à température ambiante. Les DO ont été lus par un spectrophotomètre UV-visible à 415 nm. Dans les mêmes conditions opératoires, la gamme d'étalonnage par la quercétine a été réalisée. Toutes les opérations sont réalisées en triplicata. Les résultats ont été exprimés en μg équivalent en quercétine/ mg d'extrait.

4. Activité antibactérienne :

4.1. Méthode de diffusion par puits :

Cette méthode permet de mettre en évidence l'effet antibactérien des extraits testés sur les souches bactériennes, ainsi que la détermination de la résistance où la sensibilité de ces souches vis-à-vis des différents extraits **(Essawi and Srour, 2000 ; Bssaibis et al. 2009)**. Le test d'évaluation de l'activité antibactérienne des deux extraits obtenus par macération et par sonication a été réalisé pour vérifier également s'il y a une différence entre l'efficacité des différentes méthodes d'extraction **(Messaoudi et al., 2019)**.

Le protocole de cette méthode est celui qui a été décrit par **(Rihane et Benlahreche., 2013)** en y apportant quelques modifications.

4.2. Souche bactérienne et conditions de culture :

L'activité antimicrobienne a été évaluée sur deux souches bactériennes cliniques Gram+ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et Gram- (*Escherichia coli* ATCC 25922)

Escherichia coli :

C'est une bactérie à Gram négatif, commensal du tube digestif de l'homme et de l'animal, de forme non sporulée, de type aérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 μm , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 μm . *E. coli* représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës de l'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été, diarrhée infantile et les intoxications alimentaires **(Abd et al., 2021)**.

Staphylococcus aureus :

Ce sont des cocci Gram positif avec un diamètre de 0,5 à 1,5 μm , de forme non sporulée, qui tendent à se grouper en paires, petites chaînes, elles sont habituellement non capsulée, ou possédant des capsules limitées, elles sont anaérobies facultatives. *Staphylococcus aureus* représente l'agent commun des infections postopératoires de blessures, endocardite aigue, intoxication alimentaire (Abd et al., 2021).

4.3. Activité antibactérienne :

Les extraits de *R. alaternus* obtenus par la sonication et la macération ont été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) 2% pour préparer la concentration de la solution mère de chaque extrait à 50 mg/ml.

Le milieu de culture approprié à cette étude est le milieu LB qui a été développé par Luria-Bertani composé de 10g de peptone, 5g d'extrait de levures, 10g de Na Cl, et 18 à 20g d'agar dans un litre d'eau distillée.

La revivification des bactéries est effectuée par repiquage à la surface de la gélose, Luria-Bertani (LB) pré-coulée en boîtes de Pétri, ensuite incubée à 37°C pendant 18 à 24h. L'inoculum microbien est obtenu à partir des cultures fraîches en phase de croissance exponentielle dans les géloses. En effet, des colonies bien isolées ont été transférées dans des tubes contenant de l'eau physiologique stérile (NaCl à 0.9%) afin d'avoir des suspensions microbiennes ayant une turbidité voisine à celle de 0.5 McFarland correspondantes à 10^8 UFC/ml.

La méthode de diffusion par puits sur gélose telle que décrite par (Zeouk et al., 2020) est adoptée. La surface de gélose est inoculée par inondation avec l'inoculum bactérien; après séchage de 30 min à température ambiante de la boîte et diffusion de la souche, un trou d'un diamètre de 6 mm est découpé de manière aseptique à l'aide de pipette pasteur; ensuite un volume de 80 à 100 μl de chaque extrait a été introduit dans chaque puits. Une pré-diffusion de 30 min à température ambiante est réalisée, ensuite les boîtes ont été incubées pendant 24 heures à 37°C. Les diamètres des zones d'inhibition de croissance microbienne ont été mesurés, les moyennes ont été calculées (l'opération est réalisée en triplicata) et les écart-types ont été déterminés.

5. Activité antioxydante :

Le test au 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle (DPPH.) est réalisé par la méthode décrite par (Ammar et al., 2009) qui permet de mesurer le pouvoir réducteur par le calcul de la CI_{50} des substances antioxydantes contenues dans un extrait. Le DPPH est un radical libre de couleur violette qui devient jaune quand il est réduit par un donneur de proton H^+ .



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

Une solution méthanolique de 0,004% de DPPH est mélangée avec les deux extraits de *R. alaternus*, 2ml de chaque dilution de ces extraits sont mises dans un tube à essai avec l'ajout de 2ml de la solution méthanolique de DPPH, l'ensemble a été incubé 30 min à l'abri de la lumière à température ambiante. Les valeurs de DO ont été mesurées à 517 nm contre un blanc qui contient le méthanol pur. L'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant la méthode DPPH est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol (Inhibition % ou I %) suivant la formule suivante:

$$I \% = (Ac - At / Ac) \times 100$$

Ac: Absorbance de control

At: Absorbance du test – absorbance du blanc du test

Le pourcentage d'inhibition est exprimé ensuite par la valeur de la CI_{50} , sachant que l' CI_{50} est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH. Les CI_{50} sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testées.

PARTIE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION

Partie III : Résultat et discussions

La technique d'extraction est une étape très importante dans l'isolement des composés phytochimiques existants dans le matériel végétal. Elle est influencée par sa nature chimique, la méthode utilisée, la taille d'échantillon étudié, ainsi que la présence de substances interférentes (Messaoudi et al., 2019).

Dans cette étude, nous avons utilisé deux méthodes d'extraction : la macération, et la sonication. Au total, nous avons obtenu des extraits secs avec lesquels les différents tests ont été effectués. L'étude comparative de ces deux méthodes d'extraction a porté sur : Le rendement d'extraction, le dosage quantitatif des polyphénols et des flavonoïdes et l'évaluation de l'activité antioxydante et l'activité antimicrobienne.

1. Rendement :

Dans cette étude, le rendement (l'extrait sec, obtenu après évaporation, contenant les flavonoïdes et les polyphénols) a été déterminé par rapport à 10 g de la matière végétale (broyat ou feuilles sèches). Le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant évaporation). Les résultats sont représentés dans le **tableau 2**.

Tableau 2 : Poids d'extrait sec et rendement correspondant des deux méthodes d'extraction des polyphénols et des flavonoïdes à partir de la plante *Rhamnus alaternus*

| Méthode d'extraction | Poids d'extrait sec (g) | Rendement (%) |
|------------------------------|-------------------------|---------------|
| Macération | 2,375 | 23,75 ±1,06 |
| Sonication (40°C, 45 min) | 1,965 | 19,65 ±0,07 |

Les résultats des rendements sont exprimés en moyenne \pm SD, n=3 pour chaque extrait.

D'après ces résultats, nous pouvons déduire que le rendement de l'extraction par macération (23,75%) est plus élevé que celui de l'extraction par la sonication (19,65%).

La différence dans le rendement entre les deux extraits est due à la différence de la nature chimique des composés phénoliques de l'extrait et la nature de solvant utilisé. La différence dans les polarités des solvants d'extraction influence la solubilité des constituants chimiques d'un extrait ainsi que le rendement d'extraction (**Sulaiman et al, 2011**). Dans notre cas, où on a utilisé le même solvant, peut être cette différence de rendement entre les extraits est due aux techniques d'extraction utilisées, et le temps d'extraction qui est généralement très long dans le cas de la macération (24 heures) par rapport au sonication (45 min). Selon **Rhazi et al, 2015**, la progression de temps d'extraction peut augmenter le rendement de l'extrait et cela peut être dû à la sécrétion plus de substances naturelles comme les polyphénols.

Dans une étude réalisée par (**Ben Ammar et al, 2008**), sur la même espèce (*R.alaternus*) originaire de la Tunisie, la macération des feuilles dans le méthanol suivi par le butanol saturé en eau a donné un rendement de 9 %. Tandis que L'étude menée par (**Harrare., 2012**) a signalé un rendement de 10% pour les racines de *R. alaternus* obtenus par Soxhlet en utilisant le méthanol comme solvant. D'autres résultats différents ont été trouvés par (**Boussahel et al, 2013**) sur la même espèce récoltée aussi, la macération dans le méthanol et d'autre dans l'eau distillée a donnée des rendements de 14,48% et 14,20% respectivement, ces résultats sont aussi inférieurs par rapport à notre résultats.

Ces résultats montrent que la partie utilisée, ainsi que la nature de solvant influencent le rendement des extraits soulignant un rendement plus élevé dans notre étude (23,75%) pour la macération.

De plus, la période de récolte de la plante, la procédure de séchage, la granulométrie des particules, le temps de macération, constituent les paramètres susceptibles d'influencer le taux d'extraction et affecter ainsi l'activité biologique des extraits (**Hayouni et al, 2007**).

2. Criblage phytochimique

3.

• Teneur en polyphénols

Le dosage des polyphénols a été effectué par la méthode spectrophotométrie avec le réactif de Folin-Ciocalteu. (**Singleton et al., 1999**). Les résultats obtenus sont exprimés en microgrammes équivalent acide gallique par milligramme de la matière végétale sèche (μg EAG /mg d'extrait).

- **Teneur en flavonoïdes**

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode colorimétrique décrite par **Bahorun et al.,(1996)**. La quercétine considérée comme contrôle positif a permis de réaliser une courbe d'étalonnage, d'où on a calculé la teneur en flavonoïdes des différents extraits qui est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g eq Q/mg d'E}$).

Les résultats du dosage des teneurs en flavonoïdes et en polyphénols des deux extraits de *R. alaternus*. (Chaque valeur représente la moyenne de deux essais \pm SD) sont indiqués dans le **tableau 3**.

Tableau 3 : Teneur en flavonoïdes et polyphénols de *Rhamnus alaternus* dans différents extraits par sonication et par macération (mg EQ/ml)

| Méthode d'extraction | Poly ($\mu\text{g eq AG/mg d'E}$) | Flavo ($\mu\text{g eq Q/mg d'E}$) |
|-----------------------------|---|---|
| Macération | 99,06 \pm 1,86 | 49,5 \pm 0,35 |
| Sonication | 61,25 \pm 1,59 | 112,5 \pm 0,5 |

❖ Pour les deux extraits de la plante étudiée *Rhamnus alaternus* les teneurs en polyphénols (**tableau 3**) ont été variables. L'extrait obtenu par macération a présenté un résultat significativement plus élevée d'une valeur (99,06 \pm 1,86 $\mu\text{g EAG/mg d'extrait}$) par rapport à l'extrait obtenu par sonication (61,25 \pm 1,59 $\mu\text{g EAG/mg d'extrait}$). Cette différence entre les deux extraits peut être expliquée par les différences entre le principe de chaque méthode d'extraction. Autrement dit, la capacité d'extraire une famille phytochimique spécifique.

Dans d'autres résultats en prenant le méthanol comme solvant, (**Kosalec et al. 2013**) on a eu une quantité de polyphénols de l'ordre de 38,4 \pm 1,56 mg EAG/g d'extrait. Ainsi, **Boussahel et al (2013)** ont obtenu 33,65 \pm 2,5 mg EAG/g d'extrait. Ces résultats sont inférieurs à nos résultats. Tandis que **Ben Ammar et ses collaborateurs (2007)** ont dévoilé que l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* de Tunisie contient environ 138 \pm 9 mg EAG/ g d'extrait.

❖ Pour les teneurs en flavonoïdes, d'après les résultats illustrés dans le **tableau 3**, l'extrait obtenu par sonication avec une teneur de $(112, 5 \pm 0,5 \mu\text{g EQ/mg d'extrait})$ est très significativement élevé par rapport à l'extrait obtenu par macération $(49,5 \pm 0,35 \mu\text{g EQ/mg d'extrait})$. Cette différence peut être expliquée par l'éclatement des cellules qui permet la sécrétion des métabolites secondaires par les ultrasons.

Une étude réalisée par **Ben Ammar et ses collaborateurs (2007)** a rapporté que l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* de Tunisie contient environ $283 \pm 11 \text{mg EQ/g E}$, ces résultats sont notamment supérieurs à nos résultats obtenus.

La différence entre les teneurs en flavonoïdes et polyphénols en fonction des différentes méthodes d'extraction pourrait s'expliquer par la durée d'extraction, qui est longue dans le cas de la macération (24 heures) par rapport à sonication (45 min), à savoir que la sonication a la capacité d'extraire plus de composés phytochimiques produits par l'éclatement des cellules par les ultrasons.

4. Activité antioxydante :

Les résultats de l'activité antioxydante des deux extraits sont regroupés dans le **tableau 4** (les valeurs sont exprimées en moyenne de deux essais \pm SD).

Tableau 4 : Activité antioxydante exprimée par CI_{50} des extraits testés (mg/ml)

| <i>R. alaternus</i> | Sonication | Macération |
|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| CI_{50} | $0,095 \pm 0.0$ | $0,149 \pm 0.1$ |

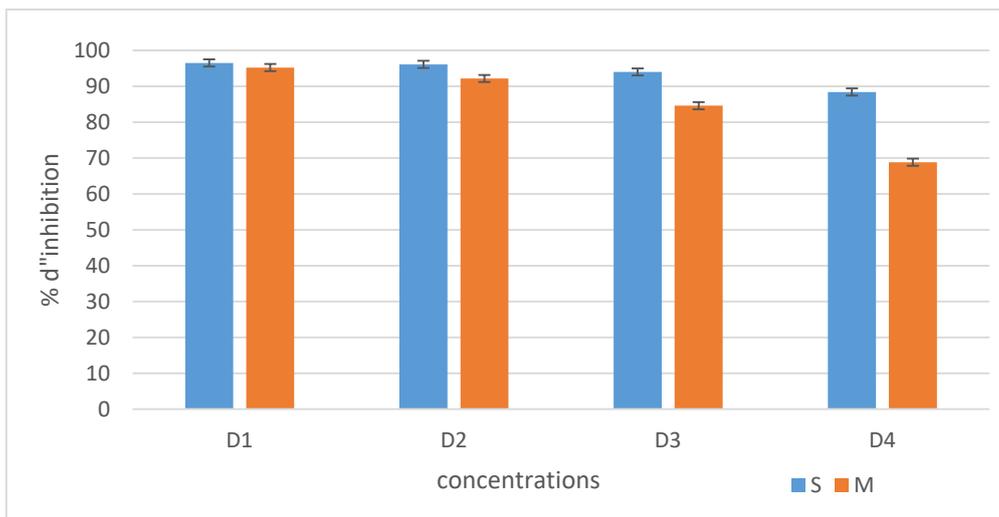


Figure 12 : Histogramme descriptif de l'activité antioxydante des extraits

D'après la figure ci-dessus, on remarque que l'extraction par sonication donne un résultat plus intéressant.

Pour chaque extrait, la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical libre DPPH est déterminée. Le tableau 4 résume les résultats obtenus de l'IC₅₀ des différents extraits bruts de la plante étudiée.

l'IC₅₀ est inversement proportionnel à la capacité antioxydante d'un composé, parce qu'il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC₅₀ est petite, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande.

Selon les résultats trouvés, la sonication présente l'activité antioxydante la plus importante avec IC₅₀ est de 0,095 ± 0,0006 mg/ml, mais la macération présente également une activité notable avec une IC₅₀ de 0,149±0,001mg/ml.

Une étude menée par (**Boussahel et al. 2013**) sur la même espèce de plante, une IC₅₀ = 0,398 ± 0.007 et 0,082 ± 0,0006 mg/ml a été démontrée pour l'extrait méthanolique et aqueux respectivement. Ce résultat est nettement proche à celui trouvé avec nos extraits.

Dans une autre étude menée par (**Ben ammar et al, 2008**) sur les feuilles de la même espèce de plante de la Tunisie a montré une IC₅₀ de 19 µg/ml, lorsque l'extraction a été effectuée au méthanol puis au butanol saturé en eau. Cette valeur est assez supérieure à celle trouvée avec nos extraits. Cette différence entre ces résultats pourrait s'expliquer par la nature des polyphénols contenus dans l'extrait qui est influencé par la période de récolte, sachant que nos

échantillons ont été récoltés au mois de janvier. Elle pourrait s'expliquer aussi par la différence des conditions climatique et pédologique, mais essentiellement par la polarité des solvants utilisés et la quantité des polyphénols extraite.

Ces résultats montrent que les extraits méthanoliques de *R. alaternus* possèdent un potentiel antioxydant important dû aux polyphénols notamment les flavonoïdes qui stabilisent le radical peroxyde par donation d'hydrogène.

5. Activité antibactérienne :

Nous rappelons, que les objectifs de cette manipulation sont :

- Evaluer le pouvoir antibactérien des extraits isolés de la plante médicinale *Rhamnus alaternus*.
- Vérifier si on peut utiliser ce pouvoir antibactérien comme un facteur de comparaison entre les deux méthodes d'extraction étudiées.

Nous avons utilisé la méthode de diffusion par puits sur un milieu gélosé solide.

Le pouvoir antibactérien des extraits a été estimé en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des puits contenant les extraits à tester vis-à-vis de deux souches bactériennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*).

Selon les résultats trouvés, on note que nos extraits ne présentent aucun effet sur la bactérie *Escherichia coli* à Gram-.

Alors le résultat du test antibactérien des extraits vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* est représenté sur la **Figure 13**.

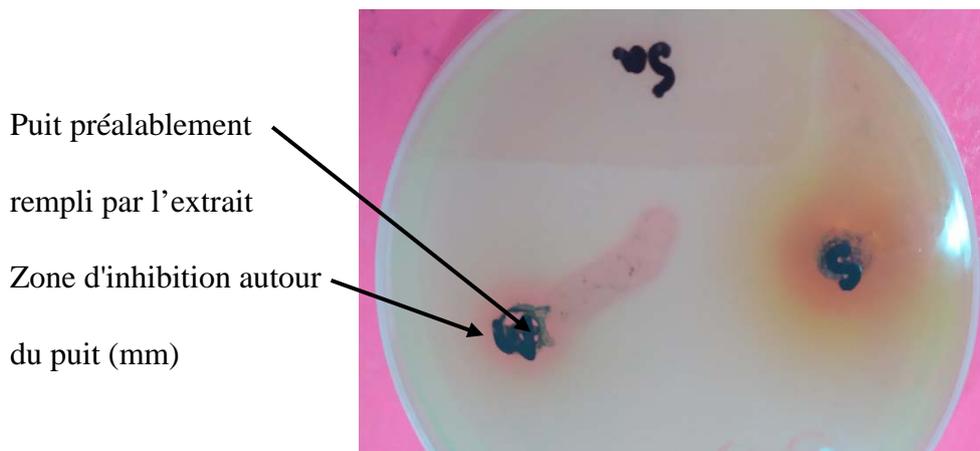


Figure 13 : Zone d'inhibition autour des puits contenant l'extrait testé vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*

Afin d'évaluer précisément le pouvoir antibactérien des extraits, les diamètres des zones d'inhibition de croissance microbienne ont été mesurés, les moyennes ont été calculées (l'opération est réalisée en triplicata) et les écart-types ont été déterminés.

Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 5**:

Tableau 5 : Diamètre de la zone d'inhibition des extraits sur *Staphylococcus aureus* en mm

| Méthode d'extraction | Zone d'inhibition (mm) |
|----------------------|------------------------|
| Macération | 13,5 ± 0,71 |
| Sonication | 17 ± 1,41 |

-Les deux extraits obtenus par macération et sonication ne présentent aucune activité inhibitrice contre la bactérie *Escherichia coli*, et cela peut être expliqué par la résistance importante de cette bactérie à Gram négatif.

Plusieurs travaux mettent en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram + par rapport aux bactéries Gram - (**Hayouni et al, 2007 ; Koné et al., 2004**). Cela peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram -. En effet, les bactéries Gram – possèdent une couche additionnelle à la membrane externe, composée de phospholipides ; de protéines et de lipopolysaccharides formant une barrière imperméable à la plupart des molécules hydrophobes (**Georgantelis et al., 2007**).

-Cette méthode de diffusion par puits a permis de déterminer l'action des extraits de *Rhamnus alaternus* obtenus par deux méthodes d'extraction sur la bactérie *Staphylococcus aureus* qui est plus ou moins sensible. Cette action se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du puit préalablement rempli d'extrait.

- Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'un extrait à un autre, tel que pour la macération on trouve 13,5 ± 0,71 mm, par contre la sonication présente une activité plus importante avec un diamètre de 17 ± 1,41 mm.

Au vu de ces résultats, on peut déduire que les flavonoïdes extraits à partir de la plante médicinale *Rhamnus alaternus* ont un pouvoir antibactérien contre *Staphylococcus aureus* et que le diamètre de la zone d'inhibition peut être utilisé comme un facteur de comparaison entre

les différentes méthodes d'extraction étudiées à savoir que la sonication a la capacité d'extraire plus de composés phytochimiques duit à l'éclatement des cellules par les ultrasons.

Conclusion et perspectives :

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à une étude comparative de deux techniques d'extraction des polyphénols et des flavonoïdes contenus dans une plante médicinale, *Rhamnus alaternus*. Il s'agit, en l'occurrence, de l'extraction par macération dans le méthanol aqueux, à température ambiante, pendant 24 heures, et l'extraction par sonication à 40°C, pendant 45 min. La comparaison porte sur le rendement d'extraction, le criblage phytochimique et l'efficacité antibactérienne et antioxydante des extraits obtenus.

L'extraction effectuée par macération présente le rendement le plus élevé par rapport au sonication ce qui montre que le rendement est différent en fonction de la méthode d'extraction.

Les tests phytochimiques quantitatifs réalisés par les dosages colorimétriques ont permis de mettre en évidence des flavonoïdes, et des polyphénols. En montrant que dans le test du dosage des polyphénols, l'extrait méthanolique obtenu par la macération présente la teneur la plus élevée, par contre dans le test de dosage des flavonoïdes l'extrait obtenu par la sonication est considéré comme l'extrait qui présente les meilleurs résultats.

L'activité antioxydante a été déterminée, elle montre que les deux extraits de la plante étudiée présentent des propriétés antioxydantes remarquables. Cependant l'extrait préparé par la sonication est plus actif que l'autre extrait vis-à-vis du piégeage du radical libre DPPH.

L'étude biologique montre que le pouvoir antibactérien diffère d'un extrait à l'autre, en rapport direct avec les différences de leurs teneurs en polyphénols et flavonoïdes.

Globalement, la plante choisie dans ce travail est douée des activités biologiques prometteuses. Ainsi la méthode d'extraction joue un rôle important dans l'optimisation de ces activités.

Comme perspectives on peut proposer :

- d'évaluer l'activité antioxydante par d'autres méthodes et de faire des tests *in-vivo* afin de confirmer les activités observées *in-vitro*.
- d'élargir le champ de recherche et d'étudier d'autre activité : Activité antivirale, antidiabétiques et cytotoxiques.

Références bibliographiques

Abd, H., Nacer, E., Option, M., Pr, B. R., Mohamed, Z., & Pr, M. (2021). *Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de Rhamnus*.

Analytique, C., & Bendia, S. (2020). *Polycopié du Cours : Techniques de séparation Partie du module "Chimie Analytique"*. 40.

Fili, V., & Sp, S. B. (n.d.). *Mémoire Remerciement*.

Messaoudi, M., Chahmi, N., El-Mzibri, M., Gmouh, S., Amzazi, S., Benbacer, L., El-Hassouni, M., Bouaziz, A., Boudjelida, H., Soltani, N., Öz, E., Koç, S., Çinbilgel, İ., Yanıkoğlu, A., Çetin, H., Duarte, J. L., Amado, J. R. R., Oliveira, A. E. M. F. M., Cruz, R. A. S., ... Physiology, A. (2019). Comparaison de trois méthodes d'extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes à partir de la plante médicinale : *Artemisia herba alba* Asso. *European Journal of Medicinal Plants*, 78(November), 0–6.
http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf?ua=1%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2009.10.007%0Ahttp://routerjcs.nctu.edu.tw/router/word/11542212017.pdf%0Ahttp://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5257-1%0Ahttps://w3id.org/mtv/FISE-Comm

Michel, T. (2011). *ethodologies d' extraction , de fractionnement ecules bioactives de l' argousier (Hippophae rhamnoides) To cite this version : Nouvelles méthodologies d' extraction , de fractionnement et d' identification : Application aux molécules bioactives de l. 286.*

Nadjla, N. T. R. A. S., & Président. (2020). *Etude comparative des méthodes d' extraction des substances bioactives des matrices végétales telle que la figue de barbarie*.

P.I.Penchev. (2010). *Étude Des Procédés D'Extraction Et De Purification De Produits Bioactifs À Partir De Plantes Par Couplage De Techniques Séparatives À Basse Et Haute Pressions*. 218.

Triaux, Z. (2019). *Développement de méthodes d'extraction et d'analyse des molécules terpéniques à activité anti-inflammatoire*. 1–280.

Zeouk, I., Ouedrhiri, W., Jiménez, I. A., Morales, J. L., Bazzocchi, I. L., & Bekhti, K. (2020).

Intra-combined antioxidant activity and chemical characterization of three fractions from Rhamnus alaternus extract: Mixture design. *Industrial Crops and Products*, 144(January 2019), 112054. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112054>

Zeouk, I., Ouedrhiri, W., Sifaoui, I., Bazzocchi, I. L., Piñero, J. E., Jiménez, I. A., Lorenzo-Morales, J., & Bekhti, K. (2021). Bioguided isolation of active compounds from rhamnus alaternus against methicillin-resistant staphylococcus aureus (Mrsa) and panton-valentine leucocidin positive strains (mssa-pvl). *Molecules*, 26(14), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules26144352>