

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère d'Enseignement Supérieur et de la recherche scientifique*  
*Université Abderrahmane Mira de Béjaia*  
*Faculté de Technologie*  
*Département de Génie des procédés*  
*Spécialité Génie Alimentaire*

---



## *Mémoire de Master*

En Génie des procédés  
Option : Génie Alimentaire

# Thème

Optimisation d'extraction des composés  
bioactifs des extraits de *Phillyrea angustifolia*  
(Filaire) et *Rhamnus alaternus* (Nerprun  
alaterne)

Présenté par :

MEDJDOUB Kafia et ISKOUNEN Sabrina

Devant le jury composé de :

Présidente	HAMRI Sabrina	MCA	U. A/Mira Béjaia.
Examinatrice	BEY Zakia	MAA	U. A/Mira Béjaia.
Promoteur	NABET Nacim	MCA	U. A/Mira Béjaia.
Co-encadreur	BELHAMEL Chiraz	Doctorante	U. A/Mira Béjaia.

04 Juillet 2019

## *Remerciements*

Au terme de notre travail, en premier lieu, nous tenons à remercier le bon dieu, le tout Puissant de nous avoir donné la volonté, la patience et le courage pour réaliser ce travail,

Nos profonds remerciements s'adressent à notre promoteur, Monsieur Nabet Nacim, qui a accepté de nous encadrer, pour sa collaboration, sa disponibilité, sa compréhension et son aide nécessaire à la réalisation de notre travail.

Nous remercions également notre Co-encadreur, Mademoiselle Belhamel Chiraz pour sa disponibilité, ses conseils et ses encouragements.

Nos remerciements les plus sincères à Monsieur Belhamel K, de nous avoir ouvert les portes de son laboratoire.

Nous tenons à remercier aussi :

Madame BEY Zakia, de nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail, Madame HAMRI Sabrina de nous avoir consacré de son temps en nous faisant l'honneur de présider le jury et d'évaluer notre travail.

En bref nous remercions toutes les personnes qui ont participé de près Ou de loin à la réalisation de ce travail

Merci à Tous...

## *Dédicaces*

Au terme de toutes ces années d'étude, j'ai le plaisir de dédier ce modeste travail en signe de respect et de remerciement, à ceux qui ont donné un sens à mon existence qui m'ont soutenu jours et nuits durant tout mon parcours,  
A vous très chers parents, je vous dis merci pour votre soutien moral et financier et surtout pour vous ma très chère mère pour tous vos sacrifices, votre patience, confiance et votre amour.

A mon futur mari

A mes chères sœurs

A mes frères

A mes nièces et neveux

J'adresse aussi mes dédicaces à mes amies avec lesquelles j'ai passé des moments agréables, en particulier,

A mes copines de chambre Hanane, Hayet et Massilia.

A mon binôme

Mes dédicaces s'adressent aussi à tous mes enseignants

A tous ceux qui me connaissent

A toute la promotion Génie alimentaire 2019

*KAFIA*

# *Dédicaces*

*Au terme de toutes ces années d'étude Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes chers parents «Naouara, Boudjemàa » qui ont été toujours à mes cotés par leur soutien et encouragement durant toute ma vie et aux quels je ne rendrai jamais assez.*

*Mes très chères sœurs « Nawal, Zahia », A mon cher frère «Boussàad »,  
Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.*

*Mes copines et toutes mes amies pour leur aide et encouragement.*

*Toute ma famille ISKOUNEN, CHENNIT.*

*Mon binôme Kafia sans oublier sa famille.*

*Mes dédicaces s'adressent aussi à tous mes enseignants.*

*Toute la promotion de Génie alimentaire 2019.*

*« Que Dieux nous guide tout au long de notre vie »*

*Sabrina*

## TABLE DES MATIERES

Liste des figures .....	I
Liste des tableaux .....	III
Liste des abréviations.....	IV
Glossaire.....	VI
Introduction .....	1

### SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

#### CHAPITRE I : LES PLANTES MEDICINALES

<b>1. Les plantes médicinales.....</b>	<b>3</b>
1.1. Définition des plantes médicinales .....	3
1.2. Le pouvoir des plantes.....	3
1.3. Intérêts d'utilisation des plantes médicinales.....	3
1.4. Méthodes d'extractions traditionnelles .....	4
1.4.1. Infusion .....	4
1.4.2. Décoction .....	4
1.4.3. Macération.....	4
<b>2. Présentation des plantes médicinales étudiées .....</b>	<b>5</b>
2.1. <i>Rhamnus alaternus</i> .....	5
2.1.1. Description morphologique .....	5
2.1.2. Classification botanique .....	5
2.1.3. Répartition géographique .....	6
2.1.4. Propriétés thérapeutiques et utilisations .....	6
2.1.5. Composition chimique .....	6
2.2. <i>Phillyrea angustifolia</i> .....	7
2.2.1. Description morphologique .....	7
2.2.2. Classification botanique .....	8
2.2.3. Répartition géographique .....	8
2.2.4. Propriétés thérapeutiques et utilisations .....	9
2.2.5. Composition chimique .....	9

#### CHAPITRE II : Activités antioxydante et bactérienne

<b>1. Activité antioxydante.....</b>	<b>1</b>
--------------------------------------	----------

1.1 Stress oxydatif .....	11
1.2 Radicaux libres .....	11
1.3 Antioxydants .....	12
1.3.1 Définition.....	12
1.3.2 Classification des antioxydantes selon leur nature.....	12
1.3.2.1. Antioxydants synthétiques .....	12
1.3.2.2. Antioxydants naturels.....	12
1.3.2.2.1. Antioxydants endogènes.....	12
1.3.2.2.2. Antioxydants exogène .....	13
1.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante .....	16
1.4.1. Méthode de piégeage du radical libre DPPH.....	16
1.4.2. Méthode de réduction de l'ion ferrique FRAP (Pouvoir réducteur).....	16
1.4.3. Phosphomolybdate d'ammonium .....	17
<b>2. Activité antibactérienne .....</b>	<b>17</b>
2.1. Définition .....	17
2.2. Antibiotiques .....	17
2.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne.....	17
2.4.1. Méthode de diffusion sur disque de cellulose .....	17
2.4.2. Méthode de microdilution .....	17

## PARTIE EXPERIMENTALE

### CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES

<b>1. Matériel végétal .....</b>	<b>19</b>
1.1. Récolte .....	19
1.2. Séchage.....	19
1.3. Broyage et tamisage .....	20
<b>2. Analyses phytochimiques.....</b>	<b>20</b>
2.1. Test d'humidité .....	20
2.2. Dosage des caroténoïdes .....	20
2.2.1. Principe .....	20
2.2.2. Mode opératoire.....	21
<b>3. Optimisation des conditions d'extraction .....</b>	<b>21</b>
3.1. Modèle expérimental .....	21
3.2. Application de plan Box-Behnken .....	22
<b>4. Extraction des composés phénoliques .....</b>	<b>23</b>
4.1. Principe.....	23
4.2. Mode opératoire .....	24
<b>5. Dosage des composés phénoliques .....</b>	<b>23</b>
5.1. Principe.....	23
5.2. Mode opératoire .....	24
5.3. Dosage des flavonoïdes .....	24
5.3.1. Principe .....	24
5.3.2. Mode opératoire.....	24
5.4. Dosage des tannins condensés.....	25
5.4.1. Principe .....	25
5.4.2. Mode opératoire.....	25
<b>6. Mesure de l'activité antioxydante .....</b>	<b>26</b>
6.1. Test de piégeage des radicaux libres DPPH.....	26
6.1.1. Principe .....	26

6.1.2. Mode opératoire.....	27
6.2. Test de pouvoir réducteur.....	27
6.2.1. Principe.....	27
6.2.2. Mode opératoire.....	27
6.3. Test de phosphomolybdate d'ammonium.....	28
6.3.1. Principe.....	28
6.3.2. Mode opératoire.....	28
<b>7. Détermination de l'activité antibactérienne .....</b>	<b>28</b>
7.1. Préparation des extraits secs.....	28
7.2. Milieux de culture utilisés.....	29
7.3. Standardisation des souches.....	29
7.4. Test de diffusion de disque sur gélose.....	29
7.4.1. Ensemencement.....	29
7.4.2. Incubation et lecture.....	30
<b>8. Analyse statistique.....</b>	<b>30</b>

## CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

<b>1. Taux d'humidité .....</b>	<b>31</b>
<b>2. Teneurs en caroténoïdes .....</b>	<b>32</b>
<b>3. Optimisation de la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante de <i>Phillyrea angustifolia</i> .....</b>	<b>33</b>
3.1. Optimisation de la teneur en polyphénols totaux.....	34
3.2. Optimisation de l'effet de piégeage du radical libre DPPH.....	36
3.3. Optimisation des réponses des surfaces multiples des extraits de <i>Phillyrea angustifolia</i> .....	37
<b>4. Optimisation de la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante de <i>Rhamnus alaternus</i> .....</b>	<b>39</b>
4.1. Optimisation de la teneur en polyphénols totaux.....	39
4.2. Optimisation de l'effet de piégeage du radical libre DPPH.....	41
4.3. Optimisation des réponses des surfaces multiples des extraits de <i>Rhamnus alaternus</i> .....	42
<b>5. Teneurs en flavonoïdes.....</b>	<b>43</b>
<b>6. Teneurs en tannins condensés .....</b>	<b>44</b>
<b>7. Activité antioxydante des extraits de plantes étudiées.....</b>	<b>46</b>
7.1. Test de pouvoir réducteur.....	46
7.2. Test de phosphomolybdate d'ammonium.....	46
<b>8. Activité antibactérienne.....</b>	<b>48</b>
8.1. Sensibilité des souches testées aux antibiotiques.....	48
8.2. Activité antibactérienne des extraits de <i>P. angustifolia</i> et <i>R. alaternus</i> .....	50
<b>Conclusion.....</b>	<b>53</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>55</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>68</b>

**Liste des figures**

<b>Figure 1</b> : Photographie de <i>Rhamnus alaternus</i> .....	5
<b>Figure 2</b> : Photographie de <i>Phillyrea angustifolia</i> .....	8
<b>Figure 3</b> : Structure chimique de la vitamine C .....	13
<b>Figure 4</b> : Structure de base des flavonoïdes .....	14
<b>Figure 5</b> : Structure chimique du radical libre DPPH .....	15
<b>Figure 6</b> : Mécanisme de réaction du chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes.....	24
<b>Figure 7</b> : Teneurs en humidité des plantes étudiées .....	31
<b>Figure 8</b> : Teneurs en caroténoïdes des plantes étudiées .....	32
<b>Figure 9</b> : Diagramme de Pareto des polyphénols d'extrait de <i>P. angustifolia</i> .....	35
<b>Figure 10</b> : Interaction entre le ratio et le temps d'extraction et leur effet sur la teneur en polyphénols de <i>phillyrea angustifolia</i> .....	35
<b>Figure 11</b> : Diagramme de Pareto pour le test DPPH de l'extrait de <i>P. angustifolia</i> .....	37
<b>Figure 12</b> : Schéma tridimensionnel de la surface de réponse des effets du temps et du solvant sur la désirabilité de l'extrait de <i>P. angustifolia</i> obtenu par la méthode conventionnelle .....	38
<b>Figure 13</b> : Diagramme de Pareto des polyphénols d'extrait de <i>R. alaternus</i> .....	40
<b>Figure 14</b> : Diagramme de Pareto pour le test DPPH de <i>R. alaternus</i> .....	42
<b>Figure 15</b> : Schéma tridimensionnel de la surface de réponse des effets du temps et du solvant sur la désirabilité de l'extrait de <i>R. alaternus</i> obtenu par la méthode conventionnelle .....	43
<b>Figure 16</b> : Teneurs en flavonoïdes des plantes étudiées .....	43
<b>Figure 17</b> : Teneurs en tannins condensés des deux plantes étudiées .....	45

<b>Figure 18 :</b> Pouvoir réducteur des extraits des plantes étudiées .....	46
<b>Figure 19 :</b> Test de phosphomolybdate d'ammonium des extraits des plantes étudiées.....	47
<b>Figure 20 :</b> Diamètres de zones d'inhibition de quelques antibiotiques sur les souches testées .....	49
<b>Figure 21 :</b> Activité antibactérienne des extraits de <i>R. alaternus</i> et de <i>P. angustifolia</i> .....	51

Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Classification botanique de <i>Rhamnus alaternus</i> .....	6
<b>Tableau II</b> : Classification botanique de <i>Phillyrea angustifolia</i> .....	8
<b>Tableau III</b> : Caractéristiques écologiques du lieu de récolte des plantes.....	19
<b>Tableau IV</b> : Plan d'expériences utilisé pour l'extraction des composés bioactifs des deux plantes étudiées.....	22
<b>Tableau V</b> : Niveaux des trois paramètres choisis .....	22
<b>Tableau VI</b> : Plan d'expérience et résultats de réponses étudiées pour l'extrait de <i>Phillyrea angustifolia</i> .....	34
<b>Tableau VII</b> : Résultats prédits et expérimentaux des réponses étudiées obtenus dans les conditions optimales d'extraction de <i>Phillyrea angustifolia</i> par la méthode conventionnelle .....	38
<b>Tableau VIII</b> : Plan d'expérience et résultats de réponses étudiées pour l'extrait de <i>R. alaternus</i> .....	39
<b>Tableau IX</b> : Résultats prédits et expérimentaux des réponses étudiées obtenus dans les conditions optimales d'extraction de <i>Rhamnus alaternus</i> par la méthode conventionnelle .....	42

**Liste des abréviations**

- Abs** : Absorbance
- AlCl<sub>3</sub>** : Trichlorure d'aluminium
- BHA** : Hydroxyanisole butylé
- BHT** : Hydroxytoluène butylé
- BRA** : Bactéries Résistantes aux Antibiotiques
- CIP** : Collection de l'Institut de Pasteur
- CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice
- CMB** : Concentration Minimale Bactéricide
- DMSO** : Diméthylsulfoxyde
- DPPH** : 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl
- DZI** : Diamètre de Zone d'inhibition
- EAC** : Equivalent en Acide Catéchine
- EAG** : Equivalent en Acide Gallique
- EASC** : Equivalent en Acide Ascorbique
- EAQ** : Equivalent en Acide Quercétine
- ERO** : Espèce Réactive de l'Oxygène
- EtOH** : Ethanol
- Fe<sup>2+</sup>** : Fer ferreux
- Fe<sup>3+</sup>** : Fer ferrique
- FeCl<sub>3</sub>** : Chlorure ferrique
- FeCl<sub>2</sub>** : Chlorure de fer
- FRAP** : Ferric reducing antioxidant power
- FeSO<sub>4</sub>** : Sulfate ferreux
- Hcl** : Acide chlorhydrique
- H<sub>3</sub>PMO<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** : Acide phosphomolybdique
- H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** : Acide phosphotungstique
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Acide sulfurique
- HPLC** : High Performance Liquide Chromatography
- IC50** : Concentration inhibitrice à 50 %
- K<sub>3</sub>Fe (CN) <sub>6</sub>** : Ferricyanure de potassium
- KOH** : Hydroxyde de potassium

**LSD** : Low significative difference

**MH** : Mueller Hinton.

**MS** : Matière Sèche

**NaOH** : Hydroxyde de sodium

**P.** : *Phillyrea*

**R.** : *Rhamnus*

**RSD** : Relative Standard Deviation

**RSM** : Méthode de Surface de Réponse.

**TCA** : Acide trichloracétique

**UV** : ultra violet

**Vis** : Visible

**UFC** : Unité Formant Colonie

## Glossaire

**Antiseptique** : Produit utilisé pour lutter contre les germes de la peau et des muqueuses.

**Arbuste** : petit arbre, en général moins de cinq mètres à l'âge adulte.

**Astringente** : Se dit d'une substance qui resserre et assèche les tissus et peut faciliter leur cicatrisation.

**Cataplasme** : Préparation médicinale, en général chaude, appliquée sur les parties douloureuses du corps.

**Charnu** : Qui est formé de chair : Les parties charnues du corps.

**Coriace** : Se dit d'un organe plus ou moins épais et dur comme du cuir.

**Diabète** : Maladie métabolique due à une carence ou à un défaut d'utilisation de l'insuline dont les principaux symptômes sont une soif et une élimination excessive d'urines.

**Diurétique** : Qui favorise ou stimule l'excrétion urinaire.

**Dioïque** : Les fleurs mâles et femelles qui se trouvent sur des axes différents.

**Drupe** : Fruit charnu, indéhiscent, à graine presque toujours unique et possédant un noyau.

**Endémique** : Se dit d'une plante qui est naturellement présente dans un endroit géographique donné.

**Fébrifuge** : Qui fait disparaître la fièvre.

**Herbacée** : Se dit d'un organe (tige, rameau) ou d'une plante entière présentant les caractères de l'herbe.

**Hypotenseurs** : Médicament qui diminue la tension artérielle.

**Lancéolée** : Désigne un organe (feuille) en forme de lance, rétréci aux extrémités et élargi en partie médiane.

**Ordre** : en taxonomie, niveau de classification des plantes compris entre la classe et la famille, pouvant éventuellement être divisé en sous-ordres. Le nom des Ordres, chez les plantes, se termine par –ales.

**Opposé** : Se dit d'organes insérés par deux, l'un face à l'autre à la même hauteur.

**Persistant** : Qualifie des organes (feuille, calice) qui subsistent à la fin de chaque cycle végétatif annuel.

**Pétale** : Élément interne du périanthe, de couleurs et de formes variées, dont l'ensemble constitue la corolle. Les pétales entourent les organes sexuels, et chez les fleurs entomophiles, attirent les insectes pollinisateurs par leur couleur, leur parfum, etc...

**Pétiolées** : Se dit des feuilles qui sont attachées à la tige par une queue.

**Pharmacopée :** Un recueil à caractère officiel et réglementaire des matières premières autorisées dans un pays ou dans un groupe de pays pour la fabrication des médicaments. Elle désigne aussi l'ensemble des médicaments, souvent des plantes, utilisés dans une région ou à une époque donnée.

**Scavenger :** Terme anglo-saxon qui signifie piéteur.

**Stipule :** Appendice foliacé (organe ayant l'aspect d'une feuille) se présente le plus souvent deux par deux à la base du pétiole des feuilles.

**Taxon :** Terme désignant une unité de classification de rang quelconque auquel est attribué un nom.

**Thérapeutique :** Relatif au traitement des maladies pouvant guérir.

**Vivace :** Se dit pour une plante qui vit plusieurs années, qu'elle soit à floraison unique ou à floraisons multiples.

## Introduction

Le stress oxydant est un déséquilibre entre les espèces réactives de l'oxygène et les antioxydants. Lors du stress oxydant la cellule ne contrôle plus la quantité de radicaux libres qu'elle produit, par conséquent l'apparition de plusieurs maladies telles que les cancers, l'athérosclérose... (Pincemail *et al.*, 2002).

L'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques est connue depuis l'antiquité. Elles sont utilisées pour traiter et soigner toutes sortes de maladies. Ces plantes ont l'aptitude de synthétiser de nombreux composés appelés métabolites secondaires (Muthu *et al.*, 2006). Ces derniers possèdent des structures chimiques diversifiées et un large éventail d'activités biologiques.

Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante, qui peut faire l'intérêt de nombreuses études (Huang *et al.*, 2005).

En effet, plusieurs études ont démontré que les métabolites secondaires (polyphénols, huiles essentielles, ..) présents dans les extraits des plantes possèdent plusieurs propriétés : antioxydante, antibactérienne, anti-inflammatoire et anticancéreuse (Macheix *et al.*, 2005).

Parmi les espèces sauvages qui poussent dans le bassin méditerranéen on peut citer *Rhamnus alaternus* (Nerprun alaterne) et *Phillyrea angustifolia* (Filaire) qui appartiennent à la famille des Rhamnacees et des Oléacees. Les feuilles de *R. alaternus* sont utilisées en tant que laxatif, purgatif et diurétique (Ben Ammar *et al.*, 2008 ; Ben Ammar *et al.*, 2009). Par contre, *P. angustifolia* possède des propriétés médicinales telles qu'insecticide et fébrifuge (Munne-Bosch et Pen˘uelas, 2003). Par ailleurs, elles sont caractérisées d'un point de vue phytochimique par l'abondance de substances phénoliques, particulièrement les flavonoïdes et les tannins, qui sont décrits par de nombreux auteurs en tant que molécules antioxydantes (Chouitah *et al.*, 2012 ; Ben Ammar *et al.*, 2008).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail dont le but est d'optimiser l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits de deux plantes médicinales à savoir *R. alaternus* et *P. angustifolia*. L'optimisation est réalisée à l'aide d'un plan d'expérience (Box-Behnken) en utilisant trois variables : le temps d'extraction, le ratio et la concentration du solvant éthanol. La méthode d'extraction conventionnelle a été utilisée pour l'extraction des composés bioactifs de ces deux plantes.

Notre travail est subdivisé en quatre parties qui sont :

- La première partie comporte les généralités sur plantes médicinales étudiées.
- La deuxième partie est consacrée à l'étude de l'activité antioxydante et l'activité antibactérienne.
- La troisième partie est matériel et méthodes dont laquelle sont résumés les différentes méthodes utilisées pour la réalisation de cette étude.
- La quatrième partie est consacrée aux résultats et discussion. Et enfin on conclut par une conclusion et des perspectives.

## Chapitre I : Les plantes médicinales

### 1. Plantes médicinales

#### 1.1. Définition des plantes médicinales

La définition de la pharmacopée, plus récente, elle définit les plantes médicinales comme des drogues végétales qui peuvent être utilisées entières ou sous forme d'une partie de plante et qui possèdent des propriétés médicamenteuses (Abayomi, 2010).

#### 1.2. Pouvoir des plantes

L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes. Depuis des siècles, les chercheurs ont pu isoler des substances bioactives qu'elles contiennent. Leurs effets sont dus à leurs principes actifs. Ces derniers ont une importance capitale qui permet la mise au point de médicaments (Iserin *et al*, 2001).

#### 1.3. Intérêts d'utilisation des plantes médicinales

Les plantes constituent un immense réservoir de structures nouvelles et originales. Les substances naturelles issues de ces plantes ont des intérêts multiples dans l'industries, en médecine, en pharmacie et en cosmétologie. Ainsi, ces plantes sont de plus en plus utilisées dans les industries alimentaires (Benayad, 2008).

- **Utilisation en médecine :** Selon les estimations de l'organisation mondiale de la santé (OMS), plus de 80 % de la population mondiale, surtout dans les pays en voie de développement, ont recours aux traitements traditionnels pour satisfaire leurs besoins en matière de santé (Abayomi, 2010).
- **Utilisation en alimentation :** Certaines plantes, herbes aromatiques, épices et composés aromatiques sont utilisés dans l'alimentation pour l'assaisonnement, préparation des compléments alimentaires et pour la conservation (Benayad, 2008).

- **Utilisation en cosmétique :** Elles sont utilisées dans la fabrication des produits de beauté, des parfums et des produits hygiéniques...etc (Benayad, 2008).

#### 1.4. Méthodes d'extraction conventionnelles

La méthode de séparation ou de préparation d'une plante médicinale est le mode d'extraction des constituants actifs responsables d'action guérisatrice peuvent avoir un effet sur la quantité et le rendement de ces produits chimiques présents.

Il existe plusieurs modes de préparation et de séparation, les plus courants sont : l'infusion, la décoction et la macération.

##### 1.4.1. Infusion

Une infusion est préparée en versant de l'eau bouillante sur une quantité spécifique de matière végétale, en laissant reposer la mixture pendant 10-15 minutes (Abayomi, 2010).

##### 1.4.2. Décoction

Cette méthode est applicable 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 (Kraft *et al.*, 2004).

##### 1.4.3. Macération

Celle-ci est préparée en plaçant la matrice végétale avec le liquide d'extraction dans un récipient fermé et en le laissant reposer pendant sept jours. Le contenu est alors filtré avant de presser le marc. Les extraits liquides ainsi obtenus sont mélangés. La préparation est clarifiée par précipitation ou filtration (Abayomi, 2010).

## 2. Présentation des plantes médicinales étudiées

### 2.1. *Rhamnus alaternus*

#### 2.1.1. Description morphologique

*Rhamnus alaternus* est une plante qui appartient à la famille des Rhamnacées, localement connue sous le nom de « Imlilles » en Algérie, utilisée en phytothérapie. C'est un arbuste vert, souvent très grand, à feuilles luisantes, ovoïdes ou lancéolées, alternes, lisses, pétiolées (3 à 6 cm de longueur sur 2 à 3 cm de largeur), à bords cartilagineux et dentées. Les feuilles restent sur l'arbre pendant deux années environ. Elles sont coriaces, à nervure médiane épaisse, trinervées à la base ; stipules linéaires, caduques, grappes axillaires plus longues que le pétiole. La tige est dressée et rameuse (**Figure1**), et les rameaux sont alternes, non épineux. C'est une espèce multiflore, à fleurs dioïque verdâtres, disposées en grappes denses, tétra-pentamères, à pétales nuls, très petites. Le fruit sans graine est une drupe à 2 ou 3 sillons extérieurs, rouge puis noire, à 4 noyaux. Elle est rencontrée presque partout, dans les broussailles et les haies ([Battandier et al., 1888](#) ; [Chancerel, 1920](#)).



**Figure 1** : Photographie de *Rhamnus alaternus*.

### 2.1.2. Classification botanique

La classification botanique de *Rhamnus alaternus* est donnée dans le **Tableau I**.

**Tableau I:** Classification botanique de *Rhamnus alaternus* (Yi-Ling *et al.*, 1982).

<b>Règne</b>	Plantae-végétal
<b>Sous règne</b>	Viridiaeplantae-plantes vertes
<b>Classe</b>	Magnoliopsida-dicotyledones
<b>Sous classe</b>	Rhosidae
<b>Super ordre</b>	Rhamnanae
<b>Ordre</b>	Rhamnales
<b>Famille</b>	Rhamnaceae
<b>Genre</b>	Rhamnus
<b>Espèce</b>	<i>Rhamnus alaternus</i>

### 2.1.3. Répartition géographique

*Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) est un arbrisseau caractéristique de la région méditerranéenne (Bas *et al.*, 2005 ; Ben Ammar *et al.*, 2008). Il se développe de façon spontanée sur les coteaux calcaires à une altitude qui varie de 0 à 1000 m. On le trouve dans les pays d'Afrique du nord et sur le littoral de l'Europe méridionale (Aronne *et al.*, 1995).

### 2.1.4. Propriétés thérapeutiques et utilisations

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

### 2.1.5. Composition chimique

Les feuilles de *Rhamnus alaternus* sont constituées de divers composés polyphénoliques, anthraquinones, tanins et en particulier les flavonoïdes (Abegaz et Peter, 1995 ; Ben Ammar *et al.*, 2007).

Ben Guazela *et al.* (2015) ont révélé par l'analyse par la GC-MS la présence d'anthraquinones glycosides (Emodine, le chysofanol, l'alaternine et le physcion) dans l'extrait des racines de *R. alaternus* récoltée à Oud El-Khir (Tunisie) (Ben Guazela *et al.*, 2015).

Bhourri *et al.* (2011) apportent dans leur étude sur la composition chimique de l'extrait des feuilles de *R. alaternus* que ce dernier contient une teneur importante des flavonoïdes glycolysés : le kaempferol 3-O-Bisorhamninoside, le rhamnocitrin 3-O-Bisorhamninoside et rhamnetin-3-O-B-isorhamninoside.

Trois flavonoïdes : kaempferol 3-O-isorhamninoside, rhamnocitrin-3-O-isorhamninoside et rhamnetin-3-O-isorhamninoside, ainsi apigenin, kaempferol et quercetin ont été identifiés par la chromatographie VLC, dans les feuilles de *R. alaternus* récoltées à Tabarka (Tunisie) (Ben Ammar *et al.*, 2009).

L'extrait des feuilles de *R. alaternus* récoltées à Laghouat (Algérie), analysée par HPLC, possède une forte teneur en flavones hétéroside (Stocker *et al.*, 2004).

## 2.2. *Phillyrea angustifolia* L.

### 2.2.1. Description morphologique

*Phillyrea angustifolia* L. est un arbrisseau de la famille des Oléacées, d'une hauteur pouvant atteindre 1,5 à 3 m, à rameaux grêles et élancés, gris ou jaunâtre, à feuillage persistant et étroit (**Figure2**), linéaires-lancéolées ou lancéolées-aiguës (Rameau *et al.*, opposées, coriaces, ayant 4-6 paires de nervures (Bayer *et al.*, 1990).

Les fleurs sont de couleur blanc-jaunâtre ou blanc-verdâtre rapprochées en petite grappe qui est placée à l'aisselle des feuilles, s'épanouissent en avril et mai. Le fruit de *P.*

*angustifolia* est charnu, glauque, noirâtre, il porte à son sommet une petite pointe, à noyaux sont de la grosseur d'un pois à deux graines, mûrissent en août et septembre (Christine, 1999; Bayer *et al.*, 1990).



**Figure 2 :** Photographie de *Phillyrea angustifolia*.

### 2.2.2. Classification botanique

La classification botanique de *Phillyrea angustifolia* est donnée dans le **tableau II**.

**Tableau II :** Classification botanique de *Phillyrea angustifolia* L. (Judd *et al.*, 1999).

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Sous règne</b>	Tracheobionta
<b>Superdivision</b>	Spermaphytes
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Sous-classe</b>	Asteridae
<b>Ordre</b>	Scrophulariales
<b>Famille</b>	Oleaceae
<b>Genre</b>	<i>Phillyrea</i>
<b>Espèce</b>	<i>Phillyrea angustifolia</i> .

### 2.2.3. Répartition géographique

Les oléacées forment une famille d'environ 600 espèces réparties en 24 genres, contenant principalement des arbres et des arbustes et quelques lianes. Leur distribution géographique est très vaste (Johnson, 1957), elles poussent au sud-ouest de l'Asie, au nord de

l'Afrique, dans la partie orientale du bassin méditerranéen, et au sud de l'Europe. C'est une plante endémique qui pousse naturellement dans la région Nord Africaine (tel Algérien et Marocain) (Christine, 1999). Elle préfère le climat chaud ainsi les sols rocaillieux sec et calcaire, croit cependant sur les sols à texture limono-argileuse et dans la région à l'hiver rigoureux. Elle préfère les terrains siliceux (Bayer *et al.*, 1990).

#### 2.2.4. Propriétés thérapeutiques et utilisations

*Phillyrea angustifolia* est une plante médicinale, ces feuilles peuvent être utilisées pour la lutte contre le stress oxydatif, et en tant que insecticides et antibactériens (Munne-Bosch et Pennuelas, 2003). La plante est diurétique, ainsi elle a été employée contre les fièvres intermittentes. Les fleurs sont utilisées pour faire des cataplasmes préconisés contre les maux de tête. Les feuilles ont été utilisées comme emménagogue et en gargarisme (Christine, 1999). Par ailleurs, les feuilles et le fruit de cette plante étaient préconisés comme fébrifuge contre les fièvres intermittentes. Ainsi elles étaient utilisées pour leurs propriétés astringentes et antiseptiques (Judd *et al.*, 1999).

#### 2.2.5. Composition chimique

Les feuilles de *P. angustifolia* récoltées à El Tarf extraite par la méthode conventionnelle, analysés par les tests phytochimique révèlent la présence des Phénols totaux, Tanins totaux, Tanins hydrolysables (Mebirouk-Boudechiche *et al.*, 2015).

Les feuilles de *Phillyrea angustifolia* sont riches en flavonoïdes, les acides phénoliques et les phénols simples, ces dernier sont déterminés par les tests photochimiques et HPLC (Romani *et al.*, 1996).

Une étude menée par Munne-Bosch et Pennuelas. (2003) sur la composition chimique de *P. angustifolia* révèle que les feuilles de *P. angustifolia* possèdent des polyphénols : oleuropeine et ces dérivés :

➤ **Acides phénoliques** : acide salicylique, acide chlorogénique, acide caféïque, acide vanillique, acide syringique et acide élénolique glucoside.

- **Phénols simples** : Hydroxy-tyrosol, dérivés d' hydroxy-tyrosol, oleuropeine aglycone, tyrosol et diméthyle-oleuropeine.

## Chapitre II : Activités antioxydante et antimicrobienne

### 1. Activité antioxydante

#### 1.1. Stress oxydatif

Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène et le système antioxydant d'un organisme (Mata *et al.*, 2007). Il intervient dans l'apparition de diverses pathologies (maladies cardiovasculaires, cancer, diabète,...) (Sies, 1997 ; Pincemail *et al.*, 2002; Defraigne et Pincemail, 2008). Il n'est pas une maladie mais un mécanisme physiopathologique (Benmenni, 2017), Il est induit par l'alimentation inadéquate, tabagisme, obésité ou exercice physique intense (Haleng *et al.*, 2007).

Le terme général de stress oxydatif est utilisé pour décrire une situation de dommages causés par les radicaux libres (Benmenni, 2017).

#### 1.2. Radicaux libres

Les radicaux libres sont des composés moléculaires (espèces réactives d'oxygène ) qui peuvent exister à l'état non combiné (Haleng *et al.*, 2007 ; Defraigne et Pincemail, 2008). Ils sont très instable et ils réagissent rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaîne débute, lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (Kohen et Nyska, 2002).

Ces espèces sont formées de façon continue dans l'organisme sain, en particulier par fuite d'électrons à partir de la chaîne respiratoire. Elles peuvent également être générées suite à une respiration excessive, un exercice physique ou un stress, ou même à une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants : tabac, alcool, amiante,...etc. (Arousseau, 2002).

### **1.3. Antioxydants**

#### **1.3.1. Définition**

Les antioxydants sont toutes les substances endogènes ou exogènes qui représentent un système de protection cellulaire, face à la réactivité des espèces oxygénées (les radicaux libres) (Turgeon *et al.*, 2010 ; Halliwell, 1994).

D'après Shimizu. (2004), un antioxydant est une substance qui peut être ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation. Cette définition peut être élargie et le terme antioxydant englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive.

#### **1.3.2. Classification des antioxydants selon leur nature**

##### **1.3.2.1 Antioxydants synthétiques**

Les antioxydants synthétiques sont des substances obtenues par synthèse, Ils sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Ils sont utilisés dans les formulations contenant des corps gras insaturés. Toutefois, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques en cas d'excès de consommation (Yu *et al.*, 2000).

##### **1.3.2.2 Antioxydants naturels**

Les antioxydants naturels sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures que l'organisme puise par l'alimentation. Ils sont répartis en deux classes :

###### **1.3.2.2.1. Antioxydants endogènes (enzymatiques)**

Les antioxydants endogènes sont des enzymes dont les plus connues sont produites dans le corps humain (Matés, 2000). Ils sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les radicaux libres (Pincemail *et al.*, 2000), constituée de trois enzymes. Il s'agit de la super oxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) (Ivanova, 2000).

### 1.3.2.2 Antioxydants exogènes (non enzymatiques)

Ce système fait appel à des molécules non enzymatiques, les nutriments antioxydants exogènes, telles que les vitamines antioxydantes (vitamine C et vitamine E), les caroténoïdes et les composés phénoliques.

Contrairement aux enzymes antioxydantes, ces composés ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation (Frag *et al.*, 1989).

#### a. Les vitamines

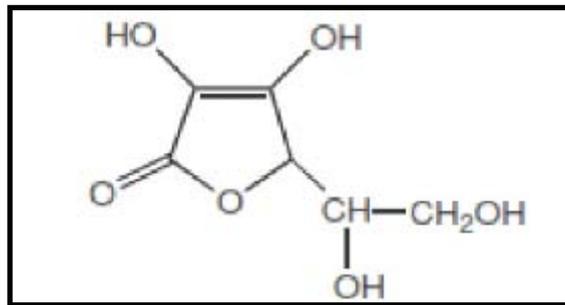
Les vitamines sont des substances organiques importantes au corps en petites quantités, pour son métabolisme, son fonctionnement, sa protection et sa croissance (Barati Elbaz et Le Marechal, 2008).

- **Vitamine E**

Les tocophérols sont une classe de composés phénoliques de nature lipophile (Kline *et al.*, 2001). Le terme vitamine E correspond à deux groupes de molécules de nature lipophile : les tocophérols ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$ -) et les tocotriénols. Seuls les tocophérols présentent une activité antioxydante significative (Lee et Han, 2018). La vitamine E n'est synthétisée que dans les plantes, elle est apportée par l'alimentation (les huiles végétales, les pépins et les grains de blé...) (Kline *et al.*, 2001).

- **Vitamine C**

La vitamine C est un antioxydant hydrosoluble puissant, elle intervient dans les réactions de la neutralisation des radicaux libres (Man et Rohm, 1999). Elle peut exister sous deux formes, une forme réduite (l'acide ascorbique) et la forme oxydée (l'acide déshydroascorbique), qui permettent le transfert d'un ou deux électrons (Cheick Traoré, 2006).



**Figure 3** : Structure chimique de la vitamine C (Diallo, 2005).

### b. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont un ensemble de molécules qui ne sont pas strictement nécessaires à la survie d'une plante. Ils sont généralement des molécules de taille et de masse faibles comparées aux molécules du métabolisme primaire (glucides, lipides et acides aminés). Ils sont majoritairement la source d'odeurs jouant le rôle à la fois de répulsif envers les prédateurs (concurrents écologiques) et d'attractif, de pigments permettant de capter le rayonnement solaire mais aussi de protéger la plante contre ce rayonnement (Soutour, 2010).

- **Caroténoïdes**

Les caroténoïdes sont des micronutriments, de nature lipophile qui participent aux défenses de l'organisme contre les espèces oxygénées (radicaux libres) et à la coloration de nombreux fruits et légumes (couleur jaune au rouge orangé) (Halliwell, 1996 ; Nicol *et al.*, 2000 ; Jean *et al.*, 2003) . Les caroténoïdes font partie de la famille des tétraterpenoïde, sont essentiellement des piègeurs de l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) (Stahl *et al.*, 2004 ; Colin, 2008).

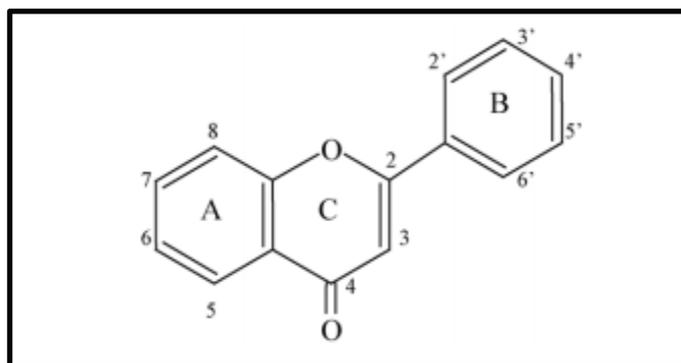
- **Les polyphénols**

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des végétaux qui déterminent la qualité des fruits, des légumes et d'autres plantes. Ils sont constitués d'un cycle aromatique avec un ou plusieurs groupes hydroxyles. Certains composés phénoliques sont des molécules simples de faible poids moléculaire, tandis que d'autres sont des polymères (Liyana-Pathirana et Shahidi, 2005). En effet, les polyphénols sont considérés comme des

xénobiotiques non nutritifs, ils exercent diverses activités biologiques, telles que les effets antioxydants et anti-inflammatoires, la prévention des maladies neurologiques, cardiovasculaires, intestinales chroniques, diabète et maladie d'Alzheimer, l'amélioration de la mémoire et de la fonction cognitive (Juanying *et al.*, 2019).

### ➤ Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont omniprésents dans les cellules photosynthétisantes (Cushnie *et al.*, 2005). Ils se retrouvent couramment dans le règne végétal avec 8000 composés chimiques distincts identifiés dont plusieurs possèdent des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoire et préventives de maladies cardiovasculaires (Erlund, 2004 ; Wang *et al.*, 2002).



**Figure 4** : Structure de base des flavonoïdes (Cushnie *et al.*, 2005).

### ➤ Tannins

Les tannins sont des polyphénols trouvés dans les espèces végétales. Ils sont solubles dans l'eau contrairement à la plupart des autres composés phénoliques (Spencer *et al.*, 1988). Ils peuvent s'accumuler en grandes quantités dans certains tissus et dans n'importe quelle partie de la plante (feuilles, racine ou fruits...) (Haslam, 1989). Il existe deux groupes des tannins, ils sont répartis selon leur structure : les tannins condensés et les tannins hydrolysables. Toutes les plantes contenant des tannins ont un avantage évolutif sur leurs ennemis. Ils peuvent dissuader les plantes de la prédation et de micro-organismes en augmentant la résistance contre les agents pathogènes en protégeant les tissus essentiels (Scalbert, 1991).

## 1.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Les plantes sont reconnues pour leur activité antioxydante grâce à leurs composés phénoliques.

### 1.4.1. Méthode de piégeage du radical libre DPPH

Le composé chimique 2,2- diphenyl -1-picrylhydrazyle (DPPH) possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Popovici *et al.*, 2009). Il se colore en bleu violet lorsqu'il est dissout dans l'éthanol ou le méthanol. Il est utilisé pour la détermination de l'activité antioxydante. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette due à une réduction des radicaux DPPH, mesurable par spectrophotométrie entre 515 et 518 nm. En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH de couleur violette se réduit en 2,2 diphenyl -1- picryl hydrazine de couleur jaune (Chun *et al.*, 2005).

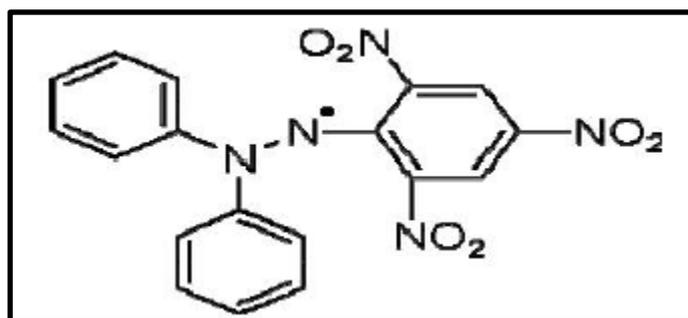


Figure 5 : Structure chimique du radical libre DPPH (Popovici *et al.*, 2009).

### 1.4.2. Méthode de réduction de l'ion ferrique FRAP (Pouvoir réducteur)

Cette méthode est fondée sur la capacité des extraits à réduire le fer ferrique dans le complexe ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) par les antioxydants qui donne la couleur bleue pour le complexe produit ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ). Le mécanisme est connu comme étant un indicateur de l'activité réductrice d'électron caractéristique de l'action antioxydante des polyphénols (Benzie, 1999).

### 1.4.3. Phosphomolybdate d'ammonium

Le test de phosphomolybdate d'ammonium est une méthode quantitative pour évaluer la capacité antioxydante totale. Il est basé sur la réduction du  $\text{Mo}^{6+}$  en  $\text{Mo}^{5+}$  avec la formation d'un complexe phosphate- $\text{Mo}^{5+}$  de couleur verte avec une absorption maximale à 695 nm (Bougatef *et al.*, 2009; Nabet *et al.*, 2017).

## 2. Activité antimicrobienne

### 2.1. Définition de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne c'est la capacité des agents antibactériens présents dans un végétal à détruire les microorganismes pathogène. Les effets antibactériens de ces agents comprennent une gamme de processus différents, tels que la destruction physique de la paroi cellulaire bactérienne ou l'oxydation des acides aminés et des protéines au sein des microorganismes (Wang *et al.*, 2018).

### 2.2. Antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances naturelles d'origine biologique utilisées pour traiter les maladies causées par les microbes aux organismes eucaryotes, y compris l'être humain (Alkhulaifi *et al.*, 2018).

La présence d'antibiotiques dans le système microbien peut entraîner des changements génétiques ou mutationnels dans les bactéries normalement sensibles, permettant à la bactérie de survivre et de proliférer davantage en tant que bactéries résistantes aux antibiotiques (BRA) qui sont porteurs de gènes résistants aux antibiotiques (Yujie Ben *et al.*, 2018).

### 2.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

#### 2.3.1. Méthode de diffusion de disque

Cette méthode est utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits. Bien qu'elle soit reconnue comme fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape

préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs (Fawzia Beddou, 2015).

Le principe de cette technique est basé sur le dépôt de disque en cellulose imprégné de l'agent antibactérien à tester sur des boîtes de Pétri contenant la gélose Muller Hinton où des souches bactériennes ont été déjà ensemencées. Les boîtes sont ensuite incubées à l'étuve. L'activité antibactérienne est évaluée par la mesure de la zone de clarification en mm tout autour des disques (Matuschek *et al.*, 2014).

#### **2.4.2. Méthode de microdilution**

La technique de microdilution est une méthode de référence quantitative couramment utilisé pour déterminer les CMI (Clsi, 2009).

Cette méthode consiste à distribuer dans une série de tubes à hémolyse l'inoculum bactérien contenant des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, sauf un tube qui servira de témoin positif. Une observation à l'oeil nu est ensuite réalisée, après une incubation. On dit que la culture est positive dans les tubes où le trouble est nettement visible. La CMI est indiquée par le tube qui contient la plus faible concentration d'antibiotique où aucune croissance n'est visible (Ganière *et al.*, 2004 ; Kamagate *et al.*, 2001).

## Chapitre III : Matériel et Méthodes

### 1. Matériel végétal

Notre étude est effectuée sur deux plantes algériennes à savoir *Rhamnus alaternus* et *Phillyrea angustifolia* qui appartiennent à la famille des Rhamnaceae et à la famille des Oleaceae, respectivement.

#### 1.1. Récolte

Les feuilles de *Rhamnus alaternus* et de *Phillyrea angustifolia* ont été collectées dans la région de Tighzert (Béjaïa) (à 32 Km de la cote ouest) durant la période de floraison, en mois de Mars 2019. Les caractéristiques écologique du lieu de récolte des deux plantes sont regroupées dans le **Tableau (III)**.

**Tableau III** : Caractéristiques écologiques du lieu de récolte des plantes.

Lieu bioclimatique	Espèces	Latitude	Longitude	Altitude	Zone
Tighzert	<i>P.angustifolia</i>	N36° 51' 01.05	E4° 52' 59.93	30	Méditerranéenne
Tighzert	<i>R.alaternus</i>	N36° 51' 01.05	E4° 52' 59.93	30	Méditerranéenne

Le site de la récolte est une zone boisée montagneuse, éloignée de toutes sources de pollution. Le choix du matériel végétal utilisé dans notre étude est principalement basé sur :

- L'abondance des deux espèces *P. angustifolia* et *R. alaternus* dans la région de Béjaïa ;
- La richesse de ces variétés en composés phénoliques ;
- Utilisation en médecine traditionnelle.

#### 1.1 Séchage

Après avoir enlevé les tiges et se débarrassé des mauvaises herbes, les feuilles des deux plantes récoltées ont été dépoussiérées et rincées avec de l'eau distillée, puis séchées à l'étuve à 40°C pendant 3 jours.

L'intérêt du séchage est de diminuer l'humidité qui favorise la fermentation microbienne de feuillage et le développement des moisissures. Ainsi il empêche l'action de polyphénols-oxydases et de glycosidases qui dégradent les composés phénoliques (Escribano-Bailon et Santos-Buelga, 2003).

## 1.2 Broyage et tamisage

Le matériel végétal séché a été broyé par un broyeur électrique (Severin Elektogerate GmbH, Allemagne) puis tamisé à l'aide d'un tamis de 250 µm de diamètre d'ouverture. La poudre obtenue est stockée dans des flacons en verre étiquetés et fermés pour protéger la poudre contre l'humidité et l'attaque par les moisissures.

## 2. Analyses phytochimiques

### 2.1. Test d'humidité

Pour estimer la teneur en eau dans le matériel végétal étudié (feuilles des deux plantes), 2g de feuilles ont été portés dans un humidimètre pendant un temps bien déterminé. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque plante. Le taux d'humidité de chaque plante est donné directement par l'appareil en pourcentage.

### 2.2. Dosage des caroténoïdes

#### 2.2.1. Principe

L'extraction des caroténoïdes comporte deux phases : une phase apolaire (hexanique) qui permet de récupérer les caroténoïdes et une phase polaire (acétone et éthanol) pour éliminer les molécules hydrophiles (BachirBey, 2006). Le système de doubles liaisons conjuguées au niveau de la longue chaîne des caroténoïdes explique l'aptitude de ces composés à absorber la lumière visible, il confère à ces molécules leur couleur attractive permettant ainsi leur qualification et quantification mais aussi les rendent très susceptibles à l'oxydation (Rodriguez-Amaya, 2001).

### 2.2.2. Mode opératoire

Le dosage des caroténoïdes des deux plantes étudiées a été réalisé selon la méthode décrite par [Sass-Kiss \*et al.\* \(2005\)](#). 1 g de la poudre sèche a été mis dans un bécher de 50 mL, auquel un volume de 20 ml du mélange constitué de n-hexane/acétone/éthanol (2/1/1)(v/v/v) a été rajouté puis déposer à l'abrit de la lumière, ce dernier a été mis pour une agitation pendant 10 min. Une fois la séparation des deux phases (phase solide et liquide) est obtenue, la phase solide (surnageant) a été récupéré , puis, les mêmes étapes précédentes ont été appliqué deux fois (extraction par épuisement). Après filtration, l'extrait obtenu a été récupéré dans une ampoule à décanter, auquel, un volume d'hydroxyde de potassium de 10% (KOH) (10 g de KOH dans 100 ml d'éthanol) a été rajouté pour précipiter les chlorophylles et alors le mélange a été lavé avec de l'eau distillée. La phase hénanique (de couleur jaune) a été récupérée. L'absorbance a été mesurée à 450 nm. Les teneurs en caroténoïdes ont été déterminée on se référent à la courbe d'étalonnage qui a été préparée avec le  $\beta$ -carotène (**Annexe 1**). Les résultats sont exprimés en mg équivalent  $\beta$ -carotène/g de matière sèche (mg Eq  $\beta$ -car/g MS).

## 3. Optimisation des conditions d'extraction

### 3.1. Modèle expérimental

Afin d'optimiser les conditions optimales d'extraction de la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits des deux plantes étudiées un plan d'expérience à 15 tests dont trois points centraux a été réalisé à l'aide d'un logiciel StatgraphicsCenturion XVI (Statpoint Technologies, USA). Trois variables indépendantes le temps d'extraction (30, 75, 120 min), la concentration en solvant (pourcentage en éthanol) (%EtOH) (0, 50, 100%) et le ratio (masse de la poudre en gramme utilisée dans un volume de 15 mL de solvant) (g/15mL) (1, 1,5, 2 g/15 mL) ont été étudiées. Ainsi deux réponses qui sont la teneur en polyphénols totaux (TPT) (mg EAG/g MS) et le piégeage du radical libre DPPH ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ont été déterminées (**Tableau IV**).

L'optimisation des conditions d'extraction est réalisée avec la méthode de surface de réponse (RSM) et le plan mathématique de Box-Behnken ([Khajeh, 2009](#)).

**Tableau IV:** Plan d'expériences utilisé pour l'extraction des composés bioactifs des deux plantes étudiées.

Test	Ratio(g/15ml)	Solvant (% Ethanol)	Temps (min)
01	01	0	75
02	02	50	120
03	01	100	75
04	02	100	75
05	1,5	0	30
06 <sup>a</sup>	1,5	50	75
07	1,5	100	120
08 <sup>a</sup>	1,5	50	75
09	01	50	30
10	02	0	75
11	1,5	100	30
12	02	50	30
13	1,5	0	120
14	01	50	120
15 <sup>a</sup>	1,5	50	75

<sup>a</sup>: Points centraux du plan d'expériences

### 3.2. Application de plan Box-Behnken (BB)

L'optimisation de la méthode d'extraction est réalisée en utilisant le plan BB avec trois niveaux (-1, 0, +1). Cette conception a été employée afin d'évaluer les paramètres les plus significatifs sur l'extraction (Telli *et al.*, 2010), et de trouver les conditions d'extraction optimales. Afin d'évaluer les meilleures conditions pour l'extraction des polyphénols totaux et l'activité antioxydante, trois variables indépendantes ont été choisies comme pertinentes : le ratio, le pourcentage en solvant et le temps d'extraction, respectivement désignées par X1, X2 et X3 (Tableau V).

**Tableau V :** Niveaux des trois paramètres choisis (Khajeh, 2009).

	-1	0	+1
X1 (g/15ml)	1	1,5	2
X2 (%)	0	50	100
X3 (min)	30	75	120

Le plan Box-Behnken comprend 15 essais dont chaque essai est répété trois fois. Les niveaux bas, moyen et haut de chaque variable sont désignés par -1, 0 et +1, respectivement.

#### 4. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques contenus dans la matrice végétale (les feuilles des plantes étudiées) a été faite par la méthode conventionnelle.

##### 4.1. Principe

L'extraction par solvant consiste à séparer les composés phénoliques contenus dans les feuilles de *R. alaternus* et *P. angustifolia* par diffusion du solvant à travers la matrice végétale solide. Ce procédé est généralement utilisé pour l'extraction des polyphénols, les huiles essentielles et les alcaloïdes à partir des matières végétales diverses (Lapornik *et al.*, 2005).

##### 4.2. Mode opératoire

L'extraction des composés bioactifs de *Phillyrea angustifolia* et *Rhamnus alaternus* a été faite par la méthode d'extraction conventionnelle par macération. Une quantité de poudre de chaque plante étudiée a été introduite dans un erlenmeyer contenant 15 ml de solvant d'extraction. Le mélange obtenu est agité pendant un temps bien déterminé à température ambiante en respectant les conditions définies par le plan d'expériences regroupé dans le **Tableau IV**, puis centrifugé à 60 rpm pendant 15 min et filtré. L'extrait récupéré est stocké dans des tubes à essai étiquetés, fermés et conservés dans un congélateur afin d'empêcher la dégradation des extraits.

#### 5. Dosage des composés phénoliques

##### 5.1. Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). Lors de l'oxydation, il est réduit en un mélange d'oxyde bleu de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $MO_8O_{23}$ ) (Ribéreau-

Gayon, 1968). La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait analysé (Madi, 2010).

## 5.2. Mode opératoire

Le dosage des composés phénoliques pour les différents extraits des deux plantes étudiées a été effectué selon la méthode décrite par Nabet *et al.* (2019). 20 µl de chaque extrait dilué au préalable à 1/10 est mélangé avec 120µl d'eau distillée, puis 100µl de réactif de Folin-ciocalteu ont été ajoutés. Après une minute d'agitation, 300µl de solution de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à 20% ont été ajoutés avec 380 µl d'eau distillée. Le mélange est incubé pendant deux heures à l'obscurité et à température ambiante. La lecture des absorbances a été faite à 750 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Vis (Evolution 600, pays de fabrication). La teneur en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage qui a été préparée avec l'acide gallique (Annexe 2). Les résultats sont exprimés en mg équivalents d'acide gallique/g de matière sèche (mg EAG/g MS).

## 5.3. Dosage des flavonoïdes

### 5.3.1. Principe

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ). Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium) (Bahorun *et al.*, 1996). L' $\text{AlCl}_3$  forme un complexe très stable avec les groupements hydroxydes (OH) des phénols, ce complexe jaune absorbe la lumière visible à une longueur d'onde de 430 nm (Ribéreau-Gayon, 1968).

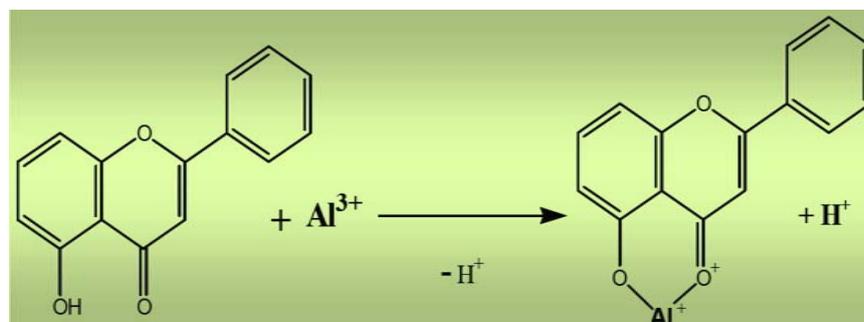


Figure 6: Mécanisme de réaction du chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes (Ribereau- Gayon, 1968).

### 5.3.2. Mode opératoire

La teneur en flavonoïdes des extraits des feuilles de *R. alaternus* et *P. angustifolia* obtenus dans les conditions optimales d'extraction avec le plan d'expériences a été estimée par un dosage colorimétrique selon la méthode décrite par [Djeridane et al. \(2006\)](#). 500 µl de la solution de chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) à 2 % ont été additionnés au même volume (500µl) de l'extrait. L'absorbance est lue à une longueur d'onde de 430 nm, après un temps de contact de 15 minutes à température ambiante. 2g de chlorure d'aluminium ont été dissouts dans 100 ml de méthanol afin de préparer la solution de chlorure d'aluminium à 2 %.

Une courbe d'étalonnage (**Annexe 3**) avec la catéchine (0,031 -1,0 mg/ml) a été réalisée afin de déterminer les teneurs en flavonoïdes. Les résultats en flavonoïdes ont été exprimés en mg équivalents quercétine/g de matière sèche (mg EQ/g MS).

## 5.4. Dosage des tannins condensés

### 5.4.1. Principe

Les tannins sont des polymères caractérisés par la présence d'un nombre suffisant de groupes hydroxyphénoliques permettant des combinaisons plus stables avec les protéines et les alcaloïdes. Ces composés sont généralement amorphes, solubles dans l'eau et insolubles dans les solvants organiques apolaires ([Quettier-Deleu et al., 2000](#)). Les tannins donnent des précipités bleu-noir ou brun-verdâtre ([Bruneton, 1999](#)). L'intensité de la couleur est proportionnelle à la teneur en tannins dans l'échantillon ([Harbertson et al., 2010](#)).

### 5.4.2. Mode opératoire

Les teneurs en tannins condensés dans les extraits étudiés ont été déterminées en utilisant la méthode proposée par [Škerget et al. \(2005\)](#). 0,5 mL de l'extrait ont été mélangés avec 2 mL du réactif butanol-HCl (77 mg de FeSO<sub>4</sub> est dissouts dans 500 ml de butanol-HCl (2V :3V)). Le mélange a été incubé à 95°C pendant 15 minutes et l'absorbance est lue à 530 nm

Les résultats sont déterminés à l'aide de la formule suivante en utilisant la cyanidine comme standard. 
$$\left( \frac{\text{Abs} \cdot \text{PM} \cdot 1000}{\epsilon \cdot L} \right) * 1000$$

Avec :

PM : Poids moléculaire de la cyanidine égale à 287,24 g/mol.

$\varepsilon$  : coefficient d'extinction molaire de la cyanidine égale à 34700 l. mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

L : longueur de la cuve (1cm).

Les teneurs en tannins sont exprimées en mg équivalent de cyanidine par g de matière sèche (mg Eq C/ g MS).

## 6. Mesure de l'activité antioxydante

L'estimation de l'activité antioxydante des extraits des deux plantes étudiées est effectuée à l'aide de trois tests différents. Le test du pouvoir réducteur et le test de phosphomolybdate d'ammonium ont été réalisés seulement pour les extraits des deux plantes obtenus dans les conditions optimales d'extraction.

### 6.1. Test de piégeage des radicaux libres DPPH

#### 6.1.1. Principe

Le DPPH est un radical libre stable et accepteur d'électron ou d'hydrogène (Yang *et al.*, 2008). La méthode est basée sur la réduction de la solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène et la formation de la forme non radicalaire DPPH-H (Figure 6) (Gulçin *et al.*, 2006). La capacité de réduction des radicaux DPPH est déterminée par la diminution de son absorbance à 517 nm visuellement perceptible comme une décoloration du violet au jaune (Yang *et al.*, 2008).

#### 6.1.2. Mode opératoire

Le pouvoir réducteur des extraits de *R.alaternus* et *P. angustifolia* sur les radicaux libres DPPH a été déterminé selon la méthode rapportée par Brand-Williams. (1995). Un volume de 1450  $\mu$ l de DPPH préparé avec du méthanol à une concentration de 6.10<sup>-5</sup> mM est additionné à 50  $\mu$ l de l'extrait à tester (dilué à 1/10). Le mélange est incubé à l'abri de la lumière pendant 30 min à température ambiante. La lecture est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à 517

nm. Le pourcentage d'inhibition (I%) des radicaux libres DPPH a été calculé selon la formule suivante :

$$I\% = \frac{Abs\ blanc - Abs\ ech}{Abs\ blanc} * 100$$

Avec :

Abs blanc: Absorbance du contrôle;

Abs ech: Absorbance de l'échantillon.

## 6.2. Test de pouvoir réducteur

### 6.2.1 Principe

Le pouvoir réducteur est l'aptitude des antioxydants présents dans l'extrait à réduire le fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) du complexe ferricyanure en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ). La forme réduite donne une couleur verte proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait (Odabasoglu *et al.*, 2004).

### 6.2.2. Mode opératoire

Le dosage du pouvoir réducteur des extraits des feuilles des deux plantes est effectué selon la méthode décrite par Oyaizu. (1986). Dans un tube, 1250  $\mu$ l de ferricyanure de potassium [ $K_3Fe(CN)_6$ ] à (1%) ont été ajoutés au mélange de 1250  $\mu$ l de tampon phosphate à (pH 6,6 ; 0,2 M) avec 500  $\mu$ l de l'extrait. Le mélange a été mis dans un bain marie à 50°C pendant 20 min, auquel on a ajouté 1250  $\mu$ l d'acide trichloroacétique à 10%. 1250  $\mu$ l du mélange ont été prélevés, auquel par la suite on a rajouté 1250  $\mu$ l d'eau distillée et 250  $\mu$ l de chlorure ferrique ( $FeCl_3$ ) à 0,1 %. La lecture des absorbances a été faite à 700 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Vis (Evolution 600, Union européen).

## 6.3. Test de phosphomolybdate d'ammonium

### 6.3.1 Principe

Le test de phosphomolybdate d'ammonium est une méthode quantitative pour évaluer la capacité antioxydante totale. Il est basé sur la réduction du  $Mo^{6+}$  en  $Mo^{5+}$  avec la formation

d'un complexe phosphate-Mo<sup>5+</sup> de couleur verte avec une absorption maximale à 695nm (Bougatef *et al.*, 2009; Nabet, 2017).

### 6.3.2 Mode opératoire

Le dosage est effectué selon la méthode décrite par Prieto *et al.* (1999). 100 µl de l'extrait des plantes obtenus dans les conditions optimales d'extraction ont été ajoutés à 1000 µl du mélange composé de (0,6 M d'acide sulfurique, 28 mM de phosphate de sodium et 4 mM de molybdate d'ammonium).Après une incubation de 90 min dans un bain marie à 95°C, les solutions obtenues ont été refroidi, puis les absorbances ont été mesurées à 695 nm. La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de la matière sèche (mg EAG/g MS).

## 7. Détermination de l'activité antibactérienne

Six souches bactériennes ont été utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne qui sont : *Salmonella enterica* CIP 813, *Bacillus cereus* 14579, *Escherichia coli* 25922, *Staphylococcus aureus* 29213, *Pseudomonas aeruginosa* 27883, *Klebsiella pneumoniae* 4352. Ces souches sont conservées dans le réfrigérateur dans des tubes à visser contenant le milieu nutritif jusqu'à leur revivification.

### 7.1. Préparation des extraits secs

Les extraits des deux plantes à testée ont été préparé dans les conditions optimales, puis sécher dans l'étuve pendant 3 jours (jusqu'à ce que les extraits devienne sec).

Après avoir des extraits sec, une concentration de 4mg/mL a été préparée dans DMSO. A fin de permettre une meilleure dissolution, les extraits ont été mis dans un bain à ultrasons.

### 7.2. Milieu de culture utilisé

La gélose Mueller Hinton a été utilisée pour l'étude de la sensibilité des souches bactériennes aux extraits de *Rhamnus alaternus* et *Phillyrea angustifolia* obtenus dans les conditions optimales d'extraction avec la méthode d'extraction conventionnelle.

Le milieu de culture Mueller Hinton agar (MH) est stérilisé au préalable dans un autoclave à 121°C pendant 15 min est mis en surfusion dans un bain marie. Ce dernier est coulé dans des boîtes de Pétri puis laissé solidifier (Harrar, 2012).

### 7.3. Standardisation des souches

Après la revivification des souches à testées dans le bouillon nutritif (MH) pendant 24 heures, une standardisation des souches a été réalisée par la méthode de Mac Ferland, par spectrophotométrie à une longueur d'onde entre 600 et 700 nm, pour l'obtention d'une suspension de  $1 \cdot 10^8$  à  $2 \cdot 10^8$  UFC/ml, dont le but d'avoir une charge homogène de toutes les souches étudiées pour pouvoir comparer l'effet antibactérien des extraits étudiés.

### 7.4. Test de diffusion de disque sur gélose

L'activité antimicrobienne a été réalisée en utilisant la méthode de diffusion de disque sur gélose décrite par Matuschek *et al.* (2014), qui est une méthode préliminaire pour vérifier et sélectionner les extraits qui possèdent une activité antimicrobienne contre les souches testées. Cette technique repose sur l'apparition d'une zone d'inhibition sur la gélose Mueller Hinton si la souche testée est sensible à l'extrait.

#### 7.4.1. Ensemencement

- La culture se fait dans un milieu stérile en présence de bec benzen.
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée sèche de haut en bas, ensuite en tournant la boîte de Pétri et répéter la même opération sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Les disques sont déposés sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérilisée au bec benzen.
- Poser sur chaque disque 20 µl d'extrait de *Rhamnus alaternus* ou de *Phillyrea angustifolia* qui sont préparés au préalable à une concentration de 4 mg/1ml sur les disques en papier à l'aide d'une micropipette.

- Pour chaque témoin positif, deux disques d'antibiotiques à testés ont été met dans chaque boîte de pétri à savoir la tetracycline, l'amoxicilline, l'amikacine et l'oxacilline.
- Pour le témoin négatif, deux disques contenant chaqu'un 20 µl de DMSO ont été déposés dans une boîte de pétri.

#### **7.4.2 Incubation et lecture**

Après incubation des boîtes de Pétri pendant 24 heures à 37°C dans l'étuve, les résultats sont calculés en mesurant les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle, les résultats sont exprimés en mm ([Boudjouref, 2011](#)).

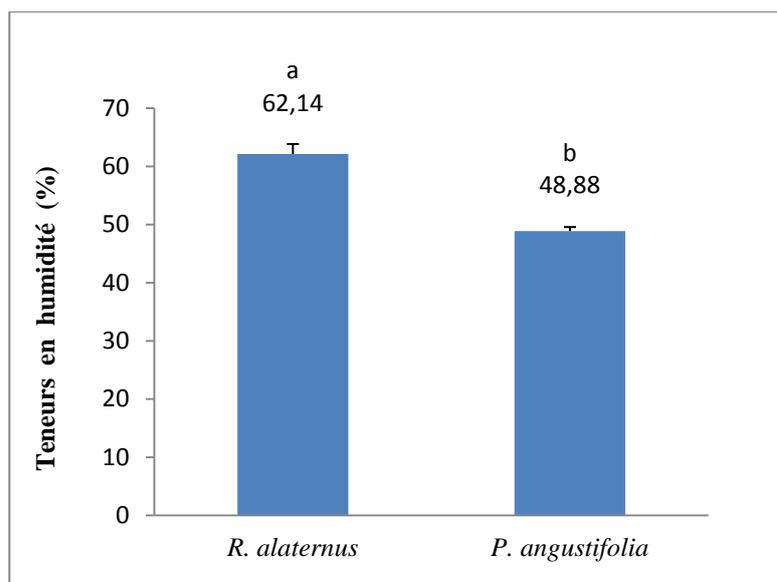
### **8. Analyses statistiques**

Tous les tests effectués ont été triplés. Les moyennes et les écarts types sont calculés avec l'Excel de Microsoft Office 2007. Les résultats des plans d'expériences réalisés pour les deux plantes ont fait l'objet d'une analyse statistique par le logiciel Statsgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies, USA).

## Chapitre IV : Résultats et discussion

### 1. Taux d'humidité

Les teneurs en humidité de *P. angustifolia* et de *R. alaternus* obtenus sont représentés dans la **Figure 7**.



Les résultats qui portent différentes lettres (a>b) montrent une différence significative à  $p \leq 0,05$

**Figure 7** : Teneurs en humidité des plantes étudiées.

L'étude statistique (Test LSD : Low significative difference) montre qu'il existe une différence significative entre les taux d'humidité des deux plantes étudiées.

D'après les résultats obtenus dans la **Figure 7**, on constate que les feuilles de la plante *R. alaternus* possèdent la plus forte teneur en humidité qui est égale à  $62,14 \pm 1,69$  % par rapport à la plante *P. angustifolia* qui est de  $48,88 \pm 0,69$ %. Les deux plantes étudiées ont une forte teneur en eau, ce qui explique le recours à l'élimination de l'eau dans les deux matrices végétales. Selon Ribéreau-Gayon. (1968), l'eau représente une source de dégradation des micronutriments des plantes, comme il engendre les phénomènes d'oxydation et des modifications dans l'équipement enzymatique des plantes.

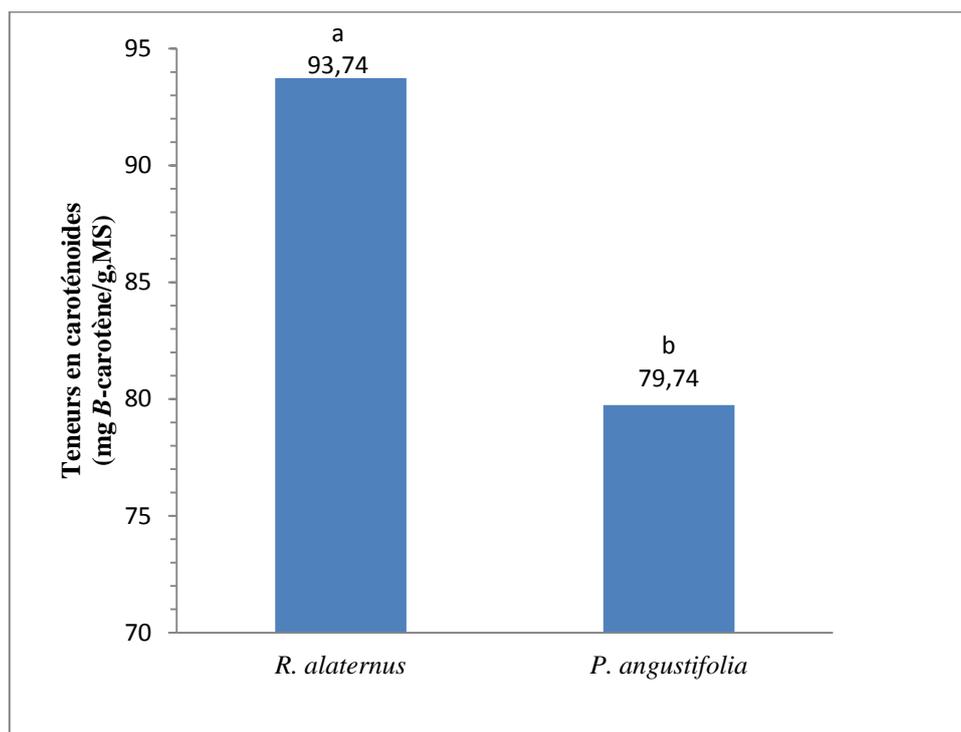
Millal *et al.* (2011) ont rapporté dans leur étude, que la teneur en eau dans les fruits des deux plantes *R. alaternus* et *P. angustifolia* qui ont été récoltées du sahel et le littoral algérois est de  $56,52 \pm 1,58$  et  $62,02 \pm 1,43$ , respectivement.

Debussche *et al.* (1987) ont rapporté que les teneurs en humidité des fruits de *R. alaternus* et de *P. angustifolia* sont de 67% et de 71%, respectivement.

La différence des teneurs en humidité peut être expliquée par la différence de plusieurs paramètres tels que l'espèce étudiée, la partie étudiée de la plante et la saison de la récolte (Debussche *et al.*, 1987 ; Tewksbury, 2002).

### 1. Teneurs en caroténoïdes

Les résultats des teneurs en caroténoïdes des feuilles des plantes étudiées sont regroupés dans la **Figure 8**.



Les résultats qui portent différentes lettres (a>b) montrent une différence significative à  $p \leq 0,05$ .

**Figure 8** : Teneurs en caroténoïdes des plantes étudiées.

Le test de comparaison multiple des moyennes (LSD) montre qu'il existe une différence significative en caroténoïdes entre les deux plantes étudiées à  $p \leq 0,05$ .

D'après les résultats illustrés ci-dessus on constate que la teneur en caroténoïdes d'extrait de *R. alaternus*, qui est de 93,74 mg  $\beta$ -carotène/g MS est plus importante par rapport à celle d'extrait de *P. angustifolia*, qui est d'ordre de 79,74 mg  $\beta$ -carotène/g MS.

[Garcia et al. \(2003\)](#) ont montré dans leur étude que les feuilles d'espèce *R. alaternus* et *P. latifolia* contiennent des teneurs de  $66,2 \pm 11,7$  et de  $48,4 \pm 10,6$   $\mu\text{mol/m}^2$  de feuille, respectivement. Sachant que ces deux plantes ont été traitées par les UV et irriguées. Ces espèces ont été récoltées en mois de janvier et les teneurs en caroténoïdes ont été déterminées par la méthode HPLC.

[Boussahel et al. \(2013\)](#) ont trouvé dans leur étude que la teneur en caroténoïdes de l'extrait de *R. alaternus* est de  $59,64 \pm 3,82$  mg  $\beta$ -carotène/g MS. Cette teneur est inférieure à celle trouvée dans notre étude pour la même espèce.

La différence des teneurs en caroténoïdes peut être expliquée par des différences d'espèce ([Garcia et al., 2003](#)), de la saison de la récolte et de la méthode utilisée ([Garcia et al., 2003](#) ; [Boussahel et al., 2013](#) ; [Kosalec et al., 2013](#)).

### **3. Optimisation de la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante de *P. angustifolia***

Les résultats de réponses étudiées (TPT, DPPH) pour les différents tests proposés par le logiciel statgraphics de l'extrait de *Phillyrea angustifolia* sont représentés dans le tableau suivant.

**Tableau VI** : Plan d'expérience et résultats de réponses étudiées pour l'extrait de *Phillyrea angustifolia*.

Test	Temps (min)	% (EtOH)	Ratio (poudre/solvant) (g/15mL)	TPT(mgEAG/g MS)	DPPH (µg/mL)
1	75	0	1	43,6	28,63
2	120	50	2	55,67	54,35
3	75	100	1	49,35	55,69
4	75	100	2	43,15	56,49
5	30	0	1,5	48,52	51,83
<b>6<sup>a</sup></b>	75	50	1,5	64,17	53,17
7	120	100	1,5	58,34	56,4
<b>8<sup>a</sup></b>	75	50	1,5	68,8	52,69
9	30	50	1	55,85	51,55
10	75	0	2	52	48,12
11	30	100	1,5	66,83	51,6
12	30	50	2	94,02	51,12
13	120	0	1,5	52,11	36,76
14	120	50	1	67,97	51,6
<b>15<sup>a</sup></b>	75	50	1,5	72,23	50,79

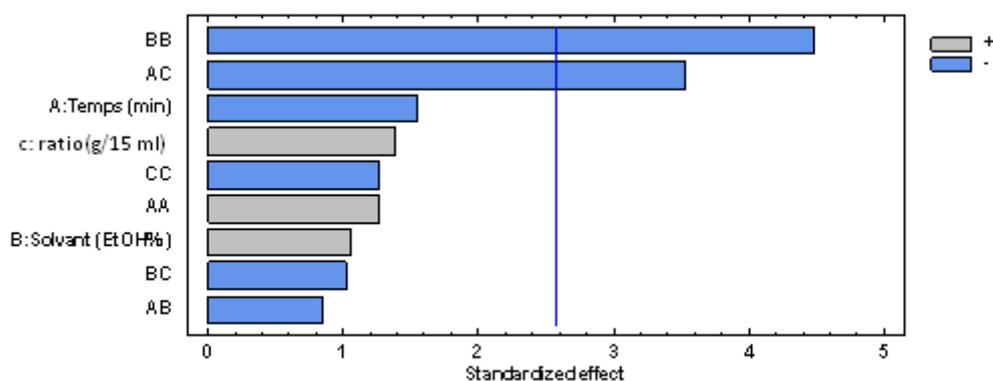
<sup>a</sup> : Points centraux du plan d'expériences.

### 3.1. Optimisation de la teneur en polyphénols totaux

Les teneurs en composés phénoliques des extraits de *P. angustifolia* sont variables en fonction des variables indépendantes étudiées (**Tableau VI**).

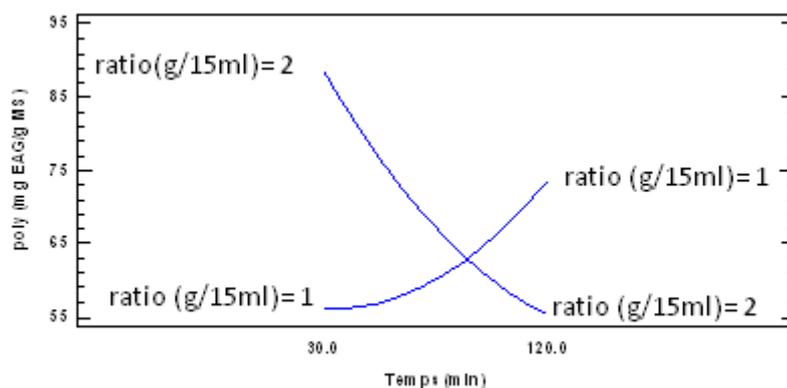
La plus forte teneur en polyphénols totaux de l'extrait de *P. angustifolia* est obtenue à un temps d'extraction de 30 min, 50% EtOH et un ratio de 2, avec une teneur de 94,02 mg EAG/g MS. Par contre, la plus faible teneur en polyphénols totaux est obtenue dans les conditions d'extraction suivantes : 75 min, 100% EtOH, un ratio de 2 et 75 min, 0% EtOH et un ratio de 1 avec une valeur de 43 mg EAG/g MS (**Tableau VI**).

L'étude statistique montre que l'effet quadratique du solvant possède un effet significatif négatif sur la teneur en polyphénols totaux des extraits de *P. angustifolia* obtenus par la méthode conventionnelle. Par contre, les variables temps d'extraction, concentration en solvant et le ratio n'ont aucun effet significatif sur la teneur en polyphénols des extraits de *P. angustifolia* (**Figure 9**).



**Figure 9 :** Diagramme de Pareto des polyphénols d'extrait de *P. angustifolia*.

Ainsi il existe une interaction entre le temps d'extraction et le ratio (concentration de la poudre). En effet, lorsque le ratio est de 1 l'augmentation de temps d'extraction de 30 à 120 min ne fait qu'augmenter la teneur en polyphénols totaux des extraits de *P. angustifolia* de 55 à 75 mg EAG/g MS, respectivement. Tandis que, lorsque le ratio est de 2 la teneur en polyphénols est maximale à un temps d'extraction de 30 min avec une valeur de 89 mg EAG/g MS. L'augmentation de temps d'extraction diminue la teneur en polyphénols jusqu'à atteindre une valeur minimale de 55 mg EAG/g MS à un temps d'extraction de 120 min (Figure 10).



**Figure 10 :** Interaction entre le ratio et le temps d'extraction et leur effet sur la teneur en polyphénols de *phillyrea angustifolia*.

La plus forte teneur en polyphénols totaux de l'extrait de *Phillyrea angustifolia* qui est de 88,46 mg EAG/g MS, proposée par le model ( $R^2 = 89,68\%$ ) dont les conditions optimales sont : 30 min, 53% EtOH et un ratio de 2.

Le résultat trouvé par [Mebirouk-Boudechiche et al. \(2015\)](#) pour l'espèce *P. angustifolia* récoltée en Algérie montre que la teneur en polyphénols totaux est de 29,23 mg équivalent acide tannique/g MS. Cette dernière est inférieure par rapport à celle obtenue dans notre étude dans les conditions optimales d'extraction (79,40 mg EAG/g MS).

La teneur en composés phénoliques de l'extrait d'*Olea dioica* obtenu par le soxhlet est de 9,12 mg EAG/mg ([Pavithra et al., 2013](#)).

La teneur en composé phénoliques de l'extrait méthanolique de *P. latifolia* récoltée en Turquie est de 16,52 mg EAG/g du fruit frais [Ayranci et Erkan \(2013\)](#).

Plusieurs auteurs rapportent que la teneur en polyphénols varie avec la variation de plusieurs paramètres tels que la méthode d'extraction, l'espèce étudiée, la période de récolte, la partie étudiée ([Ayranci et Erkan, 2013](#) ; [Pavithra et al., 2013](#), [Mebirouk-Boudechiche et al., 2015](#)).

### 3.2. Optimisation de l'effet de piégeage du radical libre DPPH

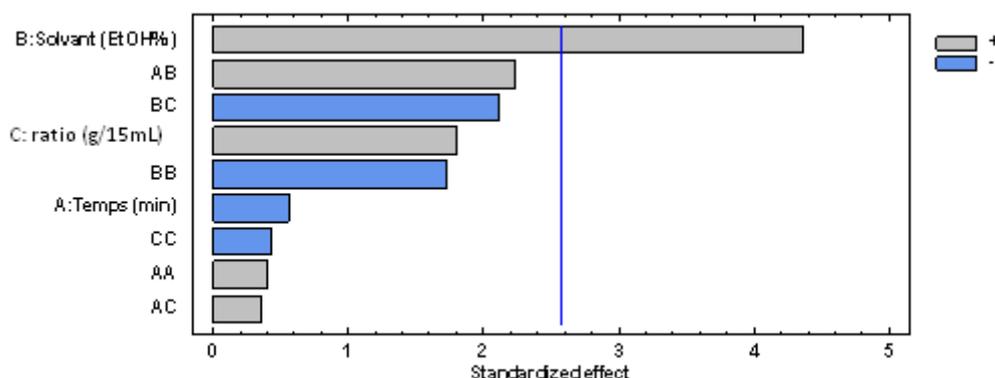
D'après les résultats de l'activité antioxydante regroupés dans le **Tableau VI**, on constate que les variables indépendantes étudiées ont une faible influence sur l'activité antioxydante des extraits de *Phillyrea angustifolia*.

Le plus fort effet de piégeage du radical libre DPPH est obtenu à un temps d'extraction de 75 min, 100% EtOH et un ratio de 2 avec une teneur de 56,49  $\mu\text{g}$  EAG/mL. Par contre, le plus faible effet de piégeage du radical libre DPPH des extraits de *Phillyrea angustifolia* est obtenu dans les conditions d'extraction suivantes : 75 min, 0% EtOH et un ratio de 1 avec une teneur de 28,63  $\mu\text{g}$  EAG/mL (**Tableau VI**).

Statistiquement, la seule variable qui possède une influence significative positive sur l'activité antioxydante des extraits de *Phillyrea angustifolia* est la concentration du solvant

(EtOH%). Par contre, les deux autres variables : temps d'extraction et le ratio n'ont aucun effet significatif sur l'activité antioxydante des extraits de *Phillyrea angustifolia* (**Figure 11**).

Le model ( $R^2 = 87,68\%$ ) propose une valeur maximale de l'activité antioxydante d'extrait de *Phillyrea angustifolia* qui est de  $60,37 \mu\text{g EAG/mL}$  dont les conditions optimales d'extraction sont de 120 min, 100% (EtOH%) et un ratio de 1,23.



**Figure 11** : Diagramme de Pareto pour le test DPPH de l'extrait de *P. angustifolia*.

Ayranci et Erkan. (2013) montre que la capacité de piégeage du radical libre DPPH (IC50) de *P. latifolia* est de  $69,4 \pm 5,8 \mu\text{g/mL}$ . Par ailleurs, un taux de piégeage du radical libre DPPH de l'extrait méthanolique d'*Olea europea subsp maroccana* de 90% a été rapporté par Pavithra et al. (2013) pour une concentration de 25 mg/ml.

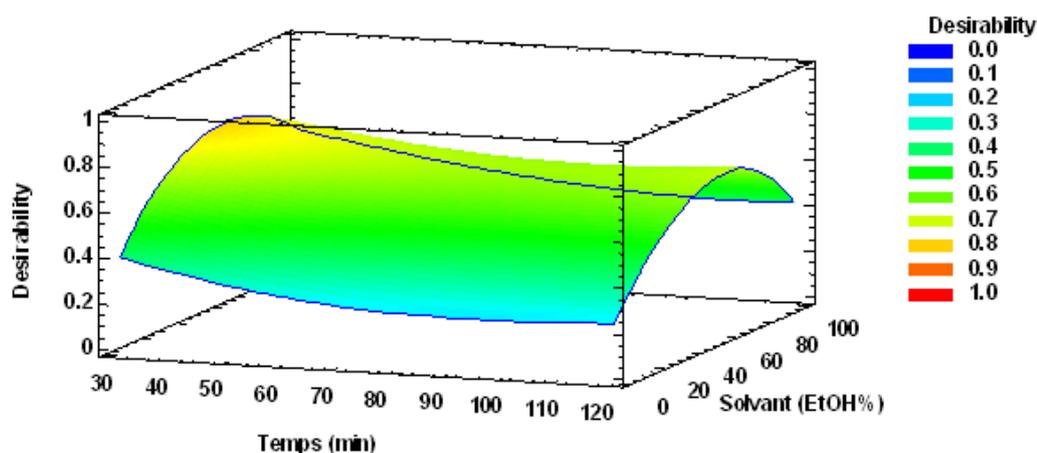
### 3.3. Optimisation des réponses des surfaces multiples des extraits de *P. angustifolia*

Au niveau du **Tableau VII** sont regroupés les résultats prédits et les résultats expérimentaux des réponses étudiées obtenus dans les conditions optimales d'extraction de l'extrait de *Phillyrea angustifolia* par la méthode conventionnelle qui sont : un temps d'extraction de 30 min, un pourcentage en éthanol de 47% et un ratio de 2.

**Tableau VII:** Résultats prédits et expérimentaux des réponses étudiées obtenus dans les conditions optimales d'extraction de *Phillyrea angustifolia* par la méthode conventionnelle.

Réponses	Prédites	Expérimentaux	RSD(%)
DPPH ( $\mu\text{g/mL}$ )	55,20	63,72	10,13
TPT (mg EAG/g MS)	88,22	79,40	7,44

Le model propose un facteur de désirabilité de 0,92% (**Figure 12**) avec une teneur en polyphénols totaux (TPT) de 88,22 mg EAG/g MS et un effet de piégeage du radical libre DPPH de 55,20  $\mu\text{g EAG/mL}$ .



**Figure 12** : Schéma tridimensionnel de la surface de réponse des effets du temps et du solvant sur la désirabilité de l'extrait de *Phillyrea angustifolia* obtenu par la méthode conventionnelle.

Les résultats expérimentaux obtenus sont comme suit : une teneur en polyphénols de 79,40 mg EAG/g MS et une activité antioxydante (DPPH) de 63,72  $\mu\text{g/ml}$ , ces derniers sont proches à ceux prédits par le logiciel (**Tableau 2**). Par conséquent, le modèle proposé par le logiciel statgraphics pour l'optimisation de la TPT et l'effet de piégeage du radical libre DPPH de l'extrait de *P. angustifolia* est validé.

#### 4. Optimisation de la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante de *R. alaternus*

Les résultats de réponses étudiées (TPT, DPPH) pour les différents tests proposés par le logiciel statgraphics de l'extrait de *R. alaternus* sont représentés dans le **Tableau VIII**.

**Tableau VIII:** Plan d'expérience et résultats de réponses étudiées pour l'extrait de *Rhamnus alaternus*.

Test	Temps (min)	% (EtOH)	Ratio (poudre/solvant) (g/15mL)	TPT (mg EAG/g MS)	DPPH (µg/mL)
1	75	0	1	32,73	8,11
2	120	50	2	62,29	81,85
3	75	100	1	59,11	36,74
4	75	100	2	30,37	39,78
5	30	0	1,5	48,63	18,44
6 <sup>a</sup>	75	50	1,5	61,07	71,26
7	120	100	1,5	28,38	45,77
8 <sup>a</sup>	75	50	1,5	54,59	73,16
9	30	50	1	60,69	52,27
10	75	0	2	24,55	21,03
11	30	100	1,5	32,32	35,08
12	30	50	2	48,85	71,98
13	120	0	1,5	24,9	23,5
14	120	50	1	63,05	62,57
15 <sup>a</sup>	75	50	1,5	57,22	74,87

<sup>a</sup>: Points centraux du plan d'expériences.

##### 4.1. Optimisation de la teneur en polyphénols totaux

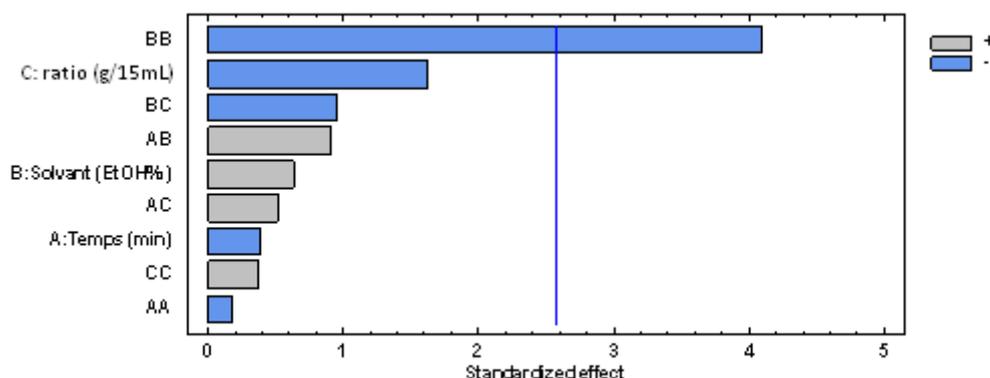
Les variables indépendantes étudiées ont une influence sur la teneur en polyphénols totaux des extraits de *Rhamnus alaternus* (**Tableau VIII**).

La plus forte teneur en polyphénols totaux de l'extrait de *R. alaternus* est obtenue à un temps d'extraction de 120 min, 50% EtOH et un ratio de 1, avec une teneur de 63,05 mg EAG/g MS. Par contre, la plus faible teneur en polyphénols totaux est obtenue dans les conditions d'extraction suivantes : 75 min, 0% EtOH et un ratio de 2, avec une valeur de 24,55 mg EAG/g MS (**Tableau VIII**).

L'étude statistique montre que l'effet quadratique du solvant possède un effet significatif négatif sur la teneur en polyphénols totaux des extraits de *R. alaternus*. Par contre,

les variables temps d'extraction, concentration en solvant et le ratio n'ont aucun effet significatif sur la teneur en polyphénols des extraits de *R. alaternus* (**Figure 13**).

Le model ( $R^2 = 81,77\%$ ) propose une valeur maximale en polyphénols totaux de l'extrait de *Rhamnus alaternus* qui est de 69,24 mg EAG/g MS, dont les conditions optimales d'extraction sont de 30 min, 53% (EtOH%) et un ratio de 1.



**Figure 13** : Diagramme de pareto des polyphénols d'extrait de *R. alaternus*.

Djeridane *et al.* (2007) ont trouvé une teneur en polyphénols de 6 mg EAG/ g MS pour l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *Rhamnus alaternus* récoltée au nord de Laghouat (Algérie).

Une teneur en polyphénols de 7 mg EAG/ g de matière fraîche a été trouvée pour l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* récolté en Tabarka, Tunisie en moi de Novembre (Ben Ammar *et al.*, 2008).

Kosalec *et al.* (2013) ont trouvé une teneur en polyphénols de  $38,4 \pm 1,56$  mg/g pour l'extrait de la même espèce récoltée en mois de juin dans la région de Zagreb, Croatia.

Khettal *et al.* (2014) ont rapporté dans leur étude que l'extrait éthanolique des feuilles de *R. alaternus* a une teneur en polyphénols totaux de  $150 \pm 9,7$  mg EAG/g d'extrait sec. Par ailleurs, une teneur de  $17,13 \pm 0,09$  mg EAG/g MS a été obtenue dans l'extrait méthanolique de *R. alaternus* (Moussi *et al.*, 2015).

Les teneurs en polyphénols de l'extrait de *R. alaternus* rapportées dans la littérature sont différentes à celles obtenues dans notre étude (**Tableau VIII**). Cette différence peut être expliquée par la méthode utilisée, le solvant d'extraction, la saison de la récolte ou les conditions géographiques de la plante (Djeridane *et al.*, 2007 ; Ben Ammar *et al.*, 2008 ; Kosalec *et al.*, 2013 ; Moussi *et al.*, 2015).

#### 4.2. Optimisation de l'effet de piégeage du radical libre DPPH

La concentration en éthanol et le ratio possèdent une forte influence sur l'activité antioxydante des extraits de *R. alaternus*. Par contre, le temps d'extraction possède une faible influence sur l'activité antioxydante des extraits de *R. alaternus* (**Tableau VIII**).

Le plus fort effet de piégeage du radical libre DPPH des extraits de *R. alaternus* est obtenu à un temps d'extraction de 120 min, 50% EtOH et un ratio de 2, avec une teneur de 81,85  $\mu\text{g}$  EAG/mL. Par contre, le plus faible effet de piégeage du radical libre DPPH des extraits de *R. alaternus* est obtenu dans les conditions d'extraction suivantes : 75 min, 0% EtOH et un ratio de 1 avec une teneur de 8,11  $\mu\text{g}$  EAG/mL (**Tableau VIII**).

Statistiquement, la concentration en éthanol possède le plus fort effet significatif positif sur l'activité antioxydante des extraits de *R. alaternus*, suivie par le ratio et le temps d'extraction qui possèdent eux aussi un effet significatif positif. D'autre part, l'effet quadratique du solvant (EtOH%) montre un effet significatif négatif sur l'activité antioxydante des extraits de *R. alaternus* (**Figure 14**).

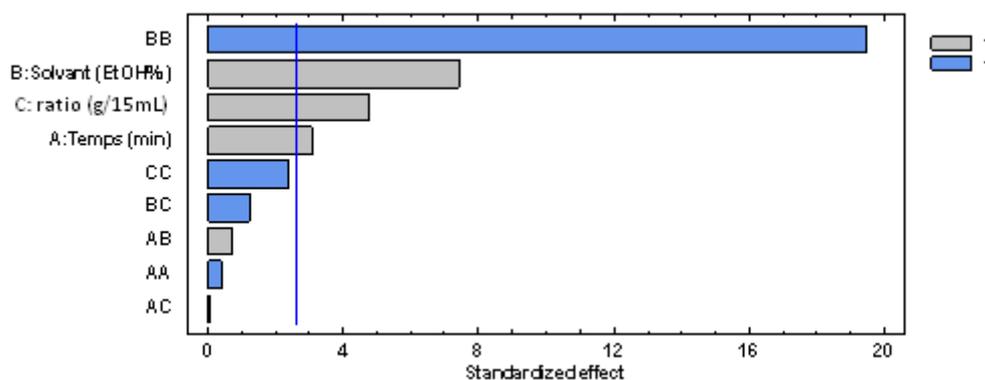
Le model ( $R^2 = 98,95\%$ ) propose une valeur maximale de l'activité antioxydante d'extrait de *R. alaternus* qui est de 79,68  $\mu\text{g}$  EAG/mL, dont les conditions optimales d'extraction sont de 120 min, 56% (EtOH%) et un ratio de 1,81.

Une étude menée par Ben Ammar *et al.* (2008) sur la même espèce récoltée en Tunisie a montré une  $IC_{50}$  de 7 et de 19  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pour les écorces des racines et des feuilles, respectivement..

Kosalec *et al.* (2013) ont montré que l'effet de piégeage du radical libre DPPH de l'extrait de *R. alaternus* est de  $78,7 \pm 3,16$  mg/g. Ainsi, Ashfaq *et al.* (2017) on trouvé dans leur étude un effet de piégeage du radical libre DPPH de 34,7  $\mu\text{g}$  d'acide ascorbique/ml pour

l'extrait méthanolique de *Rhamnus persica*. Ce dernier est deux fois moins important par rapport au résultat obtenu dans les conditions optimales d'extraction dans notre étude (**Tableau IX**).

Par ailleurs, un pourcentage d'inhibition de  $66,83 \pm 3,88$  % des radicaux libres DPPH a été obtenu avec l'extrait méthanolique des feuilles de *Rhamnus alaternus* récoltée à Adekar (Béjaïa) (Moussi *et al.*, 2015).



**Figure 14** : Diagramme de Pareto pour le test DPPH de l'extrait de *R. alaternus*.

#### 4.3. Optimisation des réponses des surfaces multiples des extraits de *Rhamnus alaternus*

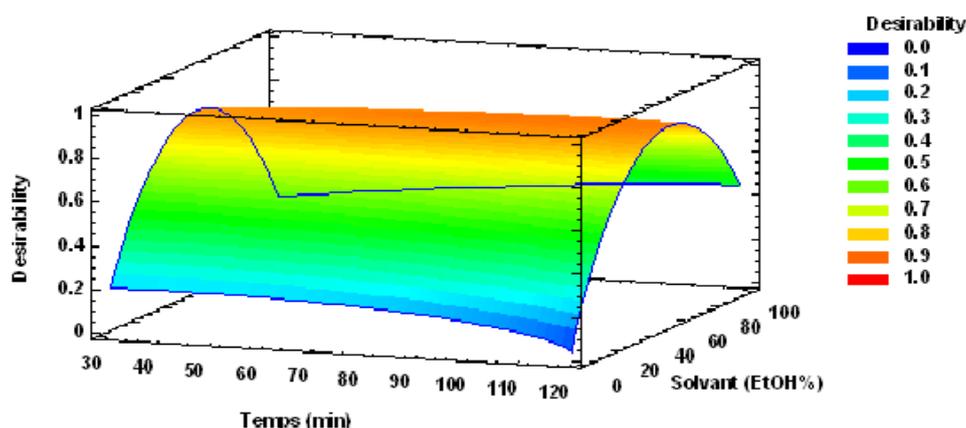
Au niveau du **Tableau IX** sont regroupés les résultats prédits et les résultats expérimentaux des réponses étudiées obtenus dans les conditions optimales d'extraction de l'extrait de *R. alaternus* par la méthode conventionnelle qui sont : un temps d'extraction de 83 min, un pourcentage en éthanol de 58% et un ratio de 1,2.

**Tableau IX** : Résultats prédits et expérimentaux des réponses étudiées obtenus dans les conditions optimales d'extraction de *Rhamnus alaternus* par la méthode conventionnelle.

Réponses	Prédits	Expérimentaux	RSD (%)
DPPH ( $\mu\text{g/mL}$ )	67,29	69,49	2,27
TPT (mg EAG/g MS)	63,05	70,36	7,74

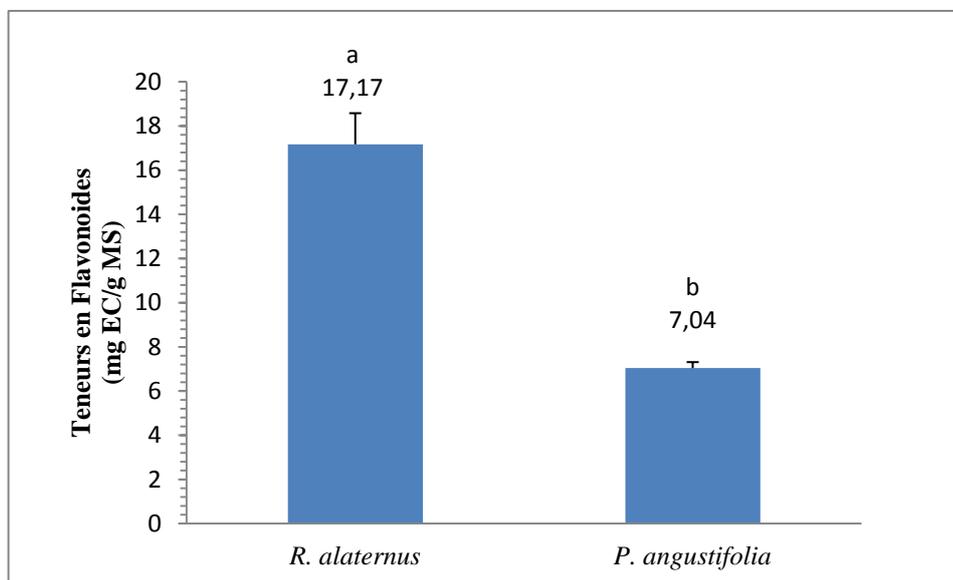
Le model propose un facteur de désirabilité de 0,90% (**Figure 15**) avec une teneur en polyphénols totaux de 63,05 mg EAG/g MS et un effet de piégeage du radical libre DPPH de

67,29  $\mu\text{g}$  EAG/mL. La teneur en polyphénols et l'effet de piégage du radical DPPH expérimentaux de l'extrait de *R. alaternus* trouvés sont de 70,36 mg EAG/g MS et 69,49  $\mu\text{g}$  EAG/mL, respectivement. Ces teneurs sont proches à celles prédites par le logiciel statgraphics (**Tableau IX**), par conséquent le model proposé est validé.



**Figure 15:** Schéma tridimensionnel de la surface de réponse des effets du temps et du solvant sur la désirabilité de l'extrait de *R. alaternus* obtenu par la méthode conventionnelle.

## 5. Teneurs en flavonoïdes



Les résultats qui portent différentes lettres (a>b) montrent une différence significative à  $p \leq 0,05$ .

**Figure 16 :** Teneurs en flavonoïdes des plantes étudiées.

Les résultats des teneurs en flavonoïdes des extraits des deux plantes testées sont regroupés dans la **Figure 16**.

L'étude statistique (Test LSD : Low significative difference) montre qu'il existe une différence significative entre les teneurs en flavonoïdes des deux plantes étudiées.

Les résultats de la **Figure 16** indiquent que la teneur en flavonoïdes dans l'extrait optimisé de *R. alaternus* est plus élevée par rapport à celle de *P. angustifolia* qui est de  $7,04 \pm 0,27$  mg EQ/g MS.

[Moussi et al. \(2015\)](#) ont rapporté dans leur étude une teneur en flavonoïdes de  $60,22 \pm 5,76$  mg EQ/g MS pour l'extrait méthanolique de *R. alaternus*. Cette dernière est trois fois et demie plus importante par rapport à celle obtenue dans notre étude pour la même espèce. Ainsi [Kosalec et al. \(2013\)](#) ont trouvé une teneur en flavonoïdes de  $33,6 \pm 1,50$  mg/g pour l'extrait de *R. alaternus*.

[Khettal et al. \(2014\)](#) ont montré dans leur étude que la teneur en flavonoïde ( $92 \pm 14$  mg E Q/g d'extrait sec) de l'extrait éthanolique de *R. alaternus* est cinq fois plus grande à celle trouvée dans notre étude pour la même espèce.

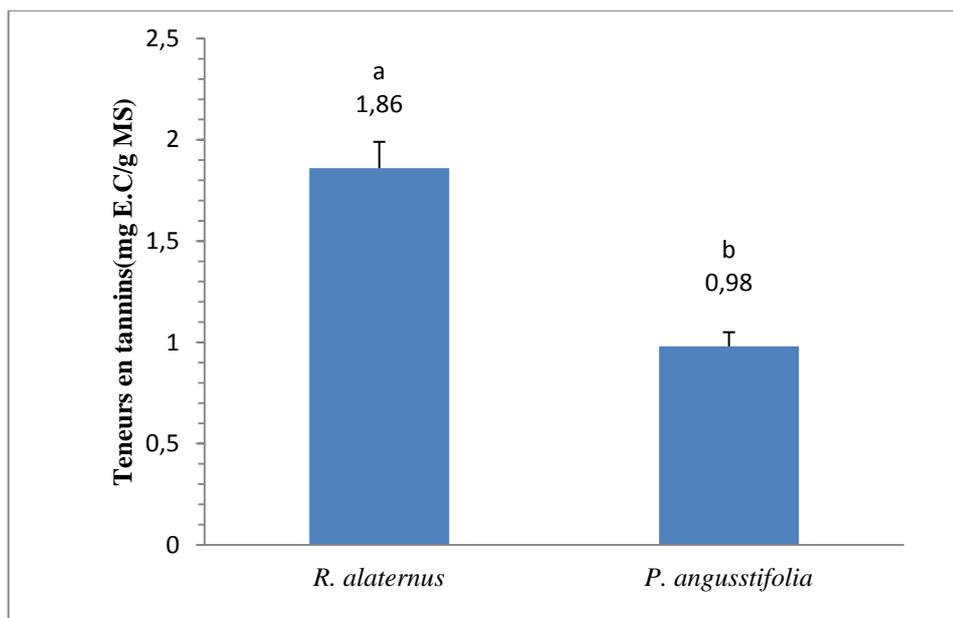
Les feuilles d'*Olea europea subsp maroccana* qui appartient à la famille des Oléaceae possèdent une teneur en flavonoïdes de  $6,72 \pm 0,49$  µg/mg MS ([Amri et al., 2015](#)). Cette valeur est proche à celle trouvée pour l'espèce *P. angustifolia*.

[Tattini et al. \(2005\)](#) ont rapporté une teneur en flavonoïdes de  $15,7 \pm 1,5$  nmol cm<sup>-2</sup> pour l'extrait des feuilles *P. latifolia*.

## 6. Teneurs en tannins condensés

Les résultats des teneurs en tannins condensés des extraits des deux plantes étudiées sont regroupés dans la **Figure 17**.

L'étude statistique montre qu'il existe différence significative en entre les teneurs en tannins des deux plantes à  $p \leq 0,05$ .



Les résultats qui portent différentes lettres (a>b) montrent une différence significative à  $p \leq 0,05$

**Figure 17:** Teneurs en tannins condensés des plantes étudiées.

La teneur en tannins condensés de l'extrait méthanolique de *R. alaternus* récoltée en Tunisie est de  $14,72 \pm 0,38$  % d'acide tannique (Ben Ammar *et al.*, 2007). Par ailleurs, Arsenijević *et al.* (2018) ont rapporté dans leur étude que la plante *Frangula alnus* récoltée en Serbie possède une teneur en tannins condensés de 2,92 % pyrogallol.

Ben Ammar *et al.* (2005) ont déterminé la teneur en tannins condensés de *phillyrea angustifolia* qui est de 11 g équivalent acide tannique/kg MS. Cette teneur est très importante par rapport à celle trouvée dans notre étude qui est de 0,98 mg EC/g MS. Une autre étude rapporte la teneur en tannins condensés de *phillyrea angustifolia* qui est de 1,62 mg équivalent leucocyanidine/g MS (Mebirouk-Boudechiche *et al.*, 2015).

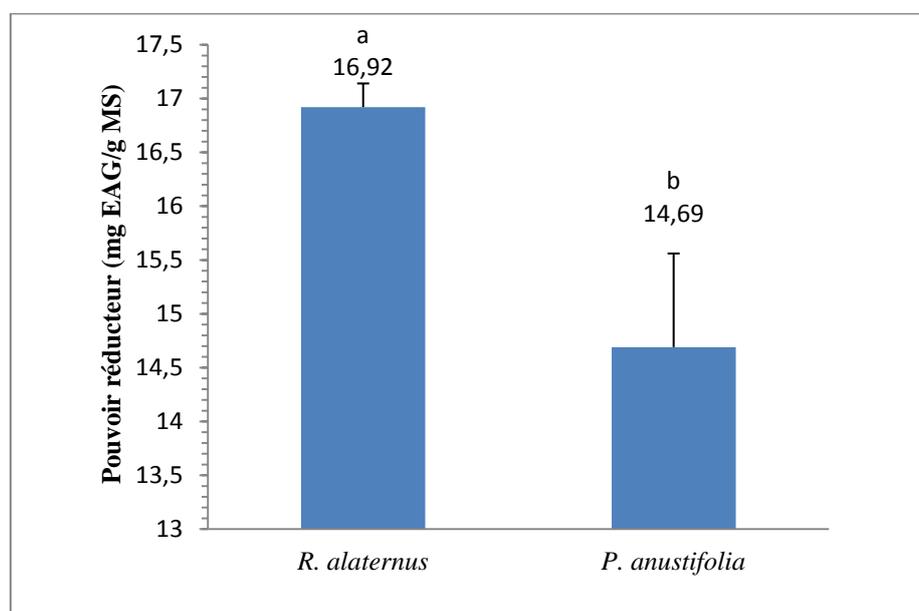
Le résultat trouvé par Mebirouk-Boudechiche *et al.* (2014) pour l'espèce *phillyrea media* récoltée en Algérie est de 18 mg équivalent leucocyanidine/g MS.

## 7. Activité antioxydante des extraits de plantes étudiées

### 7.1. Pouvoir réducteur

Les résultats du pouvoir réducteur des extraits des plantes étudiées sont représentés dans la **Figure 18**.

L'étude statistique (Test LSD) montre qu'il existe une différence significative du pouvoir réducteur des deux plantes étudiées.



Les résultats qui portent différentes lettres (a>b) montrent une différence significative à  $p \leq 0,05$

**Figure 18** : Pouvoir réducteur des extraits des plantes étudiées.

Les résultats de pouvoir réducteur des extraits optimisés des deux plantes testées montrent qu'ils ont une capacité réductrice du fer ferreux en fer ferrique qui est de  $16,92 \pm 0,22$  et  $14,69 \pm 0,87$  mg EAG/g MS pour *R. alaternus* et *P. angustifolia*, respectivement.

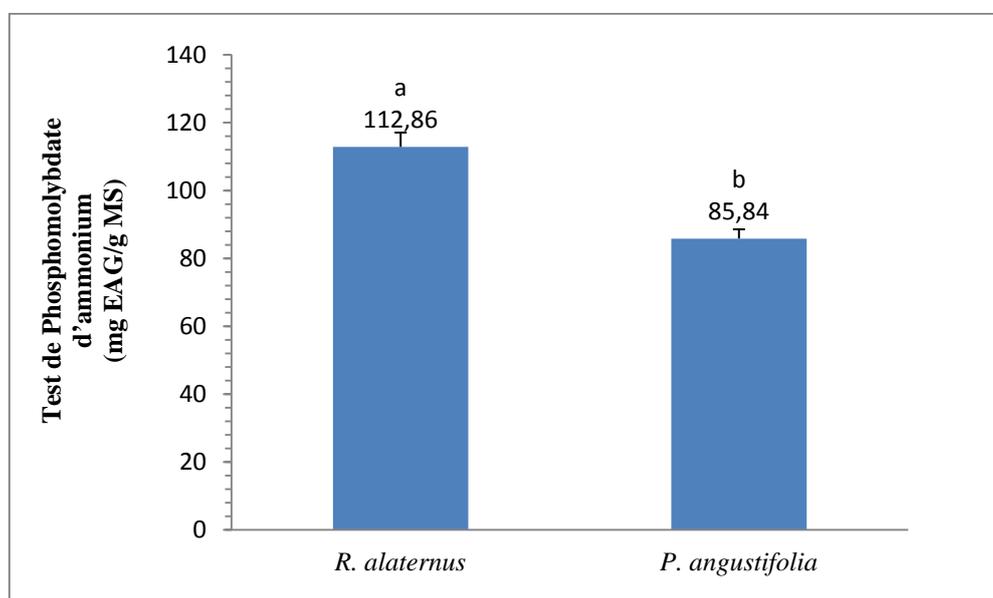
Le kaempférol-3-O-isorhamnoside et le rhamnocitrin-3-O-isorhamnoside isolés dans l'extrait de *R. alaternus* ont un pouvoir réducteur de 33 et 36,8 mg équivalent Trolox/ml à une concentration de 1mg/ml (Bhourri *et al.*, 2012).

L'extrait aqueux de *R. alaternus* possède un pouvoir réducteur de  $344,09 \pm 1,44 \mu\text{mol/g MS}$  (Amri *et al.*, 2015).

L'extrait des fleurs de *Jasminum grandiflorum* (Oleaceae) possède un pouvoir réducteur de  $233 \pm 64 \text{ ml Trolox/g}$  (Dudonne *et al.* 2009).

## 7.2 Test de phosphomolybdate d'ammonium

Les résultats du test de phosphomolybdate d'ammonium qui est utilisé pour la détermination de l'activité antioxydante totale des extraits optimisés des plantes étudiées sont représentés dans la **Figure 19**.



Les résultats qui portent différentes lettres ( $a > b$ ) montrent une différence significative à  $p \leq 0,05$

**Figure 19:** Test de phosphomolybdate d'ammonium des extraits des plantes étudiées.

Le test de comparaison multiple de moyennes (LSD) montre qu'il existe une différence significative ( $a > b$ ) entre les teneurs de l'activité antioxydante totale des deux plantes étudiées à  $p \leq 0,05$  (**Figure 19**).

L'extrait des feuilles de *R. alaternus* obtenu dans les conditions optimales d'extraction montre la plus forte activité antioxydante totale qui est de  $112,86 \pm 4,2 \text{ mg EAG/g MS}$ . Cette

dernière est plus importante par rapport à celle de l'extrait optimisé de *P. angustifolia* qui est de  $85,84 \pm 2,72$  mg EAG/g MS (**Figure 19**).

## 8. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des deux extraits des plantes testées est évaluée par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques. L'absence des halos se traduit par l'absence d'activité et résistance des bactéries testées. Le diamètre d'halos varie en fonction de la souche testée, la nature et la dose de la substance active présente dans les extraits (Orhan *et al.*, 2012).

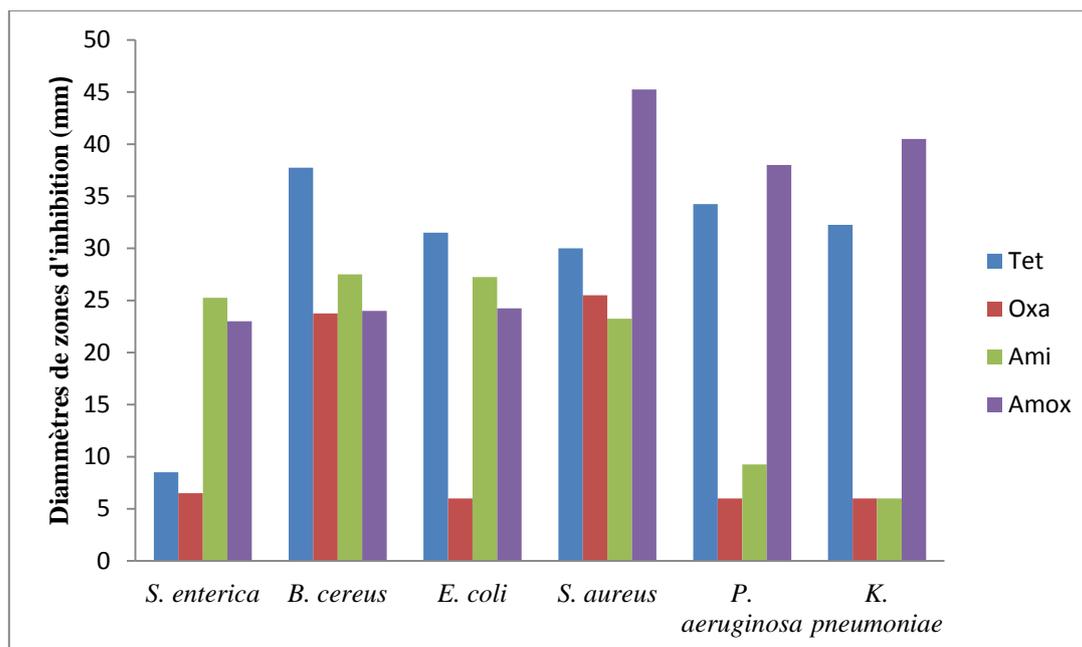
L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par (Bouharb *et al.*, 2014). Ils ont classé les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne de la manière suivante :

- **D < 8 mm** : bactérie non sensible ;
- **9 < D < 14 mm** : bactérie sensible ;
- **15 < D < 19 mm** : bactérie très sensible ;
- **D > 20 mm** : bactérie extrêmement sensible.

### 8.1. Sensibilité des souches testées aux antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme des antibiotiques testés sont représentés dans la **Figure 20**.

Les souches bactériennes à Gram + (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*) et à Gram - (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* et *Klebsiella pneumoniae*) ont montré des sensibilités différentes aux antibiotiques testés : amoxicilline (amox), oxacilline (oxa), tetracycline (tet) et amikacine (ami).



**Figure 20** : Diamètres de zones d'inhibition de quelques antibiotiques sur les souches testées.

La bactérie *S. aureus* est très sensible à l'amoxicilline avec un diamètre de zone d'inhibition de 45,25 mm, alors qu'elle est moins sensible vis-à-vis de tetracycline, oxacilline et amikacine avec des diamètres de zones d'inhibition de 30, 25,5 et 23,25 mm, respectivement. Par ailleurs, les DZI des extraits des deux plantes étudiées obtenus sur la même souche sont très proches à ceux obtenus par l'oxacilline et l'amikacine (**Figure 20** et **21**).

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie à Gram -, elle est relativement résistante à certains antibiotiques tels que oxacilline et amikacine avec des DZI de 6 et 9,25 mm, respectivement. Alors qu'elle est très sensible à la tetracycline et amoxicilline avec des DZI de 34,25 et 38 mm, respectivement.

*Bacillus cereus* a montré une sensibilité décroissante aux antibiotiques suivants : tetracycline (37,75 mm), amikacine (27,5 mm), amoxicilline (24 mm) et oxacilline (23,75 mm).

*Escherichia coli* est une bactérie à Gram - elle est fortement sensible aux différents antibiotiques, tetracycline (31,5 mm), amikacine (27,25 mm) et amoxicilline (24,25). Elle est résistante à oxacilline (6 mm).

*Salmonella enterica* est très sensible à l'amikacine (25,25 mm) et l'amoxicilline (23 mm), et légèrement sensible vis-à-vis de la tetracycline (8,5 mm).

*Klebsiella pneumoniae* est extrêmement sensible à l'amoxicilline (40,5 mm) et à tetracycline (32,25 mm), alors qu'elle est résistante à oxacilline et amikacine.

L'étude menée par Venubabu *et al.* (2010) sur l'effet des antibiotiques sur *S. aureus* a montré des DZI de 15, 0, 14 et 22 mm avec oxacilline (15 mm), amoxicilline (0 mm), amikacine (14 mm), tetracycline (22 mm), respectivement.

Un DZI de 25 mm a été trouvé sur *B. cereus* avec l'antibiotique tetracycline (Tohidpour *et al.*, 2010). Ce résultat est inférieur à celui trouvé dans notre étude sur la même souche (37,75 mm). Par ailleurs, le DZI de l'extrait de *R. alaternus* sur *B. cereus* est supérieur à ceux obtenus par l'oxacilline et l'amoxicilline.

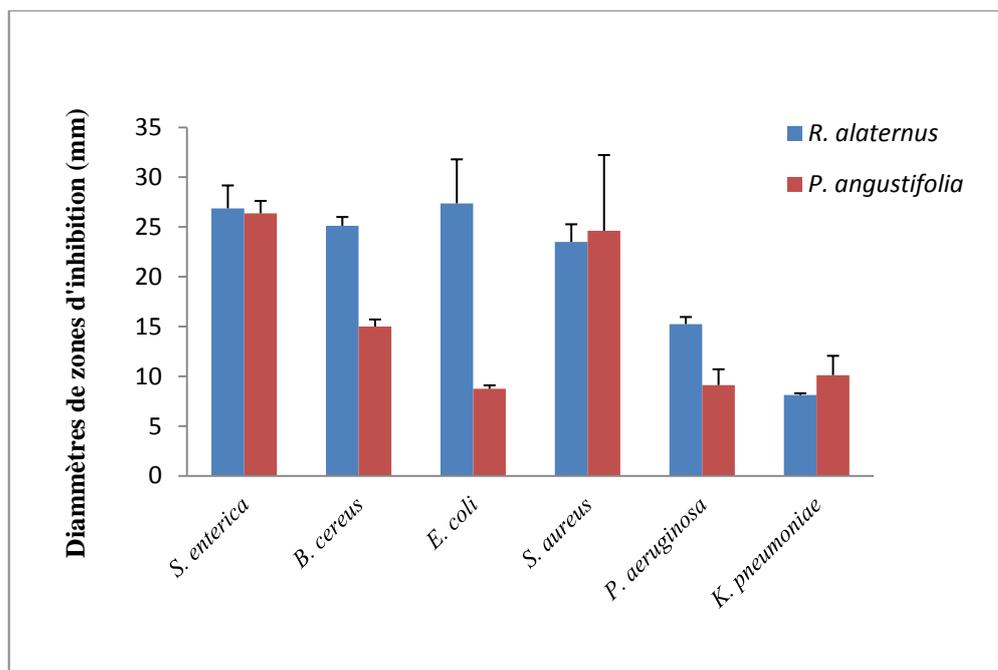
Trois antibiotiques (amikacine, tetracycline et amoxicilline) ont été testés sur *S. aureus* et contre *E. coli*. Les DZI trouvés sont : 23 mm (amikacine), 7,5 mm (amoxicilline) et 25 mm (tetracycline), pour *S. aureus*. Par contre, les DZI trouvés sur *E. coli* sont 10 mm (amoxicilline), 27 mm (amikacine), 25 mm (tetracycline) (Shahverdi *et al.*, 2007). Ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus dans notre étude pour les deux souches *Staphylococcus aureus* et *E. coli*.

## 8.2. Activité antibactérienne des extraits de *P. angustifolia* et de *R. alaternus*

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits des deux plantes testées obtenus dans les conditions optimales d'extraction sont regroupés dans la **Figure 21**.

Les résultats obtenus avec la méthode de diffusion de disque sur gélose montrent que les extraits optimisés des deux plantes étudiées ont une forte activité antibactérienne vis-à-vis de la majorité des souches testées avec des diamètres de zones d'inhibition (DZI) allant de 8,12 à 27,37 mm.

Les diamètres de zone d'inhibition les plus importants sont obtenus avec l'extrait de *R. alaternus* sur les souches bactériennes *E. coli*, *S. enterica*, *B. cereus* et *S. aureus* qui sont de 27,37 ; 26,87 ; 25,12 et 23,5 mm, respectivement (**Figure 21**).



**Figure 21** : Activité antibactérienne des extraits de *R. alaternus* et de *P. angustifolia*

La souche la plus résistante à l'extrait de *R. alaternus* est *K. pneumoniae* avec un DZI de 8,12 mm. Par contre, dans le cas de l'extrait de *P. angustifolia* la plus forte activité antibactérienne est obtenue sur les souches *S. enterica* et *S. aureus* avec des DZI de 26,87 et 27,37 mm, respectivement (**Figure 21**).

La souche la plus résistante à l'extrait de *P. angustifolia* est *E. coli* avec un DZI de 8,75 mm.

L'extrait de *R. alaternus* obtenu dans les conditions optimales d'extraction (83 min, 58% EtOH et ratio de 1) possède le plus fort effet antibactérien sur toutes les souches testées sauf dans le cas de *S. aureus* et *K. pneumoniae* (**Figure 21**).

Une étude menée par [Kosalec et al. \(2013\)](#) sur l'extrait éthanolique de *Rhamnus alaternus* à une concentration de 20 mg/ml à montrer une faible activité sur *Staphylococcus aureus* (12 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (10 mm), *Escherichia coli* (10 mm). Ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus dans notre étude pour la même espèce.

[Carranza et al. \(2015\)](#) ont montré l'effet antibactérien de l'extrait de *Rhamnus californica* (1mg/ml) récoltée en Amérique sur *Bacillus cereus* (10 mm), *Staphylococcus*

*aureus* résistante à la méthicilline (MRSA) (10 mm), par contre, sans effet sur *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*.

[Zeouk et al. \(2018\)](#) ont trouvé que les DZI d'extrait éthanolique des feuilles de *R. alaternus* obtenus contre deux bactéries à savoir *S. epidermidis* et *S. aureus* ATCC 29213 sont  $16\pm 1$  mm, et  $25\pm 1$  mm, respectivement. Ce dernier corrobore à celui obtenu dans notre étude.

L'extrait éthanolique du fruit d'*Olea europaea* montre un effet antibactérien contre *S. epidermidis* et *S. aureus* ATCC 29213 avec des DZI de  $25,33\pm 0,94$  et  $14\pm 0,81$  mm, respectivement ([Zeouk et al., 2018](#)).

Une étude menée par [Pavithra et al. \(2013\)](#) sur l'extrait des fleurs d'*Olea dioica* (50 mg/mL) a montré une faible activité sur *S. aureus* (14 mm), *B. cereus* (13 mm) et *E. coli* (11 mm). Ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus dans notre étude avec *P. angustifolia*.

Cette étude a révélé que les extraits de *Rhamnus alaternus* et *Phillyrea angustifolia* n'ont pas la même activité antibactérienne sur les souches testées.

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

## Conclusion

La présente étude a pour but l'optimisation d'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Phillyrea angustifolia* et *Rhamnus alaternus* obtenus par la méthode d'extraction conventionnelle en utilisant un plan d'expérience avec trois variables et l'étude de deux réponses. Ainsi évaluer l'activité antibactérienne des extraits des deux plantes.

La plus forte teneur en humidité est obtenue dans les feuilles de *R. alaternus*, qui est de  $62,14 \pm 1,69$  %, et de  $48,88 \pm 0,69$  % pour *P. angustifolia*.

Les extraits brut de *R. alaternus* et de *P. angustifolia* sont riches en caroténoïdes avec des teneurs de 93,74 et de 79,74 mg  $\beta$ -carotène/100 g, respectivement.

Le plan Box-Benken a permis d'identifier les meilleurs paramètres pour avoir la plus forte teneur en polyphénols totaux et le plus fort effet de piégeage du radical libre DPPH qui sont un temps d'extraction de 83 min, un pourcentage en éthanol de 58% et un ratio de 1,2 pour *R. alaternus* et un temps d'extraction de 30 min, un pourcentage en éthanol de 47% et un ratio de 2 pour *P. angustifolia*.

Les teneurs en polyphénols totaux et l'effet de piégeage du radical libre DPPH trouvés, sous les conditions optimales sont de 79,40 mg EAG/g MS et de 63,72  $\mu$ g EAG/mL, respectivement dans le cas de *P. angustifolia* et de 70,36 mg EAG/g MS et de 69,49  $\mu$ g EAG/mL, respectivement pour l'extrait de *R. alaternus*.

La teneur en flavonoïdes de l'extrait de *R. alaternus* (17,17 mg EQ/g MS) est supérieure à celle de *P. angustifolia* qui est de 7,04 mg EQ /g MS.

Concernant les teneurs en tannins condensés les plantes étudiées possèdent de faibles teneurs, qui sont de 1,86 et 0,98 mg EQ Cyanidine/g MS pour *R. alaternus* et *P. angustifolia*, respectivement.

Les résultats du test de pouvoir réducteur et l'activité antioxydante totale déterminée par le test de phosphomolybdate d'ammonium de l'extrait de *R. alaternus* sont de 16,92 mg

EAG/g MS et de 112,86 mg EAG/g MS, respectivement. Par contre, un pouvoir réducteur de 14,69 mg EAG/g MS et une activité antioxydante totale de 85,84 mg EAG/g MS sont obtenus dans le cas de *P. angustifolia*.

L'extrait des deux plantes étudiées montre une activité antibactérienne sur toutes les souches testées. La plus forte activité antibactérienne est obtenue avec l'extrait de *R. alaternus* sur *E.coli* et *S. enterica* avec des DZI de 27,37 et de 26,87 mm, respectivement. Ainsi la souche *K. pneumoniae* est résistante à l'extrait de *R. alaternus* avec un DZI de 8,12 mm.

En général on pourra dire que les extraits de *R.alaternus* et de *P. angustifolia* sont une source importante en composés phénoliques et ont un bon potentiel antioxydant ainsi une bonne activité antibactérienne et peuvent être utilisés dans les industries pharmaceutiques pour lutter contre les radicaux libres et en agro-alimentaire afin de prolonger la durée de vie des aliments.

Les perspectives envisagées dans les prochaines recherches concernant les deux plantes étudiées sont :

- Utilisation d'autres méthodes (Micro-ondes, Ultrason) solvants d'extraction (méthanol).
- Identification des composés phénoliques des extraits des deux plantes obtenus dans les conditions optimales par LCMS.
- Déterminer les CMI et CMB des extraits des plantes étudiées.
- Enrichir certaines denrées alimentaires avec les extraits des deux plantes.
- Etude d'autres activités biologiques (l'effet inflammatoire, l'effet anticancéreux, l'effet insecticide...).
- Faire des études *in-vivo*.

Références bibliographiques

*A*

- Abayomi, S. (2010).** Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Karthala, *Economie et Développement*. Paris: 384.
- Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, O., & Iwatsuki, K. (2001).** Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 (4): 487-491.
- Alkhulaifi, M., Awaad, A. S., AL-Mudhayyif, H. A., Alothman, M. R., Alqasoumi, S. I., & Zain, S. M. (2018).** Evaluation of antimicrobial activity of secondary metabolites of fungi isolated from Sultanate Oman soil. *Saudi Pharmaceutical journal*, 27 (3), 401-405.
- Amri, O., Elguiche, R., Tahrouch, S., Zekhnini, A., & Hatimi, A. (2015).** Antifungal and antioxidant activities of some aromatic and medicinal plants from the southwest of Morocco. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(7):672-678.
- Arsenijević, J., Drobac, M., Slavkowska, V., Kovačević, N., & Lakušić, B. (2018).** Anatomical analysis and phytochemical screening of *Frangula rupestris* (Scop.) Schur (Rhamnaceae). *Botanica Serbica*, 42 (2): 231-239.
- Ashfaq, KH., Choudhary, B. A., Uzair, M., Qaisar, M. N., Hussain, S. N., & Ghaffari, M. A. (2017).** Evaluation of  $\alpha$ -glucosidase, urease inhibition and antioxidant potential of *Acacla Jacquemontii* and *Rhamnus persica*. *IAJPS*, 4 (10), 3913-3918.
- Aurousseau, B. (2002).** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage: conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *Productions Animales*, 1 (15), 67-82.
- Ayranci, E., & Erkan, N. (2013).** Radical Scavenging Capacity of Methanolic *Phillyrea latifolia* L. Extract: Anthocyanin and Phenolic Acids Composition of Fruits. *Molecules*, 18, 1798-1810.

*B*

- Bachir Bey, M. (2006).** Evaluation du pouvoir antioxydants de quelques variétés de tomates cultivées à Bejaia. Mémoire de Magistère de biochimie Biophysique Moléculaire. Université A/MIRA de Bejaia.

- Bahorun, T., Gressier, B., Troitin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C. Pinkas, M. Luycky, M. , & Gazin, M. (1996).** Oxigen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneim Forsh. Drug Res*, 46, 1086-1108.
- Barati Elbaz. & Le Marechal. (2008).** Eudesmanolides from *Artemisia herba-alba*. *Phytochemistry*, 43: 309 – 311.
- Bayer, E., Buttler, K.P., Finkenzeller, X., & Grau, J. (1990).** Guide de la flore Méditerranéenne. *Delachaux et Niestlé*, S.A-Paris.
- Ben Ammar, R., Kilani, S., Bouhlel, I., Skandrani, I., Naffeti, A., & Boubaker, J. (2007).** Antibacterial and cytotoxic activities of extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae). *Annals of Microbiology*, 57(3): 453–460.
- Ben Ammar, R., Bouhlel, I., Valenti, K., Ben Sghaier, M., Kilani, S., Mariotte, A. M., Dijoux-Franca, M. G., Laporte, F., Ghedira, K., & Chekir-Ghedira, L. (2007).** Transcriptional response of genes involved in cell defense system in human cells stressed by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and pre-treated with (Tunisian) *Rhamnus alaternus* extracts: Combination with polyphenolic compounds and classic in vitro assays. *Chemico-Biological Interactions*, 168, 171–183.
- Ben Ammar,B., Bhouri, W., Ben Sghaier, M., Boubaker, J., Skandrani, I., Neffati, A., Bouhlel, I ., Kilani, S., Mariotte, A.M, Chekir-Ghedira, L., Dijoux-Franca, M.G.,& Ghedira, K. (2009).** Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. *Food Chemistry*, 116, 258–264.
- Ben Ammar, R., Ben Sghaier, M., Boubaker, J., Bhouri, W., Naffeti, A., Skandrani, I., Bouhlel, I., Kilani, S., Ghedira, K. & Chekir-Ghedira, L. (2008).** Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B<sub>1</sub>, nifuroxazide and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus* L. *Chemico-Biological Interactions*, 174, 01-10.
- Ben Ammar, R., Kilani, S., Abdelwahed, A., Hayder, N., Mahmoud, A., Chibani, J., & Ghedira, K. (2005).** In vitro mutagenicity, antimutagenicity and free radical scavenging activities of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) extracts. *Pak. J. Biol. Sci*, 8(3), 439-445.

- Benayad, N. (2008).** Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines: Moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. *Research Project*. University of sciences, Rabat (Maroc).
- Ben Ghezala, H., Chaouali, N., Gana I., Snouda, S., Nouioui, A., Belwaer, I., Ouali J., Kaddour, M., Masri, W., Ben Salah D., Amira D., Ghorbal, H. & Hedhili A. (2015).** Toxic Effects of *Rhamnus alaternus*: Case Report Emergency Mediteranean, Sous press.
- Benzeggouta, Nairouz. (2015).** Evaluation des effets biologiques des extraits aqueux de plantes médicinales seules et combinées. Thèse de doctorat en Pharmaco-Chimie Université Mentouri-Constantine.
- Benzie, I.F.F., & Strain, J.J. (1999).** Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299: 15–27.
- Bhourri, W., Ben Sghaier, M., Kilani, S., Bouhlel, I., Dijoux-Franca, M.G., Ghedira, K. & Ghedira L.C. (2011).** Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): Kaempferol 3- O-b-isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O-b-isorhamninoside. *Food Chemistry Toxicology*, 49: 1167-1173.
- Bhourri, W., Boubaker, J., Kilani, S., Ghedira, K., & Chekir-Ghedira L. (2012).** Flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): Kaempferol 3-O- $\beta$ -isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O- $\beta$ -isorhamninoside protect against DNA damage in human lymphoblastoid cell and enhance antioxidant activity. *South African Journal of Botany* , 80 : 57–62.
- Boudjouref, M. (2011).** Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extrait d'*Artemisia campestris* L. Mémoire de Magister en Biochimie. Université Ferhat Abbas, Sétif, p 99 .
- Bouharb, H., El Badaoui, K., Zair, T., El amri, J., Chakir, S. & Alaoui, T. (2014).** Sélection de quelques plantes médicinales du Zerhoun (Maroc centrale) pour l'activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Biosciences*, 78:6685-6693.
- Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. & Nasri, M. (2009).**

Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114 (4): 1198-1205.

**Boussahel, S., Dahamna, S., Ruberto, G., Siracusa, L., & Harzallah, D. (2013).** Phytochemical Study and Antioxidant Activities of Leaves Extracts from *Rhamnus alaternus* L. *Pharmacognosy Communications*, Volume 3, p 46-53.

**Brand –Williams., Cuvelier, M.E., & Bercet, C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 28: 25-30.

**Bruneton., J. (1999).** Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. 3ème édition. TEC et DOC : *Lavoisier*, Paris..

### C

**Carranza, M. G., Seigny, S.B., Banerjee, D., & Fox-Cubley, L. (2015).** Antibacterial activity of native California medicinal plant extracts isolated from *Rhamnus californica* and *Umbellularia californica*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, p2-6.

**Cause, C., (2005).** Les secrets de santé des antioxydants. *Eddition Alpen s.a.m*, pp :95.

**Christine, Vassiliadis. (1999).** Evolution et maintien de l'androdioécie Etude théorique et approches expérimentales chez *Phillyrea angustifolia* L. Thèse de doctorat en Biologie et Génétique des Populations. Université Lille I, Lille, France.

**Christodoulakis, N. S., & Mitrakos, K. A. (1987).** Structural analysis of sclerophylly in eleven evergreen phanerophytes in Greece. In *Plant response to stress*. Springer, Berlin, Heidelberg, 547-551.

**Cheick Traoré, M. ( 2006).** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au Mali.. Université de Bamako (Mali). 133 p.

**Chouitah, O., Meddah, B., & Aoues, A. (2012).** Analysis of the Chemical Composition and Antimicrobial. Activity of the Essential Oil from *Rhamnus alaternus*. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 2 (5): 302-306.

**CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2009).** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard-tenth edition M02-A10. *National Committee for Clinical Laboratory Standards* 29.

- Cushnie, T.T., & Lamb, A. J. (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26 (5): 343-356.
- Chun, S.S., Vатtem, D.A., Lin, Y.T., & Shetty, K. (2005).** Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry*, 40, 809-816.
- Colin, J.-P. (2008).** Sénescence et stratégie d'allocation des caroténoïdes chez le diamant mandarin, *Taeniopygia guttata*.

D

- Debussche, M., Cortez, J., & Rimbault, I. (1987).** Variation in fleshy fruit composition in the Mediterranean region: the importance of ripening season, life forme, fruit type and geographical distribution. *Oikos*, vol. 49 (3): 244-252.
- Defraigne, J., & Pincemail, C. (2008).** Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Rev Med Liège*, 63, 10-19.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654-660.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Vidal N., Lesgards, J. F. & Stocker, P. (2007).** Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol*, 224: 801-809.
- Diallo, A. (2005).** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd.(*Myrtaceae*). Thèse de doctorat en Médecine. Université de Bamako, Mali.
- Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., & Merillon, J. M. (2009).** Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J. Agric. Food Chem*, 57, 1768–1774.

E

- Erlund, I. (2004).** Review of the flavonoids quercetin, Hesperetin, and Naringenin: Dietary sources, bioactivity, bioavailability and epidemiology. *Nutrition Research*, 24: 851-874.
- Escribano-Bailón, M.T., & Santos-Buegla, C. (2003).** Polyphenol extraction from foods. In *Method in polyphenol analysis*". Ed. *Royal Society of Chemistry*, pp. 1-16.

F

**Fossey, J., Lefort, D., & Sobra, J. (1993).** Les radicaux libres en chimie organique. *Issy les Moulinaux (Hauts-de-Seine) : Masson.*

**Farag, R.S., Daw, Z.Y., ewedi, F.M., & Baroty, G.S.A. (1989).** Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection*, 52 : 665–667

### G

**García-Plazaola, J. I., Olano, J. M., Hernández, A., & Becerril, J. M. (2003).** Photoprotection in evergreen Mediterranean plants during sudden periods of intense cold weather. *Springer-Verlag*, 17:285–291.

**Ganière, J.P., Mangion, C., & Péridy, M. (2004).** Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices et Bactéricides de la cefquinome, la marbofloxacin, la tylosine et la spiramycine en solution dans du lait vis-à-vis de bactéries isolées de mammites bovines. *Revue Mé*, 8(9) :411-416.

**Gulçin, I., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., & Elias, R. (2006).** Screening of antiradical and antioxidant activity of onodesmosides and crude extract from *Leontice smirnowii* tuber. *Phytomedicine*, 13: 343-351.

### H

**Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., & Chapelle, J.P. (2007).** Le stress oxydant. *Rev Med Liege*, 62 (10): 628-638.

**Halliwel, B. (1994).** Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews*, 52(8): 253-265.

**Halliwel, B. (1996).** Antioxidants in human health and disease. *Review of Nutrition*, 16: 33–50.

**Harrar, A.E.N. (2012).** Activités antioxydante et antimicrobienne d'extrait de *Rhamnus alaternus L.* Mémoire de magister en Biochimie et physiologie expérimentale. Université Ferhat Abbas, Sétif, 73 p.

**Harbertson, J., Kennedy, J., & Doug, A. (2010).** Tannin in Skins and Seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir Berries during Ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53(1): 54-59.

**Haslam, E. (1989).** Plant Polyphenols. Cambridge University Press, Cambridge.

**Huang, D., Ou, B., & Prior, R.L. (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (6): 1841-1856.

I

- Iserin, P., Masson, M., Restellini, J. P., Ybert, E., De Laage de Meux, A., Moulard, F., Zha, E., De la Roque, R., De la Roque, O., Vican, P., Deelesalle –Féat, T., Biaujeaud, M., Ringuet, J., Bloth, J., & Botrel, A. (2001).** Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. *Ed Larousse*. p10-12.
- Ivanova, A. (2005).** Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ruta graveolens*; *Fitoterapia* 76; Ed: *ELSEVIER*, p: 344-347.

J

- Jean, A., Jacques, P., & Regine, F. (2003).** La science alimentaire de A à Z (chaire de biochimie industrielle et agroalimentaire conservatoire National des Arts et Métiers). *Lavoisier*, 3<sup>ème</sup> édition, 57-58.
- Johnson, L.A.S. (1957).** A review of the family Oleaceae. *Contrib. from the NS. W. National herbarium*, 2, (26), 395-418.
- Judd, S. W., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., & Stevens, P. F. (1999).** Plant Systematics a phylogenetic approach: 137, 148-160.
- Juanying, Ou., Mingfu, Wang., Jie, Zheng., & Shiyi, Ou. (2019).** Positive and negative effects of polyphenol incorporation in baked foods. *Food Chemistry*, 284, 90-99

K

- Kamagate, A., Kone, D., Coulibaly, N.T., Brou, E. et Sixou, M. (2001).** Etude comparative de différentes méthodes d'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies strictes de la flore sous-gingivale. *Odonto-stomatologie tropicale*, 4 (95) : 9-12.
- Khajeh, M. (2009).** Optimization of microwave-assisted extraction procedure for zinc and copper determination in food samples by Box-Behnken design. *Journal of food composition and analysis*, 22: 343-346.
- Khettal, B., Zaidi, A., Tacherfiout, M. & Sobhi, W. (2014).** Effet des extraits de feuilles de *Rhamnus Alaternus* à activités antioxydant et antilipasique sur la masse corporelle et le métabolisme des souris avec un régime enrichie en carbohydrates. *Nutrition Clinique et Métabolise*, 28, S149-S150.

- Kline, K., Yu, W., & Sanders, B. G. (2001).** The Role of Nutrition in Preventing and Treating Breast and Prostate Cancer. *American Society for Nutritional Sciences, J. Nutr*, 131: 161S–163S.
- Kraft, K., & Hobbs, C. (2004).** Pocket Guide to Herbal Medicine. *Thieme, Stuttgart, New York*, p16.
- Kohen, R., & Nyska, A. (2002).** Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol. Path. Oxidation of Biological Systems*, 30: 620-650.
- Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S. & Vladimir-Knezevic, S.A.N.D.A. (2004).** Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *ACTA PHARMACEUTICA-ZAGREB*, 54(1), 65-72.
- Kosalec, I., Kremer, D., Locatelli, M., Epifano, F., Genovese, S., Carlucci, G., Randic, M., & Zovko K, M. (2013).** Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial activity of bark extracts of *Rhamnus alaternus*, *R. fallax*, *R. intermedia* and *R. pumila*. *Food Chemistry*, 136, 335–341.

ℒ

- Lapornik, B., Prosek, M., & Wondra, A. g. (2005).** Comparaison of extract prepared from plant by-products using different solvents and extraction time, *J Food Eng*, 71: 214-222.
- Lee, G. Y., & Han, S. N. (2018).** The Role of Vitamin E in Immunity. *Nutrients*, 10, 1614.
- Liyana-Pathirana, Ch., & Shahidi, F. (2005).** Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, 93, 47–56.

ℳ

- Matuschek, E., Brown, D. F. J., & Kahlmeter, G. (2014).** Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(4), 255-266.
- Man, j. K., Rohm, K. (1999).** Atlas de poche de biochimie. *Lavoisier*, p : 340-348.
- Madi, A. (2010).** Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Université Mentouri Constantine, P : 20-22.

- Mata, A.T., Proença, C., Ferreira, A.R., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F., & Araujo, M.E.M. (2007).** Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, 103, 778–786.
- Macheix, J.J., A. Fleuriet, A., Jay-Allemand, C. (2005).** Nature et diversité des composés phénoliques des végétaux. In : Les composés phénoliques des végétaux. Ed : *Technique et documentation. Lavoisier*, 10-15.
- Matés, J.M. (2000).** Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicologie*, 153: 83-104.
- Messaudi, S. (2008).** Les plantes médicinales. Ed.3 éme. *Dar el fikr-Tunis*, PP : 14 -15.
- Mebirouk-Boudechiche, L., Cherif , M., Abidi S., & Bouzouraa, I. (2015).** Composition chimique et facteurs antinutritionnels de quelques feuilles de ligneux fourragers des zones humides du nord-est de l'Algérie. *Fourrages*, 224, 321-328.
- Moussi, K., Nayak, B., Perkins, L. B., Dahmoune, F., Madani, K. & Chibane, M. (2015).** HPLC-DAD profile of phenolic compounds and antioxidant activity of leaves extract of *Rhamnus alaternus* L. *Industrial Crops and Products*, 74,858-866.
- Munne-Bosch, S., & Penuelas,J. (2003).** Photo and antioxidative protection and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants. *Planta*, (217): 758-766.
- Muthu, C., Ayyanar, M., Raja, N., & Ignacimuthu, S. (2006).** Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and ethnomedicine*, 2 (1): 43.

N

- Nabet, N., Boudries, H., Loupassaki, S., Souagui, S., Madani, K. & Carbonell-Barrachina, Á.A.(2017).** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. and *Origanum glandulosum* Desf. essential oils. *International Food Research Journal*, 24(6): 2518-2525.
- Nabet, N., Gilbert-López, B., Madani, Kh., Herrero, M., Ibáñez, E., & Mendiola, J.A. (2019).** Optimization of microwave-assisted extraction recovery of bioactive compounds from *Origanum glandulosum* and *Thymus fontanesii*. *Industrial Crops & Products*, 129, 395–404.
- Nicol, M., & Maudet, M. (2000).** Caroténoïdes et vitamine A. Oléagineux, Corps Gras, Lipides, 3, pp: 266-270.

O

- Odabasoglu, F., Aslan, A., Cakir, A., Suleyman, H., Karagaz, Y., Malici, M., & Bayir, Y. (2004).** Comparaison of antioxidant activity and phenolic contents of three lichen species. *Phototherapy Research*, 18: 38-941.
- Orhan, D.D., ozcelik, B., hosbas, S. & vural, M. (2012).** Assessment of antioxidant, antibacterial, antimycobacterial, And antifungal activities of some plants used as folk remedies in Turkey against dermatophytes and yeast-like fungi. *Turkish journal of boilogy*, 36: 672-686.
- Oyaïzu, M. (1986).** Studies on products of the browning reaction. Antioxidative activities of browning reaction products prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.

P

- Pavithra, G.M., Saba, S., Abhishiktha, S. Naik., Prashith Kekuda, T.R., & Vinayaka, K.S. (2013).** Antioxidant and antimicrobial activity of flowers of *Wendlandia thyrsoidea*, *Olea dioica*, *Lagerstroemia speciosa* and *Bombax malabaricum*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. Vol. 3 (06), pp. 114-120
- Pincemail, J., Siquet, J., chapelle, JP., Cheramy-Bien, J.P., Paulssen, G., chantillon, A.M., Christians, G.,Gielen, J., Limet, R., & Defraigne, J.O. (2000).** Evaluation des concentrations plasmatiques en antioxydants, anticorps contre les Ldl oxydées et homocyséine dans un échantillon de la population liégeoise. *Ann. Biol. Clin*, 85: 178-185.
- Pinecemail, J., Karine, B., Karine, C., & Jean-Olivier, D. (2002).** Mécanismes Physiologiques de la Défence Antioxydante. Physiological Action of Antioxydant Defences. *Nutrition Clinique et métabolisme*, 16(6) :233-239.
- Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowski, B. (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH, *Revue de Génie industriel*, 4, 25-39.
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337-341.

Q

**Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., Cazin, M., Cazin, J.C., Bailleul, F., & Trotin, F. (2000).** Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, 72: 35–42.

R

**Ribereau-Gayon, (1968).** Notions générales sur les composés phénoliques in : les composés phénoliques des végétaux. Ed. Paris : Dunod, p: 1-27.

**Rodriguez-Amaya, D. B. (2001).** A guide to carotenoid analysis in foods. *International life Sciences Institute Press*, 1-71.

**Romani, A., Baldi, A., Mulinacci, N., Vincieri, E., & Tattini, M. (1996).** Extraction and Identification procedures of polyphenolic compounds and carbohydrates in phillyrea (*Phillyrea angustifolia* L.) Leaves. *Chromatographia*, 9(42):571-577.

S

**Saa-kiss, A., Kiss, J., Milotay, P., Kerek, M.M., & Toth-Markus, M. (2005).** Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food Research International*, 38, 1023-1029.

**Scalbert, A. (1991).** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12): 3875-3883.

**Shahverdi, A. R., Pharm, D., Fakhimi, A., Shahverdi, H. R., Ph, D. M.S., Minaian, S. (2007).** Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine. Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3, 168– 171.

**Shimizu, H. (2004).** Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study. *Stroke*, 35 (9): 2072-2077.

**Sies, H. (1997).** Physiological society symposium impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. *Experimental physiology*, 82, 291-295.

**Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A. R., & Simoni, M. (2005).** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry*, 89, 191-198.

- Soutour, S. (2010).** Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthe de corse et de kumquats. Thèse de doctorat d'état en chimie Organique et Analytique. Université de corse pascal paoli.
- Spencer, C. M., Cai, Y., Martin, R., Gaffney, S. H., Goulding, P. N., Magnolato, D., Lilley, T. H. & Haslam, E. (1988).** *Phytochemistry*, 27: 23-97.
- Stahl, W., & Sies, H. (2004).** Bioactivity and protective of naturel carotenoids. *Biochimica and Biophysica Acta (BBA)*, 1741, pp: 101-107.
- Stocker, P., Yousfi, M., Djerridane, O., Perrier, J., Amziani, R., El Boustani, S., & Moulin, A. (2004).** Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie*, 86 ,919–925.

T

- Tattini, M., Guidi, L., Morassi-Bonzi, L., Pinelli, P., Remorini, D., Degl'Innocenti, E., Giordano, C., Massai, R., & Agati, G. (2005).** On the role of flavonoids in the integrated mechanisms of response of *Ligustrum vulgare* and *Phillyrea latifolia* to high solar radiation. *New Phytologist*, 167: 457–470.
- Tewksbury, J. J., (2002).** Fruits, frugivores and the evolutionary arms race. *New Phytologist*, Vol. 156 (2): 137-144.
- Telli, A., Mahboub, N., Boudjeneh, S., Siboukeur, O. E. K., & Moulti-Mati, F. (2010).** Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols de dattes lyophilisées (*Phoenix dactylifera* L) variété ghars. *Annales des Sciences et Technologie*, Vol. 2, N° 2, 107-114.
- Tohidpour, A., Sattari, M., Omidbaigi, R., Yadegar, A., & Nazemi, J. (2010).** Antibacterial effect of essentia loils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*, 17, 142–145.
- Turgeon, J., Dussault, S., Haddad, P., Groleau, J., Ménard, C., Michaud, S.E., & Rivard, A. (2010).** Probucol and antioxidant vitamins rescue ischemia-induced neovascularization in mice exposed to cigarette smoke: potential role of endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis*, 208(2), 342-349.

V

- Van Der Werf, R. (2013).** Evaluation du pouvoir antioxydant des aliments. Recherche de meur effets modulateurs sur le stress oxydant dans le cas du diabète. Université de Strasbourg. 18-20.

**Venubabu, Th., Aashis, S., Roy, M.V. N, Ambika, Pr., Shivannavar, C.T ., & Gaddad, S. M. (2010).** Nanostructured zinc oxide enhances the activity of antibiotics against *staphylococcus aureus*. *J Biosci Tech*, Vol 1 (2), 64-69.

W

**Wang, L., Zhang, H., Rehman, M. U., Mehmood, K., Jiang, X., Iqbal, M., & Li, J. (2018).**Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from Tibetan yaks. *Microbial pathogenesis*, 115: 293-298.

**Wang, L., & Mazza, G. (2002).** Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxid production in LPS/IFN- $\gamma$ -Activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50: 850-857

Y

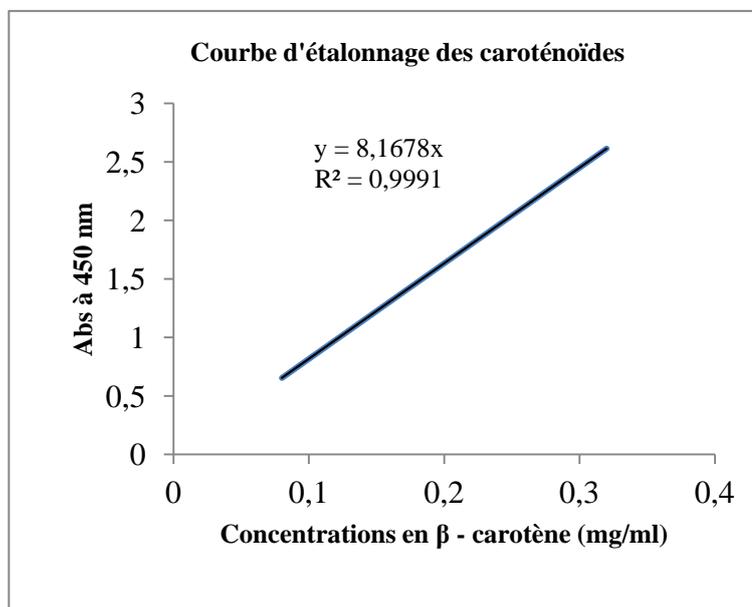
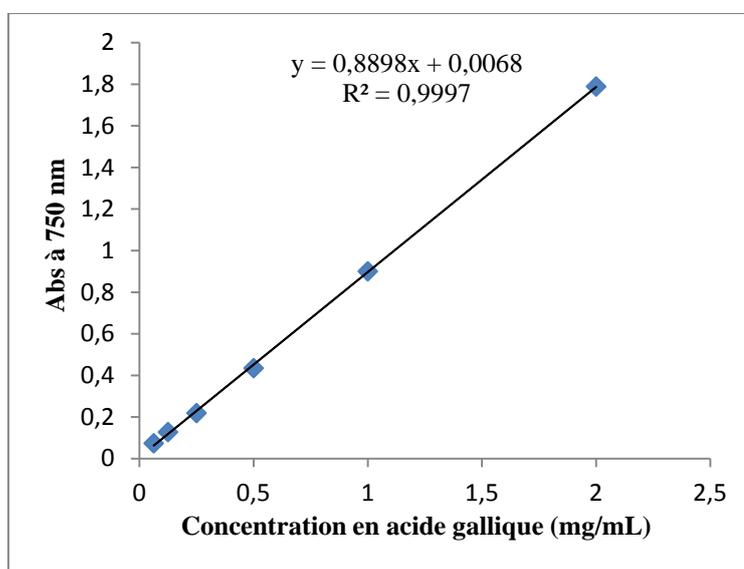
**Yang, J., Guo, J., & Yuan, J. (2008).** In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT*, 41: 1060-1066.

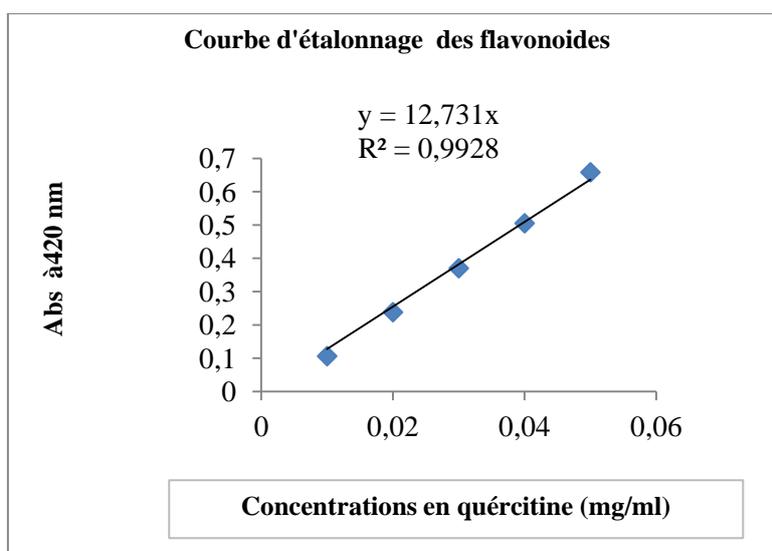
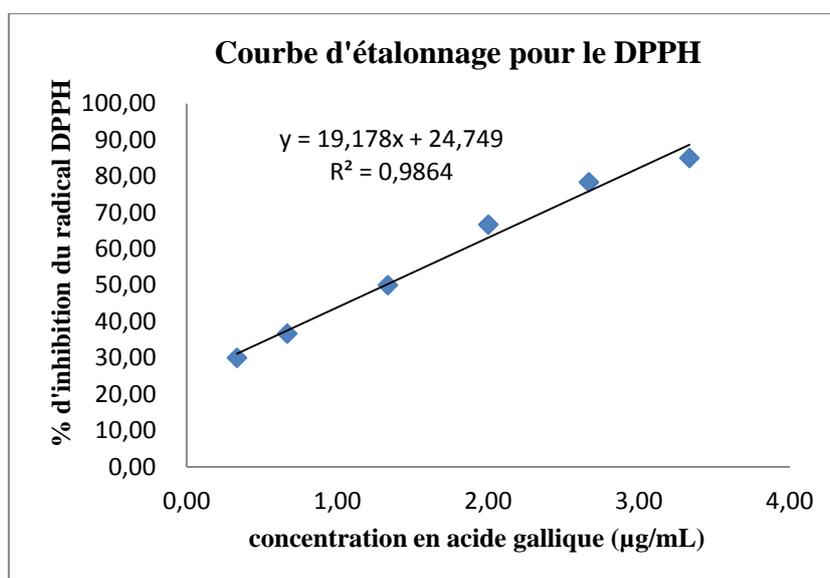
**Yu, R., Mandlekar, S., & Tonykong, A.N. (2000).** Molecular mechanisms of butylated hydroxyanisoleinduced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c. *Molecular pharmacology*, 58: 431-437.

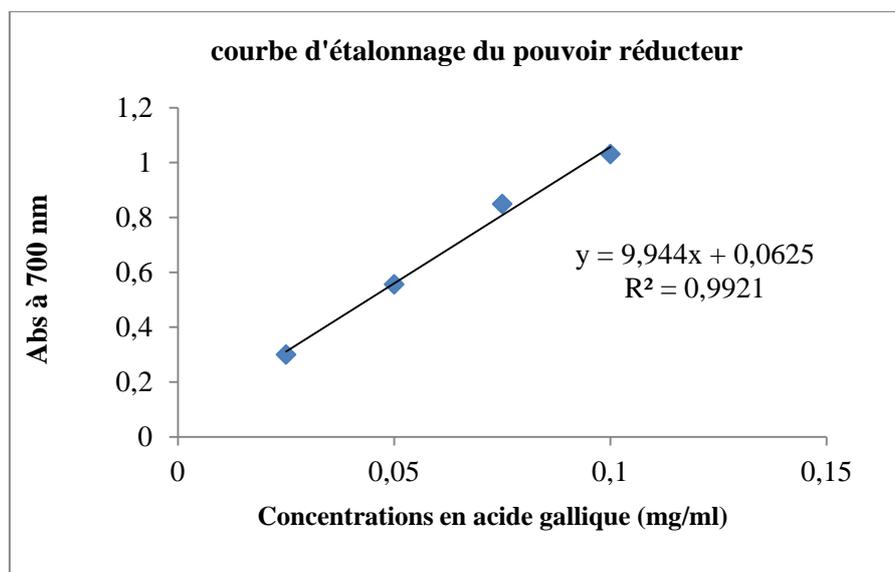
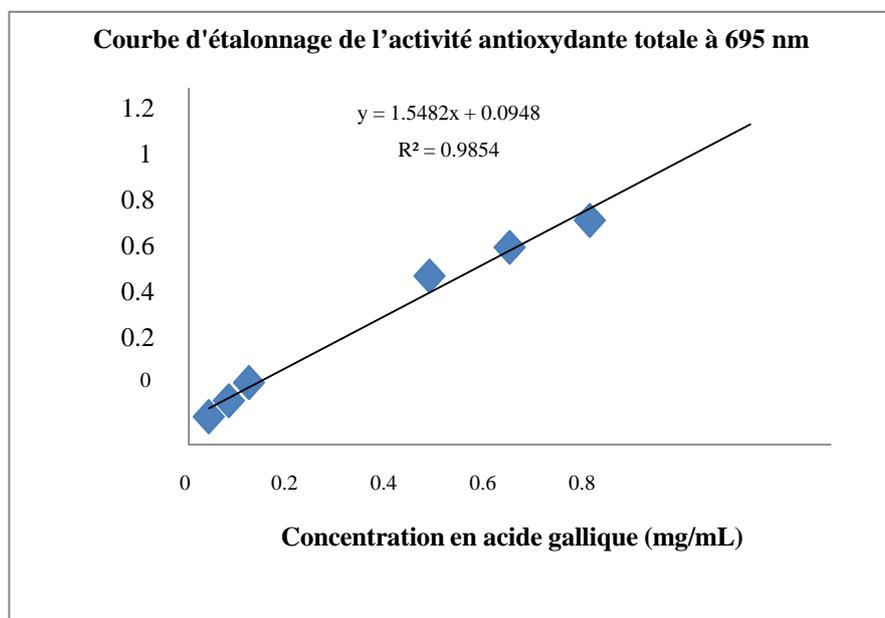
**Yujie, Ben., Caixia, Fu., Min, Hu, Lei. Liu., Ming, Hung. Wong., & Chunmiao, Zheng. (2018).** Human Health Risk Assessment of Antibiotic Resistance Associated with Antibiotic Residues in the Environment: A Review. *Environmental Research*, 169:483-493.

Z

**Zeouk, I., El ouali lalami. A., & BEKHTI, Kh. (2019).** Invitro antibacterial activity of medicinal plants in the central north of Morocco: a possible source of alternative drugs against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.*, Vol 12, Issue 3, 285-292 .

**Annexe I : Courbe d'étalonnage des caroténoïdes.****Annexe II : Courbe d'étalonnage pour la détermination des teneurs en polyphénols totaux**

**Annexe III:** Courbe d'étalonnage pour la détermination des teneurs en flavonoïdes.**Annexe IV:** Courbe d'étalonnage de piégeage des radicaux libres DPPH

**Annexe V:** Courbe d'étalonnage pour la détermination du pouvoir réducteur**Annexe VI:** Courbe d'étalonnage pour la détermination de l'activité antioxydante totale (test de phosphomolybdate d'ammonium)

**Résumé :** La méthode conventionnelle a été combinée avec la méthodologie de surface de réponse (RSM), pour optimiser l'extraction en composés phénoliques et l'activité antioxydante des feuilles de *Phillyrea angustifolia* et *Rhamnus alaternus*. Un plan d'expérience à trois variables : concentration en éthanol (%EtOH), le temps d'extraction, le ratio et l'étude de deux réponses (teneur en polyphénols totaux et le piégeage du radical DPPH) ont été étudiés. La teneur en polyphénols totaux (TPT) a été déterminée à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu, tandis que l'activité antioxydante a été évaluée à l'aide de la solution de 2,2- radicaux diphényl-1-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH). Les conditions optimales obtenues pour les extraits de *P. angustifolia* sont : un temps d'extraction 30 min, un pourcentage en éthanol de 47% et un ratio de 2 g/15ml, avec une TPT de 79,40 mg équivalent acide gallique/gMS et un effet de piégage du radical libre DPPH de 63,75 µg/mL Tandis que, un temps d'extraction de 83 min, 58% en éthanol et un ratio de 1 g/15ml ont été obtenus dans le cas de *R. alaternus*. ces conditions donnent une TPT de 70,36 mg équivalent acide gallique/gMs et un effet de piégage du radical libre DPPH de 69,49 µm/mL La plus forte teneur en humidité et en caroténoïdes a été obtenue avec les feuilles de *R. alaternus* avec un taux de 62,14% et une teneur de 93,74 mg β-carotène/100 g, respectivement. L'extrait de *R. alaternus* obtenu dans les conditions optimales possède les plus fortes teneurs en flavonoïdes et en tannins qui sont de 17,17 mg équivalent quercitine/g MS et de 1,86 mg équivalent cyanidine/g MS. L'activité antioxydante des extraits des deux plantes obtenus dans les conditions optimales a été déterminée par le test du pouvoir réducteur et le test de phosphomolybdate d'ammonium. L'extrait de *R. alaternus* possède le plus fort pouvoir réducteur et le plus fort effet réducteur des ions molybdate ( $MO^{6+}$ ) avec des teneurs de 16,92 mg équivalent acide gallique/g MS et de 112,86 mg équivalent acide gallique/g MS, respectivement. L'activité antibactérienne des extraits des deux plantes a été évaluée par la méthode de diffusion de disque sur gélose Mueller Hinton. Les extraits des deux plantes étudiées ont montré une activité antibactérienne différente vis-à-vis des six souches testées. La plus forte activité antibactérienne a été obtenue avec l'extrait de *R. alaternus* sur *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* avec des diamètres de zones d'inhibition de 27,37 et de 26,87 mm, respectivement.

**Mots clés :** Activité antioxydante, Activité antibactérienne, DPPH, Méthode conventionnelle, Méthodologie de réponse de surface, Polyphénols, *Phillyrea angustifolia*, *Rhamnus alaternus*.

**Abstract:** The conventional method was combined with the response surface methodology (RSM) to optimize phenolic compound extraction and antioxidant activity of *Phillyrea angustifolia* and *Rhamnus alaternus* leaves. A three-variable experimental design was studied: ethanol concentration (%EtOH), extraction time, ratio and study of two responses (total polyphenol content and DPPH radical entrapment). The total polyphenol (TPT) content was determined using the Folin-Ciocalteu reagent, while antioxidant activity was assessed using the solution of 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH) radicals. The optimal conditions obtained for *P. angustifolia* extracts are: an extraction time of 30 min, an ethanol percentage of 47% and a ratio of 2 g/15ml, with a TPT of 79.40 mg gallic acid equivalent/g and a DPPH free radical trapping effect of 63.75 µg/mL. While an extraction time of 83 min, 58% ethanol and a ratio of 1 g/15ml were obtained for *R. alaternus*. These conditions give a TPT of 70.36 mg gallic acid equivalent/g DM and a free radical trapping effect DPPH of 69.49 µm/mL. The highest moisture and carotenoid content was obtained with *R. alaternus* leaves at 62.14% and 93.74 mg β-carotene/100 g, respectively. The extract of *R. alaternus* obtained under optimal conditions has the highest levels of flavonoids and tannins, which are 17.17 mg quercetin equivalent/g DM and 1.86 mg cyanidin equivalent/g DM. The antioxidant activity of the extracts of the two plants obtained under optimal conditions was determined by the reducing power test and the ammonium phosphomolybdate test. *R. alaternus* extract has the highest reducing power and the strongest reducing effect of molybdate ions ( $MO^{6+}$ ) with contents of 16.92 mg gallic acid equivalent/g DM and 112.86 mg gallic acid equivalent/g DM, respectively. The antibacterial activity of the extracts of both plants was evaluated by the Mueller Hinton agar disc diffusion method. The extracts of the two plants studied showed a different antibacterial activity with respect to the six strains tested. The highest antibacterial activity was obtained with *R. alaternus* extract on *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* with inhibition zone diameters of 27.37 and 26.87 mm, respectively.

**Keywords:** Antioxidant activity, Antibacterial activity, DPPH, Conventional method, Surface response methodology, Polyphenols, *Phillyrea angustifolia*, *Rhamnus alaternus*.