



لجمهورية الجزائر الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie des Mycètes

Intitulé :

Evaluation de l'activité antimicrobienne et anti-oxydante de certains extraits d'une plante endémique

Présenté et soutenu par :

Le : 06/07/2017

Anani Asma

Zibha Khadidja

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr. Kacem Chaouche Noredine

Pr - UFM Constantine.

Rapporteur : Mme. Cherfia Radia

M.A.A UFM Constantine.

Co-encadreur : MR. Rehamnia Yacine

Examineurs : Mme. Zitouni Hinde

M.C.B - UFM Constantine.

*Année universitaire
2016 - 2017*

Remerciement

Avant toute chose nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir accordé la force et les moyens afin de pouvoir réaliser ce travail.

Au terme de ce travail nous adressons tout d'abord nos sincères remerciements à notre encadreur

***M^{elle} Cherfia Radia**, Maitre assistante à l'université des frères Mentouri-Constantine- pour avoir dirigé ce travail et accepté d'encadrer, pour ses conseils et ses orientations.*

*Nous remercions aussi notre co-encadreur monsieur **Rhamniya Yacine***

***Mme Zitouni Hin**, M.C.B à l'université des frères Mentouri-Constantine- pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*A monsieur le président du jury, **Kacem Chaouche Noredine**, professeur à l'université des frères Mentouri-Constantine- et directeur du laboratoire de Mycologie, Biotechnologie, et Activité Microbienne(LaMyBAM).*

Nous remercions également le personnel de la bibliothèque.

*Le chef de département de microbiologie: Monsieur **Farhati**.*

A tous les enseignants de Départements de microbiologie

A monsieur le doyen.

A tous les étudiants de Graduation «master 2 LMD »

Spécialité Biotechnologie des mycètes.

Dédicace

Je dédie ce travail à mes chers parents, ma mère Dalila et mon père Ammar pour leurs sacrifices et leurs soutiens tout au long de mes études.

A ma chère sœur : Mariem

A mes chers frères : Abderrahmen et Chams eddine

Le grand respect et les plus belles sentiments à mon cher grand père: Sebti.

A mes chers oncles A mes chères tentes

A mes cousins et mes cousines

A toute la famille Zibha et Rehaili

A ma chère binome : Asma

A mes chères copines : Safa, chourouk, Rebiha, Fatima et Lamis

A mes chères amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au cours de mon cursus à l'université:

Insaf, Wissem, Amina, Chahra et Nassima

A tous mes amis de la promotion de master en Biotéchnologie des mycètes

Khadidja

Dédicace

Au nom de dieu, clément et miséricordieux : je dédie ce modeste travail.

A ma très chère mère Zakia qui brûle ma route et m'encourage d'aller toujours de l'avant.

A Mon très cher Père Mouhamed: Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail et le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.

A ma chère binôme: Khadidja

A mes sœurs : Akila, Mimi et son fils: Sisoum, wahiba et ces enfants : Wissal, Nidhal, Rababe et Anfal

A mes frères : Zinou et Omar.

A mes meilleures amies : Saliha, Houda, Noussaiba et Samah pour leur précieuse aide et leur compréhension.

A toute la famille: Anani et Zourgane.

Et en fin à tous qui m'aiment fidèlement, merci

Asma

Sommaire

1. Introduction	1
2. Revue bibliographique	3
2.1. La famille des Fabacées	3
2.1.1. Généralités.....	3
2.1.2. Origine du nom.....	3
2.1.3. Caractères botaniques de la famille.....	3
2.1.3.1. Appareil végétatif.....	3
2.1.3.2. Appareil reproducteur.....	4
2.1.3.3. Phylogénie.....	5
2.1.4. La sous-famille des Papilionoideae.....	5
2.1.4.1. Caractères botaniques.....	5
2.1.4.2. Intérêts économiques et thérapeutique des Papilionoideae.....	6
2.1.5. Le genre <i>Calycotome</i>	7
2.1.5.1. Origine du nom.....	7
2.1.5.2. Caractères généraux du genre <i>Calycotome</i>	8
2.1.5.3. Utilisation de la plante.....	8
2.1.6. L'espèce <i>Calycotome spinosa</i>	9
2.1.6.1. Description botanique.....	9
2.1.6.1. Classification de l'espèce <i>Calycotome spinosa</i>	10
2.1.6.2. Nomenclature.....	10
2.1.6.2. Composition chimique.....	10
2.1.6.3. Utilisation traditionnelle de <i>Calycotome spinosa</i>	10
2.2. Les métabolites secondaires.....	11
2.2.1. Généralités.....	11
2.2.2. L'importance des métabolites secondaires.....	12
2.2.3. Classification des métabolites secondaires.....	12
2.2.3.1. Polyphénols.....	12
2.2.3.2. Les flavonoïdes.....	17
2.3. Les micro-organismes.....	19
2.3.1. Généralités.....	19
2.3.2. Les différents types de micro-organism.....	20

2.3.2.1. Les bactéries.....	20
2.3.2.2. Les champignons.....	22
A) Les levures.....	22
B) Les moisissures (champignons filamenteux).....	23

3- Matériels et méthodes27

3-1 Matériel végétal.....	27
3.1.1. Préparation de la plante.....	27
3.1.2. Extraction de la plante.....	28
3.1.3. Détermination du rendement des extraits sec.....	28
3.2. Activités antimicrobiennes.....	28
3.2.1. Souches microbiennes testées	28
3.2.2. Préparation des milieux de cultures.....	28
3.2.3. Test antibactérien.....	29
3.2.4. Activité antifongique.....	30
3.2.5. Conservation des souches microbiennes.....	31
3.3. Activité anti-oxydante.....	31
3.3.1. Pouvoir anti radicalaire par la méthode du DPPH.....	31
3.3.2. Test de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing- antioxidant powe.....	32
3.4. Etude phytochimique.....	33
3.4.1. Dosage des polyphénols (Folin-Ciocalteu).....	33
3.4.2. Dosage des flavonoïdes.....	34

4.Résultats..... 36

4.1. Détermination de rendement d'extraction	36
4.2. Activité antimicrobienne	37
4.2.1. Test antibactérien	37
4.2.2. Activité antifongique	43
4.3. Activité antioxydante	48
4.3.1. Effet scavenger du radical DPPH	48
4.3.2. Pouvoir réducteur (FRAP)	51
4.4. Etude phytochimique	52
4.4.1. Dosage des polyphénols	52

4.4.2. Dosage des flavonoides	53
5. Discussion	55
6. Conclusion et perspectives	63
7. Résumés	64
8. Références bibliographique	67

Annexes

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
Tab.01	Description de <i>C. spinosa</i>	8
Tab.02	Aspect morphologique de <i>C. spinosa</i>	9
Tab.03	Principaux genres de moisissures et leurs mycotoxines associées	24
Tab.04	Effets des principales mycotoxines sur l'homme et mécanismes d'action cellulaires et moléculaires identifiés	25
Tab.05	Maladies de plantes causées par certaines moisissures	26
Tab.06	Zones d'inhibition de l'activité antimicrobienne d'extraits aqueux et méthanolique de la plante, d'antibiotique, d'antifongique et du DMSO	37
Tab.07	Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	42
Tab.08	Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des champignons en fonction des différents extraits de la plante	43
Tab.09	Quantité des phénols totaux dans les extraits	53
Tab.10	Quantité des flavonoïdes dans les extraits	54

Liste des figures

N°	Titre	Page
Fig.01	Morphologie de la plante <i>C. spinosa</i>	09
Fig.02	Effets biologiques des polyphénols	16
Fig.03	Squelette de base des flavonoïdes	18
Fig.04	Propriétés biologiques des Flavonoïdes	19
Fig.05	Plante <i>C. spinosa</i> (Mars 2017 et Juin 2016)	27
Fig.06	<i>C. spinosa</i> séchée puis finement broyée	27
Fig.07	Mécanisme réactionnel du test FRAP (Ferricreducing-antioxidant power)	33
Fig.08	Histogramme des rendements de l'extraction	36
Fig.09	Zones d'inhibitions d'extraits aqueux et methanolique de la plante, d'antibiotique, d'antifongique et de DMSO sur les bactéries à Gram positif (<i>S. aureus B. subtilis</i>) ; 5 : 200mg/ml	39
Fig.10	Zones d'inhibitions d'extraits aqueux et methanolique de la plante, d'antibiotique et de DMSO sur les bactéries à Gram négatif (<i>E. coli et K.pneumonia</i>) ; 5 : 200mg/ml	40
Fig.11	Zones d'inhibitions d'extraits aqueux et methanolique de la plante, d'antibiotique et de DMSO sur les bactéries à Gram négatif (<i>P. auruginosa et S.abony</i>) ; 5 : 200mg/ml	41
Fig.12	Zones d'inhibitions d'extraits aqueux et methanolique de la plante, d'antifongique et de DMSO sur la levure (<i>C.albicans</i>) ; 5 : 200mg/ml	42
Fig.13	Activité antifongique des quatre extraits et de l'antifongique sur <i>AlternariaAlternata</i> et <i>Altarnaria solani</i>	45
Fig.14	Activité antifongique des quatre extraits et de l'antifongique sur <i>Pinicillium sp1</i> et <i>Penicilliumsp2</i>	46
Fig.15	Activité antifongique des quatre extraits et de l'antifongique sur <i>Aspergillus sp</i> et <i>Rhizopus sp</i>	47
Fig.16	Activité anti-radicalaire du BHT	48
Fig.17	Activité anti-radicalaire des extraits de la plante <i>C. spinosa</i>	49
Fig.18	Histogramme représentant les IC ₅₀ des différents extraits	50

Fig.19	Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique	51
Fig.20	Pouvoir réducteur des quatre extraits de la plante testée et de l'acide ascorbique	51
Fig.21	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	52
Fig.22	Courbe d'étalonnage de la Quercitine	54

Liste des abréviations

AA : Acide ascorbique

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

B. subtilis : *Bacillus subtilis*

BHT: Butylated hydroxytoluène

[C] : Concentration

C. albicans : *Candida albicans*

Chlor : Chloramphénicol

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

C. spinosa : *Calycotome spinosa*

DMSO : DiméthylSulfOxyde.

DO : Densité Optique

DPPH : 2,2 -diphényl -1- picrylhydrazyl

FLA : Fleurs aqueux

FLM : Fleurs méthanol

Fluc : Fluconazol

FRA : Fruits aqueux

FRM : Fruits méthanol

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%

K. pneumoniae : *Klebseilla pneumoniae*

MH: Mueller Hinton

PI% : Pourcentage d'inhibition

R% : Rendement

rpm : Tour par minute

UV : Ultraviolet

Introduction

1. Introduction

1. Introduction

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité, pour soulager et guérir les maladies humaines. En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés: les métabolites secondaires. Ces derniers sont par la suite accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante (**Boudjouref, 2011**).

Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse (**Boudjouref, 2011**). De plus, au cours de ces dernières années, les médicaments à base de plantes sont devenus de plus en plus populaires dans certaines régions du monde, alors que dans d'autres parties, il a toujours été un élément essentiel dans le système de santé (**Djeddi et al., 2015**).

En Algérie, la médecine traditionnelle prend une part importante de guérir les maladies dans les habitudes générales de la population. Le Nord-Est de l'Algérie possède une flore extrêmement riche et variée, caractérisée par son originalité sur le plan systématique (de nombreuses plantes endémiques) et sa large utilisation dans la médecine populaire. Ces caractéristiques rendent l'étude de la flore d'un grand intérêt scientifique dans le domaine phytochimique (**Zellagui et al., 2011**). Parmi les familles des plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve la famille fabaceae (**Boudjouref, 2011**).

De nombreuses études ont mis en évidence la présence de métabolites secondaires doués d'activités biologiques telles que les polyphénols, alcaloïdes, terpènes ...etc.

Dans le cadre d'une étude de la biodiversité de certaines recettes végétales en Algérie, nous avons été intéressés par le fait que les plantes aromatiques et médicinales du Nord-Est de l'Algérie sont peu valorisées à ce jour. *Calycotome spinosa(L.) Lamk* appartient à la famille des Papilionacées, arbuste épineux, fleurs trifoliées généralement jaunes au printemps et très fréquent dans la forêt méditerranéenne (**Quezel and Santa 1963**). Le nom vernaculaire c'est "Guendoul". Selon notre recherche bibliographique, aucune étude phytochimique de cette plante n'a été rapportée.

1. Introduction

L'objectif de cette étude est d'évaluer, *in vitro*, l'activité antimicrobienne et anti-oxydante de certains extraits des fleurs et des fruits de *Calycotome spinosa*

La stratégie de ce travail repose sur les axes suivants :

- Préparation des extraits aqueux et méthanolique des fleurs et des fruits de cette espèce ;
- Recherche, *in vitro*, des potentialités antibactériennes et antifongiques des extraits préparés ;
- Étude, *in vitro*, de l'activité anti-oxydante des extraits étudiés ;
- Analyse phytochimique des extraits préalablement préparés.

Revue bibliographique

2. Revue bibliographique

2.1. La famille des Fabacées

2.1.1. Généralités

Les Fabaceae constituent une des plus grandes familles des plantes à fleurs, avec plus de 730 genres et 19 400 espèces, réparties aussi bien en milieu tempéré que tropical (**Wojciechowski et al., 2004**). Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées (**Dupont et al., 2007**). Néanmoins, la prédilection des plantes de cette famille pour les habitats arides ou semi-arides est reliée à leur métabolisme dépendant de l'azote, qui est considérée comme une adaptation aux variations climatiques et imprévisibles de l'habitat. En effet, la fixation de l'azote via la symbiose légumineuses-rhizobium permet aux plantes de cette famille d'obtenir des taux élevés en azote ammoniacal au niveau de leurs racines en fonction de la demande de leur métabolisme (**Wojciechowski et al., 2004**).

Cette famille est composée de variétés horticoles et beaucoup d'espèces sont récoltées dans un but alimentaire, tant pour l'alimentation humaine (haricot, pois, fève, soja) qu'animale (trèfle, luzerne, sainfoin), pour leur huile (arachide, soja), leurs fibres, comme combustible, pour leur bois, leur utilisation en médecine (spartéine extraite du genêt à balais, réglisse) ou en chimie (**Wojciechowski et al., 2004**).

2.1.2. Origine du nom

La grande famille des Fabaceae (de faba, la fève) doit son unité à son fruit, appelé gousse ou légume, d'où l'autre dénomination de Légumineuses sous laquelle cette famille est plus connue (**Morel, 2011**).

2.1.3. Caractères botaniques de la famille

Les plantes de la famille des Fabaceae possèdent plusieurs caractères morphologiques en commun. Néanmoins, on observe aussi dans cette famille de très nombreux types floraux, dues à plusieurs tendances évolutives, plus ou moins synchrones, et en particulier, une réduction du nombre des étamines et la création d'une fleur zygomorphe. Les feuilles également des plantes de cette famille présentent une évolution morphologique (**Morel, 2011**).

2.Revue bibliographique

2.1.3.1. Appareil végétatif

Les racines sont généralement pivotantes et laissent apparaître des nodosités à rhizobium qui se forment si le sol est pauvre en azote (**Dupont et al., 2007**). Les feuilles sont généralement alternes, pennées ou trifoliolées et stipulées. Cependant on peut noter quelques évolutions : la foliole terminale peut être absente (fève) ou en forme de vrille (vesce), les folioles sont remplacées par des épines (ajonc), les stipules font place à des épines (robinier faux acacia), le nombre de folioles peut être réduit (trèfle, genêt), la nervation peut être de type palmée (lupin)(**Morel, 2011**).

2.1.3.2. Appareil reproducteur

Les inflorescences sont des grappes plus ou moins allongées. Les Fabaceae les plus primitives (Mimosoidées) possèdent un périanthe régulier et réduit, avec des étamines très nombreuses. Chez les plus évoluées, on observe une réduction du nombre d'étamines à 10 et la fleur devient zygomorphe. La préfloraison est imbriquée, descendante ou vexillaire (**Morel, 2011**).

Toutes les Fabacées possèdent un ovaire formé d'un seul carpelle. Celui-ci est supère et surmonté d'un style et d'un stigmate.

Le fruit, élément le plus constant et qui caractérise cette famille, est appelé gousse ou légume. Il s'agit d'un fruit qui s'ouvre en général à maturité grâce à une double ouverture : ventrale et dorsale. Chez certaines espèces, la gousse subit des transformations. Celle-ci peut présenter des étranglements entre les graines (gousse lomentacée, indéhiscente), elle peut devenir pauciséminée (jusqu'à une seule graine). En fonction des espèces, la gousse est sèche ou charnue, aplatie ou comprimée, spiralée, arquée, ailée, segmentée, articulée, verdâtre ou de couleur vive. Sa taille va de quelques centimètres à une trentaine de centimètres (**Morel, 2011**).

Le nombre d'ovules est variable. Ils évoluent pour former une graine arquée, exalbuminée, qui est d'ailleurs souvent riche en composés à haute valeur alimentaire comme : l'amidon (pois, fèves, lentilles), des lipides (arachides, graines de soja), des protéines (graines de soja) (**Morel, 2011**).

2.Revue bibliographique

2.1.3.3. Phylogénie

L'étude phylogénétique de cette famille a été commencée avec le gène chloroplastique *rbcL4*, confirmant l'origine monophylétique de cette famille (**Wojciechowski et al., 2004**). Les Fabacées peuvent être réparties en 4 sous-familles selon l'APG III (2009):

- Bauhinioides, avec les arbres à Orchidées (*Bauhinia*) et les arbres de Judée (*Cercis*)
- Mimosoideae
- Caesalpinoideae
- Papilionoideae ou Faboïdeae comprenant le genre *Derris*. (**Morel, 2011**).

2.1.4. La sous-famille des Papilionoideae

Elle est certainement la sous-famille la plus étudiée, en particulier en raison du grand nombre de plantes appartenant à cette famille, 476 genres et 13 860 espèces (**Wojciechowski et al., 2004**). On retrouve dans cette sous-famille des arbres, en général exotiques, des lianes, mais aussi beaucoup de plantes herbacées vivaces ou annuelles.

2.1.4.1. Caractères botaniques

Il s'agit d'une sous-famille exceptionnellement homogène, très reconnaissable à l'aspect de ses feuilles alternes, stipulées et composées pennées, à celui de ses fleurs, à corolles dites « en papillon » et par ses fruits appelés gousses (**Dupont et al., 2007**). Traditionnellement, les Papilionoideae ont été caractérisées par des traits qui sont considérés maintenant comme des synapomorphies de la sous-famille (**Wojciechowski et al., 2004**). Ces caractéristiques incluent la présence de bois avec un parenchyme prédominant axial paratrachéal qui est assez rare ; des vaisseaux avec des trous alternés et de simples perforations plates ; l'absence de feuilles bipennées (**Wojciechowski et al., 2004**).

Les éléments les plus caractéristiques concernent la fleur des Papilionoideae :

La préfloraison est descendante (vexillaire). Les fleurs sont cyclisées, hermaphrodites et fortement zygomorphes par la corolle. La corolle, à symétrie bilatérale, présente une forme dite « papilionacée » c'est à dire qu'elle est constituée de cinq pétales disposés en forme de papillon. Le pétale dorsal (appelé aussi vexillum ou plus couramment étendard), recouvre les deux pétales latéraux ou ailes. Ces derniers recouvrent à leur tour, les deux pétales inférieurs, libres ou unis par leur bord interne sur une certaine

2.Revue bibliographique

longueur. Ces deux pièces inférieures constituent ensemble la carène 6 qui renferme l'androcée et le gynécée. L'androcée compte dix étamines qui peuvent être libres ou soudées. Elles s'unissent le plus souvent par leurs filets, formant un tube autour du carpelle (genre *Sophora*). Elles peuvent aussi être soudées entre elles et l'androcée est alors monadelphé (genre *Cytisus*). L'androcée est diadelphé⁷ quand neuf étamines sont unies en un tube ouvert en arrière et que l'étamine postérieure reste libre (genre *Vicia* et genre *Derris*).

2.1.4.2. Intérêts économiques et thérapeutique des Papilionoideae

Les Fabacées, et plus particulièrement la sous dérivées que par les Poaceae dans un classement des familles par importance économique.

De nombreuses plantes alimentaires, mais aussi des plantes fourragères, ornementales ou encore médicinales de premier ordre appartiennent à cette sous-famille. Il est néanmoins important de noter que de nombreux genres sont hautement toxiques **(Boutaghane, 2013)**.

L'intérêt agronomique des Fabaceae provient en premier lieu de leur aptitude à s'associer à des bactéries du sol (*Rhizobiaceae*), spécialement la bactérie « *Rhizobium leguminosafum* » pour former des organes symbiotiques racinaires «nodules » au sein desquels ces bactéries transforment l'azote atmosphérique en une forme assimilable par la plante, grâce à quoi, les fabacées peuvent produire en abondance des protéines végétales même en l'absence de fertilisation azotée. Pour cela, elles sont dites plantes améliorantes **(Boutaghane, 2013)**.

Une grande quantité de graines de diverses espèces herbacées de Papilionoideae, communément appelées légumineuses ou légumes secs, sont une source alimentaire universelle autant humaine qu'animale. Ces plantes alimentaires de grande consommation comprennent entre autres *Arachis hypogaea* L. (l'arachide ou cacahuète), *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (le pois d'Angole), *Cicer arietinum* L. (le pois chiche), *Dolichos lablab* L. (le poisindien), *Glycine max* Merr. (le soja), *Glycyrrhiza glabra* L. (la réglisse), *Lens* (les lentilles), *Phaseolus* (les haricots), *Pisum* (les pois) et *Vicia* (les fèves). Ces espèces sont cultivées dans le monde entier. Elles sont recherchées pour leur haute teneur en protéines et en minéraux **(Boutaghane, 2013)**.

2.Revue bibliographique

Certains genres font parties des plantes ornementales les plus prisées autant dans les pays tempérés que tropicaux. Les plus connus étant *Cytisus* (les gènes), *Laburnum anagyroides* Medik. (la pluie d'or ou Cytise à grappes), *Lathyrus* (les gesses), *Lupinus* (les lupins), *Wisteria* (les glycines) et *Genista*. Ce dernier possède une espèce très utilisée en industrie pour ses propriétés colorantes, *Genista tinctoria* L. ou genêt des teinturiers, de même que certaines espèces d'*Indigofera* dont est tirée la teinture d'indigo (Heywood 1996 ;Wojciechowski et al., 2004).

De nombreuses Faboideae ont joué, un rôle important dans l'histoire de l'industrie pharmaceutique. Dans la majeure partie des cas, non pas pour leur utilisation en tant que médicaments, mais comme source de matière première (par ex. lécithines de *Glycine max* Merr.), de molécules actives, de molécules pour l'hémisynthèse de médicaments (par ex. phytostérols de *Glycine max* Merr. ou des saponines de *Trigonella foenum-graecum* L.) ou encore d'excipients divers (par ex. baume du Pérou de *Myroxylon balsamum* Harms. ou gomme adragante d'*Astragalus gummifer* Labill) (Boutaghane, 2013).

Actuellement, plusieurs molécules très utilisées en thérapeutique sont extraites de diverses espèces de Faboideae : la spartéine, un alcaloïde ganglioplégique utilisé en cardiologie et en obstétrique, isolée de *Cytisus scoparius* L. Link, la rutine, un flavonoïde utilisé en phlébologie, isolée de *Sophora japonica* L. ou encore la physostigmine issue de *Physostigmavenenosum* Balf. Cette dernière est un inhibiteur réversible des cholinestérases, utilisée comme antidote de l'intoxication par les parasympholytiques et testée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. Elle n'est pas utilisée dans cette dernière indication, mais a permis la préparation d'analogues synthétiques potentiellement très prometteurs (Bruneton, (1999) ;boutaghane , 2013).

2.1.5. Le genre *Calycotome*

2.1.5.1. Origine du nom

Du grec calyx, calice, temnô, je coupe : le calice se rompt circulairement et paraît, comme coupé après la floraison (Abdelmalek, 2013).

2.Revue bibliographique

2.1.5.2. Caractères généraux du genre *Calycotome*

Le *Calycotome* est présent sous forme d'un arbuste épineux pouvant atteindre 1 et même 2 m de hauteur dans notre région. Les rameaux fortement imbriqués, ce qui rend parfois les matorrals occupés par cette espèce difficilement pénétrable. Cette plante est fortement inflammable et contribue à la propagation des incendies (**Damerdji et Djeddid, 2012**).

La racine porte habituellement des nodosités renfermant des bactéries permettant la fixation de l'azote atmosphérique. Les feuilles trifoliées et les fleurs de couleur jaune sont caractéristiques de la famille. Cultivée comme plante ornementale, les abeilles récoltent un nectar très sucré, peu abondant à la base des tubes d'étamines. Il préfère les matorrals siliceux (**Damerdji et Djeddid, 2012**).

Le genre *Calycotome* est caractérisé par la fleur dont le calice ovoïde, couronné par 5 petites dents, complètement clos dans le bourgeon et se rompant circulairement par le milieu au moment de la floraison ; étendard dressé, carène recourbée ; style arqué ; gousse comprimée, à suture ventrale élargie et étroitement ailée de chaque côté, à graines non caroncules. Les plantes de ce genre sont très-épineuses, à feuilles 3 folioles, à fleurs jaunes (**Abdelmalek, 2013**).

Tab.1: Description de *Calycotome* (**Quèzel et Santa, 1963 ; Chikhi, 2014**).

Partie de la plante	Description
Rameaux	Gris courts se terminant en fortes épines, couverts d'un duvet pulvérulent
Feuilles	Assez longuement pétiolées, comportent 3 folioles obovales
Fleurs	jaunes
Tiges	Parcourues par 13-16 fines cotes longitudinales
Gousse	Aplatie villeuse, à ailes de la suture ventrale très courtes

2.1.5. 3. Utilisation de la plante

Les genêts sont capables grâce aux nodosités sur leur racines, de fixer l'azote atmosphérique et d'enrichir le sol en produits azotés. Les ruminants évitent cette plante à cause de ses épines(**Abdelmalek, 2013**).

2.Revue bibliographique

2.1.6. L'espèce *Calycotome spinosa*

2.1.6.1. Description botanique

L'espèce *C. spinosa* est un arbrisseau de 1 à 2 mètres, à tige dressé, à rameaux épineux, divariqués, fortement striés, glabrescents; feuilles noircissant par la dessiccation, à folioles subsessiles, obovales, obtuses, glabres en dessus, à poils appliqués en dessous; stipules très petites ; fleurs solitaires ou fasciculées par 2-4; pédicelles 2-3 fois plus longs que le calice, portant au sommet une bractée bi-trifide ordinairement plus longue que large; carène aigu; gousse de 30-40 mm sur 6-8, glabre, luisante et noire à maturité, à suture supérieure seule un peu ailée, à bord droit; 3-8 graines. Lieux arides, surtout siliceux de la région méditerranéenne; Corse ; très commun en Algérie (**Abdelmalek, 2013**).



Fig.1 : Morphologie de la plante *calycotome spinosa*

Tab.2 : Aspects morphologiques de *Calycotome spinosa*

feuilles	Aspect de la feuille	Feuille légèrement glabre, Feuille à 3 folioles ovales.
	fleurs	
	Couleur de la fleur	Fleur jaune
	Disposition de la fleur	Unique fleur
	Taille de la fleur	Fleur de 12 à 18 cm de long
fruits	Aspect du fruit	Gousse oblongue, étroite et comprimée
	Taille du fruit	Fruit de 25 à 40 mm
plante	Aspect de la plante	Très ramifié, Très épineux
	Taille de la plante	Plante jusqu'à 3 m

2.Revue bibliographique

2.1.6.1. Classification de l'espèce *Calycotome spinosa*

La position systématique de cette espèce est :

Embranchement: Spermaphytes

Sous Embranchement: Angiospermes

Classe : Eudicotes

Sous Classe : Eurosidiées

Ordre : Fabales

Famille : Fabacées

Genre : *Calycotome*

Espèce : *Calycotome spinosa* L.(Link) (**Damerdji et Djeddid, 2012; Abdelmalek, 2013**)

2.1.6.2. Nomenclature

Nom commun : *Calycotome épineux*

Nom latin : *Calycotome spinosa* Link,

Nom vernaculaire : Genêt

Nom arabe : Guendoul (**Damerdji et Djeddid, 2012**).

2.1.6.2. Composition chimique

Calycotum spinosa se distingue des autres espèces par sa teneur en matières azotées totales élevée (33,7%) en formant un groupe homogène à part, la teneur en matière sèche des feuilles arbustes étudiés est comprise entre 28,20%, 63,57% de la matière organique. La teneur en tanins hydrolysables des espèces arbustives est généralement élevée surtout chez *Calycotum spinosa*. Cette plante est l'espèce la plus riche en composés phénoliques et en tanins totaux avec 119,43 et 83,68 g équivalent acide tannique/kg MS respectivement pour les deux composés (**Mebirouk-Boudechiche, 2014**).

2.1.6.3. Utilisation traditionnelle de *Calycotome spinosa*

- Malgré leurs avantages qui résident dans leur capacité de fixer l'azote atmosphérique et d'enrichir le sol en produits azotés grâce aux nodosités sur leurs racines, le genêt épineux est utilisé dans la phytothérapie (**Mokhtari, 2012**).

2.Revue bibliographique

- Dans les indications thérapeutiques, le *Calycotome spinosa* L est utilisée comme un anti-ictérique (**Sari, 2013**).
- Les fleurs et les feuilles de *Calycotome spinosa* L Link sont riches en flavonoïdes, qui sont utilisées dans le traitement des maladies cardiovasculaires, des cas de cancer, et des ulcères gastroduodénaux (**Larit et al., 2012**).
- Pour les soins des pathologies musculaire et squelettique (rhumatismes, douleurs dorsales, insuffisance de moelle osseuse, fatigue, etc.) (**Meddour et al., 2009**).
- Le genêt épineux a des propriétés antioxydants et anti inflammatoires (**Larit et al., 2012**).

Dans les utilisations médicinales, cette plante a été aussi signalée comme étant agent antitumoral (**Hartwell, 1982inDjeddi, 2015**)et efficace pour le traitement de furoncle, abcès cutané et de l'engelure dans la Sicil (**Lentini et al, 1993**) in (**Djeddi, 2015**).

2.2. Les métabolites secondaires

2.2.1. Généralités

Le terme «métabolite secondaire», qui a probablement été introduit par **Albrecht Kossel** en **1891**, est utilisé pour décrire une vaste gamme de composés chimiques dans les plantes, qui sont responsables des fonctions périphérique indirectement essentielles à la vie des plantes. Telles que la communication intercellulaire, la défense, la régulation des cycles catalytiques (**Guillaume, 2008**).

Les métabolites secondaires (MS) sont présents dans toutes les plantes supérieures, et ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Dont plus de 200.000 structures ont été définies (**Hartmann, 2007**) et sont d'une variété structurale extraordinaire mais sont produits en faible quantité. Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique.

Les métabolites secondaires des plantes appartenant à la famille des Fabacées, en particulier dans la tribu des Millettiées, sont très nombreux et très variés (**Ata Martin, 2006**).

2.2.2.L'importance des métabolites secondaires

Ces métabolites secondaires ont des fonctions très importants pour la survie et la propagation des plantes qui les produisent, comme signaux chimique, pour défendre leur producteur contre les herbivores et les pathogènes, comme ils participent à des réponses allélopathiques (compétition entre les plantes pour la germination et croissance), Certains assurent une protection contre les radiations solaires et d'autre encore facilitent la dispersion du pollen et des graines (**Jeun et al., 2005**).

Les métabolites secondaires sont aussi très exploités par l'homme dans les différents domaines : dans le domaine culinaires comme colorants et arômes, dans le domaine agricole comme herbicides et dans le domaine médicinale comme antibiotiques, antioxydant, drogues.....etc. (**Bruneton, 1993 ; Krief, 2003**).

2.2.3. Classification des métabolites secondaires

On peut classer les métabolites secondaires en trois grands groupes : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (**Haven et al., 2000 ; Krief, 2003**).

2.2.3.1. Polyphénols

- **Généralités**

Les polyphénols constituent une famille de molécules largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés comme l'indique le nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire. Ces composés sont le produit du métabolisme secondaire des plantes.

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (**Urquiaga et Leighton, 2000**). La structure des composés phénoliques naturels varie de puis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) (**Macheix et al, 2005**).

2.Revue bibliographique

- **Localisation des polyphénols dans les plantes**

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des métabolites secondaires largement répandues dans le règne végétal étant trouvé dans tous les fruits et les légumes. Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes mais avec une répartition quantitative qui varient entre les différents tissus. Plus de 8000 structures phénoliques ont été identifiées (**Urquiaga et Leighton, 2000 ;Waksmundzka-Hajnos et Sherma, 2011**). Allant de simples molécules comme les acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins (**Dai etMumper, 2010**).

A l'échelle de la cellule, les composés phénoliques sont principalement répartis dans deux compartiments: les vacuoles et la paroi. Dans les vacuoles, les polyphénols sont conjugués, avec des sucres ou des acides organiques, ce qui permet d'augmenter leur solubilité et de limiter leur toxicité pour la cellule. Au niveau de la paroi, on trouve surtout de la lignine et des flavonoïdes liés aux structures pariétales. Les composés phénoliques sont synthétisés dans le cytosol. Une partie des enzymes impliquées dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes est liée aux membranes du réticulum endoplasmique, où elles sont organisées en métabolons.

Au niveau tissulaire, la localisation des polyphénols est liée à leur rôle dans la plante et peut être très caractéristique. Au sein même des feuilles la répartition des composés est variable, par exemple les anthocyanes et les flavonoïdes sont majoritairement présents dans l'épiderme. Au niveau de la plante entière, il faut noter que certains composés ne sont accumulés que dans des organes bien définis. Chez la pomme par exemple, les composés phénoliques interviennent au niveau de la coloration de la peau via les anthocyanes, et dans la qualité (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV). Toutes les catégories de composés phénoliques sont impliquées dans les mécanismes de résistance **Dicko et al. (2006)**. Ils assurent la communication entre cellules, entre végétaux, entre végétaux et animaux.

- **Biosynthèse des composés phénoliques**

Les polyphénols sont synthétisés par de deux voies biosynthétiques :

La voie de Shikimate (**Keninget et al., 1995 ; Floss, 1997**).

La voie de Phénylpropanoïde (**Hoffmann et al., 2004**).

- **Utilisation des polyphénols**

Les polyphénols font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**). D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales, alliées à leur difficulté de production. Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) (**Macheix et al, 2005 et Bénard, 2009**).

Ils sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (**Laaboudi,2012**). Ils sont synthétisés par l'ensemble des végétaux et ils participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques (agents pathogènes, blessures, symbiose) ou abiotiques (lumière, rayonnements UV, faible température, carences). Les polyphénols contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume) (**Visioli et al., 2000**).

La nature et la fonction des composés phénoliques s'accumulant dans les plantes sont variables. Ils présentent des propriétés anti-microbiennes; ce sont des phytoalexines. Ces composés de défense regroupent différentes classes de composés tels que les isoflavonoïdes prénylés, les stilbènes, les coumarines, les flavonols ou encore les aurones. D'autres composés ont des fonctions dans la signalisation comme l'acide salicylique, molécule signal dans les mécanismes de résistance. La blessure et l'attaque par des herbivores induisent la synthèse de l'acide chlorogénique ou d'esters phénoliques liés aux parois cellulaires, ces composés pouvant agir directement en tant que molécules de défense ou servir de précurseurs à la synthèse de la lignine, de la subérine et autres barrières polyphénoliques. Par ailleurs, la quantité d'anthocyanines augmente fortement après un stress au froid ou un stress nutritionnel (**Hoffmann, 2003**).

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans le métabolisme de la plante mais aussi peuvent réagir dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (**Boubekri, 2014**).

- **Importance biologique des polyphénols**

Les polyphénols possèdent un large éventail d'activités biologiques *in vitro* (antibactérienne, anti-cancérogène, anti-inflammatoire, antioxydante etc...) liées à leur caractère réducteur et à leur affinité pour les protéines et les ions métalliques. Les polyphénols présentant ainsi des propriétés antioxydantes bien établies et en lien avec l'inhibition de l'oxydation aussi bien dans le domaine alimentaire (oxydation des lipides) que physiologique (stress oxydant). Ces substances suscitent beaucoup d'intérêts dans plusieurs domaines, celui de la nutrition par leur caractère préventif à l'égard de diverses maladies citées précédemment, en cosmétologie et surtout dans les industries agroalimentaires par leurs implications, en particulier, sur la flaveur des aliments et leur incidence sur la conservation des produits alimentaires.Ainsi, ils pourraient constituer une alternative à l'utilisation des additifs alimentaires synthétiques, buthylhydroxyanisole (BHA) et buthylhydroxytoluène (BHT), qui ont montré des effets nuisibles (effet carcinogène) (**Morand et Milenkovic, 2014**). Une meilleure connaissance du devenir des polyphénols d'importance alimentaire après ingestion et des effets nutritionnels qui en découlent est essentielle d'un point de vue de nutrition préventive.

Les composés phénoliques sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique (**Crozier et al., 2010**). De nombreux travaux suggèrent que les polyphénols participent à la prévention des maladies cardio-vasculaires (**Manach et al., 2005**). Leur consommation se traduit par une augmentation transitoire de la capacité anti-oxydante du plasma dans les heures qui suivent le repas.

Parvenus au niveau des artères, ils préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (Low Density Lipoproteins ou LDL), qui est l'un des facteurs clé du processus physiopathologique de l'athérosclérose (**Manallah, 2012**).

Les polyphénols agiraient aussi en inhibant l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose qui peut conduire à l'occlusion des artères (**Manach et al., 2005**). Ils sont regroupés dans la catégorie de veinotoniques et des vasculo-protecteurs (**Ghosh, et al., 2009**). Un certain nombre de molécules polyphénoliques sont également en étude clinique comme des antiagrégants plaquettaires ou hypotenseurs sans résultats probants (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

2.Revue bibliographique

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques dans la qualité alimentaire, impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (**Bahorun, 1997**).

Ces composés montrent des activités antioxydantes (**Gomez-Caravaca et al., 2006 ; Xiuzhenetal.,2010**), anticarcinogènes, antiinflammatoires, antiathérogènes, antithrombotiques analgésiques, antibactériennes, antiviraux (**Babar Aliet al. 2007**), anti-allergènes, vasodilatateurs (**Falleh et al., 2008 ; Hodgson, 2010**).

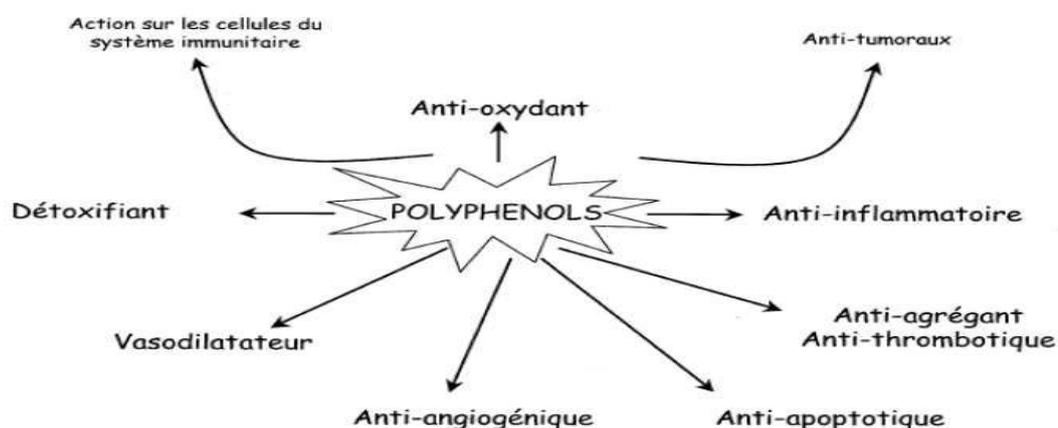


Fig.2 : Effets biologiques des polyphénols (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**)

- **Activité antioxydante**

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

- **Classification des polyphénols**

Les polyphénols peuvent se regrouper en deux grands groupes :

Les non flavonoïdes, dont les principaux composés sont : les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les lignines et les coumarines (**Hoffmann, 2003**).

Les flavonoïdes, donton caractérise principalement : les flavones, flavanones, flavonols, isoflavonones, anthocyanines, proanthocyanidines et flavanols (**Pincemail et al., 2007**).

2.2.3.2. Les flavonoïdes

- **Généralités**

Les flavonoïdes occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. On estime que 2 % environ du carbone organique photo-synthétisé par les plantes, soit quelques 109 tonnes par an, est converti en flavonoïdes (**L'huillier, 2007**).

Ils constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux. Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base (C6-C3-C6), ils contiennent quinze atomes de carbone dans leur structure de base: deux cycles aromatiques A et B à six atomes de carbone liés avec une unité de trois atomes de carbone qui peut ou non être une partie d'un troisième cycle C.

Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés dans les plantes, et la liste ne cesse de croître. C'est à cause de l'apparition de nombreux modèles de substitution ; les substituants primaires (groupe hydroxyle) peuvent eux-mêmes être substitués (glycosylés ou acylés) donnant parfois des structures très complexes **D'archivio (2007)** Les principales classes des flavonoïdes sont : les flavonols ,les flavones, les flavanones, les flavan-3-ols, les isoflavones et les anthocyanes **Sadasivam et Thayumanavan (2003)**., ils varient dans leurs caractéristiques structurelles par la diversité fonctionnelle autour de l'oxygénation de l'hétérocycle.

- **Étymologie**

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange (**Piquemal, 2008**), cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus=jaune) (**Karaali et al., 2004 ; Malešev et Kuntić, 2007**).

- **Structure chimique**

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones (C6-C3- C6) (**Emerenciano et al., 2007**) constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne

2.Revue bibliographique

en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) (W- Erdman *et al.*, 2007), portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides (Narayana, 2001; Milane, 2004; Malešev et Kuntić, 2007).

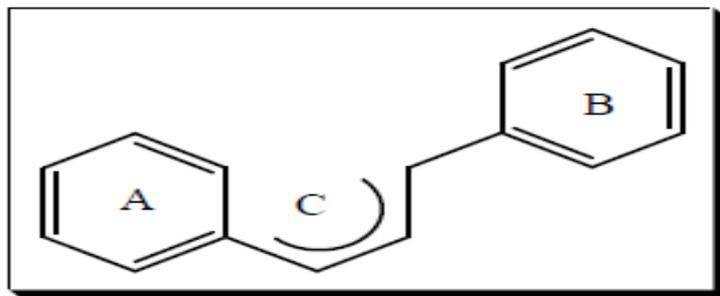


Fig.3: Squelette de base des flavonoïdes

- **Classification**

Tous les flavonoïdes peuvent être classés en plusieurs groupes selon le degré d'oxydation du cycle pyranique central (la chaîne en C3 (Brunton, 1999), le noyau B est relié à l'hétérocycle C dans les positions 2, 3 ou 4.

- **Distribution**

Les flavonoïdes peuvent être présents dans toutes les parties des plantes. Dans la majorité des cas, les flavonoïdes sont présents sous forme glycosylée dans les plantes car la glycosylation a pour effet de les rendre moins réactifs et plus hydrosolubles permettant alors leur stockage dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs, de l'épiderme et du mésophylle des feuilles, des parenchymes des tiges et racines.

Les génines seules sont présentes dans les exsudats farineux de certaines plantes, dans les cuticules des feuilles, écorces et bourgeons (Lhuillier, 2007).

Le monde animal est lui aussi concerné par les flavonoïdes. On trouve par exemple dans la propolis des abeilles (Marfak, 2003), elles mettent en œuvre les propriétés antifongiques et antibactériennes des polyphénols pour aseptiser leurs ruches (Lahouel, 2005). Il est à noter que les flavanones et les flavones ont été isolés d'un corail marin et d'un petit nombre de champignons (Lhuillier, 2007).

- **Effets biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes**

Les flavonoïdes présentent un intérêt thérapeutique qui date de la découverte de la vitamine C par (Szent Gyorgyi, 1937), chercheur de l'université de Szeged (Hongrie), et d'autres propriétés. Etant de distribution ubiquitaire au sein des végétaux, les

2.Revue bibliographique

flavonoïdes pourraient être à l'origine des vertus préventives et curatives de plusieurs plantes médicinales. La principale propriété, initialement attribuée aux flavonoïdes, est d'être vasculoprotectrices et venotoniques, car ils sont capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance (**Bruneton, 1999**).

Actuellement, les flavonoïdes sont connus par de remarquables activités pharmacologiques comme entre autres des effets, antivirales, antimicrobiens et anticancéreux (**Narayana et al., 2001 ; Seyoum et al., 2006**) antiallergiques, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, anti-tumoraux et hépatoprotecteurs (**Middleton et al., 2000**). Ces activités sont attribuées en partie aux propriétés anti-oxydantes de ces composés naturels (**Meziti, 2009**).

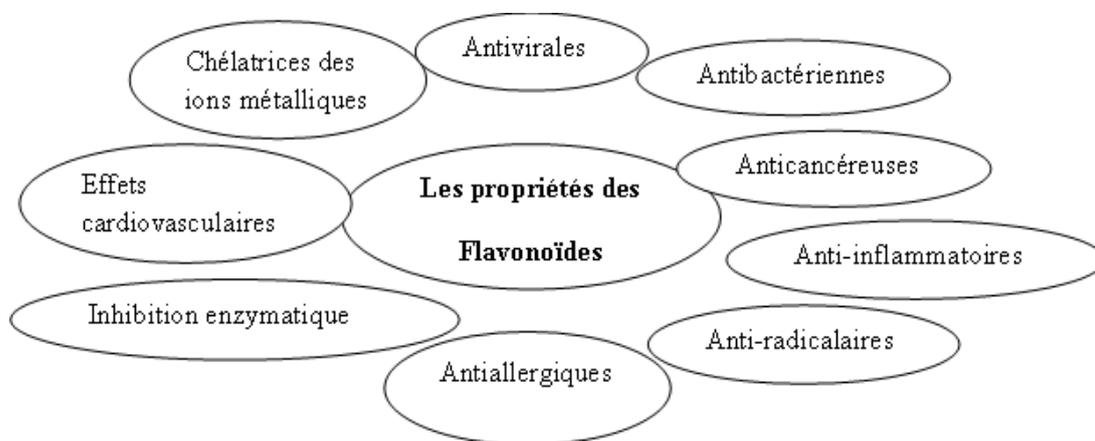


Fig.4: Propriétés biologiques des Flavonoïdes

2.3. Les micro-organismes

2.3.1. Généralités

Les micro-organismes aussi appelés microbes et protistes, forment un ensemble d'organismes vivants microscopiques, invisibles à l'œil nu. C'est leur seul point commun, car ils diffèrent et varient par leur morphologie, leur physiologie, leur mode de reproduction et leur écologie.

D'après son étymologie, le mot micro-organisme signifie « petit organisme ». En effet, les micro-organismes sont de minuscules organismes vivants invisibles à l'œil nu et présents presque partout sur terre. Ils ont un rôle essentiel dans la nature mais sont source de nombreux problèmes dans l'industrie alimentaire. Leur activité métabolique modifie la composition des aliments qu'ils ont infectés.

2.Revue bibliographique

Les protistes se composent : des bactéries, des protozoaires, des champignons (mycètes) microscopique, et des algues. Les virus sont considérés comme des micro-organismes non vivants, acellulaires qui dépendent entièrement des cellules hôtes infectées.

(Yahiaoui, 2015).

2.3.2. Les différents types de micro-organismes

2.3.2.1. Les bactéries

Les bactéries sont des micro-organismes que l'on rencontre pratiquement partout. Leur présence est souvent manifeste : les blessures s'infectent, le lait s'acidifie, la viande se putréfie, mais, on ne peut les voir qu'au microscope.

Ils sont généralement unicellulaires et leurs cellules sont des cellules de type procaryote. Les caractères propres des procaryotes ont été décrits dans Des procaryotes nommés algues bleu-vert jusqu'aux années soixante, parfois assimilés aux bactéries, ont reçu le nom de cyanobactéries. Ces organismes ont des caractères communs aux bactéries, mais ils en diffèrent aussi. Pour cela nous utiliserons le terme bactérie dans un sens restrictif qui exclut les cyanobactéries.

La classification de Bergey sépare les bactéries en 4 divisions, selon la présence ou non d'une paroi et selon la nature de cette paroi, que l'on peut déterminer grâce à la coloration de GRAM

Les bactéries à GRAM négatif

Les bactéries à GRAM positif

Les mycoplasmes (bactéries sans paroi)

Les archaebactéries (Yahiaoui 2014-2015).

- **Bactéries à GRAM négatif**

Ils représentent plus de 66 % des bactéries répertoriées dans la classification de Bergey. Elles possèdent une paroi qui donne à la cellule sa forme. Cette paroi est formée d'une couche de peptidoglycane comprise entre la membrane externe et la membrane cytoplasmique. Sur une base morphologique on distingue dans cette division les groupes suivants :

2.Revue bibliographique

Les bacilles à Gram négatif : *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*, *Bactéroïdes.*, *Rhizobium Nitrobacter*, *Thiobacillus*. *Pseudomonas*, *Acetomonas* et *Xanthomonas*.

Quelques maladies humaines dues à des bactéries de Gram négatif

- ✓ *Leptospira interrogans* : agent d'une jaunisse infectieuse.
- ✓ *Treponema pallidum* : agent de la syphilis chez l'homme. Il mesure 5 à 15 µm de longueur. On ne peut les cultiver que dans des lapins.
- ✓ L'un des agents infectieux le plus représentatif est *Rickettsia prowazekii* : agent du typhus épidémique, transmis par le pou (par pique ou par les excréments de pou contenant les microbes à travers une blessure). Les rickettsies sont capables de produire une partie de leur énergie par l'oxydation de quelques substrats tels que le glucose et le pyruvate.
- ✓ L'agent infectieux le plus connu chez l'homme est *Chlamydia trachomatis* (Trachome). C'est une infection et une inflammation des conjonctives de l'œil. Il peut entraîner une cécité partielle ou totale. Il existe aussi une forme transmissible sexuellement et qui peut provoquer l'infertilité suite à l'infection.

• Les Bactéries à Gram Positif

Les Bactéries à Gram Positif moins nombreuses que les Gram négatif. Leur paroi est plus simple mais plus épaisse. D'un aspect uniforme, elle est constituée de peptidoglycane dans lesquels sont dispersés d'autres composants comme les acides teichoïques. Elles sont très variées sur le plan morphologique, physiologique et écologique (exemple, *Clostridium* et *Bacillus*, des *Lactobacilles*, *Streptococcus* et *Staphylococcus* et les *actinomycètes*).

Quelques maladies humaines dues à des bactéries de Gram positif

- ✓ *Clostridium botulinum* : 2 à 9 µm, anaérobie strict. Agent du botulisme. Ils existent 7 types principaux de souches (A à G) selon la toxine qu'ils produisent.
- ✓ *Clostridium perfringens* : 3 à 9 µm, immobile. Il tolère une faible quantité d'oxygène et forme rarement des endospores. Il dégage du gaz dans des milieux enrichis. Agent d'intoxications alimentaires, la gangrène gazeuse.

2.Revue bibliographique

- ✓ *Clostridium tetani* : 2 à 5 µm, mobiles. Il est responsable du tétanos. Lorsqu'il sporule, la spore est à l'extrémité du bacille, il ressemble à une baguette de tambour.
- ✓ *Staphylococcus aureus* est présent sur la peau et sur les muqueuses de l'homme et des animaux. Il est responsable d'intoxication alimentaire et d'infections graves (Yahiaoui, 2014-2015).

2.3.2.2. Les champignons

Tout comme les bactéries, les champignons sont présents dans le sol, l'eau et l'air.

Le terme champignons nous évoque spontanément les cèpes, les morilles et autres espèces comestibles ou non qui sont constituées d'un chapeau et d'un pied. Mais nous allons nous intéresser aux champignons microscopiques. Ce sont des microorganismes eucaryotes caractérisés par la présence d'une membrane nucléaire et de mitochondries. Ils sont ubiquitaires et très répandus dans la nature, notamment au niveau des végétaux en décomposition. Parmi lesquels on distingue les levures et les moisissures.

A) les levures

✓ Définition

Le mot levure, selon Phaff *et al.* (1968), provient du mot latin « levare » qui se traduit par lever. Ce mot a été appliqué aux levures en raison de l'aptitude de ces microorganismes à produire de CO₂ pendant la fermentation et à lever la surface mousseuse d'un milieu liquide de fermentation (Oteng-Gyang, 1984).

Les levures sont des eucaryotes chimio-hétérotrophe, c'est-à-dire qu'elles sont capables de tirer leur énergie à partir des réactions d'oxydo-réduction ou de fermentation de composés chimique tels que les sucres (Guiraud et Galzy, 1998 ; Guiraud, 1996). Elles sont ubiquitaires, on les rencontre fréquemment dans les eaux, le sol, les feuilles de végétaux, les moûts de fruits, à la surface ou à l'intérieur d'autres êtres vivants, etc., (Bouix et Leveau, 1991 ; Scriban, 1993 ; Leveau et Bouix, 1993 ; Pol, 1996).

Les levures présentent un grand nombre d'applications industrielles par rapport aux procaryotes et possèdent un capital génétique qui subit peu de mutations (Larpent, 1990 ; Pol, 1996).

2.Revue bibliographique

Quelques maladies dues par les levures

- ✓ **Les malassezioses** : Les malassezioses sont dues à des levures classées dans le genre *Malassezia*. Ce sont des levures kératinophiles, appartenant à la flore commensale de l'homme et des animaux à sang chaud. Elles sont responsables chez l'homme du pityriasis versicolor et de la dermatite séborrhéique.
- ✓ **Le pityriasis versicolor** : C'est une mycose superficielle, très fréquente, bénigne, cosmopolite, due à une levure lipophile, saprophyte de la peau : *Malassezia furfur*. La lésion élémentaire est une macule arrondie ou ovale squameuse, à limites nettes.
- ✓ La confluence des macules réalise des lésions de taille variable, finement squameuses (signe du copeau), achromiques et très inesthétiques sur peau noire.
- ✓ **Les candidoses cutanées et phanériennes** : Elles sont dues à des levures *Candida sp.*
- ✓ **Les candidoses cutanées** : Elles se traduisent par des intertrigos des grands plis (plis inguinaux, sous-mammaires, axillaires, inter-fessier) ou des petits plis (plis interdigitaux, commissure labiale, rarement inter-orteils). La peau est érythémateuse, suintante, fissurée au fond du pli recouvert d'un enduit blanchâtre. Les contours irréguliers de la lésion sont limités par une bordure « en collerette desquamative » (Aubry et Gaüzère, 2015).

B) Les moisissures (champignons filamenteux)

Les moisissures sont des champignons microscopiques (1 à 60 micromètres) filamenteux uni ou pluricellulaires eucaryotes hétérotrophes (qui se nourrissent en décomposant de la matière organique ou en parasitant un hôte). La multiplication des moisissures se fait par reproduction asexuée, c'est-à-dire par émission de spores, ou par reproduction sexuée (pour certaines espèces).

Une moisissure est composée d'une partie végétative qui puise dans le milieu les éléments nutritifs nécessaires et de structures reproductrices qui servent à la multiplication et à la dissémination de l'espèce.

Lorsqu'un aliment est conservé dans de mauvaises conditions, des moisissures contaminent l'aliment et le dégradent. Certaines moisissures peuvent même libérer dans l'aliment des mycotoxines qui ont des conséquences sanitaires importantes.

2.Revue bibliographique

Les moisissures sont des champignons microscopiques ubiquistes qui regroupent des milliers d'espèces. Ces champignons produisent des spores qui sont invisibles à l'œil nu et qui peuvent passer, chez la plupart des espèces, en suspension dans l'air. Les moisissures peuvent également élaborer des substances chimiques susceptibles de demeurer à l'intérieur des spores, d'être libérées dans les matériaux qu'elles colonisent ou encore d'être libérées dans l'air ambiant.

Dans les régions tempérées, la concentration et la diversité des espèces fongiques varient principalement selon la saison et la disponibilité des matières organiques retrouvées dans la nature (d'Halewyn et al., 2002).

- **Métabolites secondaires des moisissures (Mycotoxines)**

Il arrive parfois que ces moisissures produisent des métabolites secondaires dont certains, les mycotoxines, peuvent représenter un risque pour la santé humaine.

Plusieurs genres de moisissures sont connus comme étant producteurs de mycotoxines : *Parmieux*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* et *Claviceps*. Une même espèce fongique peut produire plusieurs sortes de mycotoxines selon les conditions de culture et une même mycotoxine peut être produite par plusieurs espèces fongiques différentes (Frémy et al. 2005; Bullerman et al. 2007).

Quelques exemples de genres de moisissures et de leurs mycotoxines sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tab.3 : Principaux genres de moisissures et leurs mycotoxines associées

Espèce fongique	Mycotoxines associées
<i>Aspergillus sp.</i>	Gliotoxine, fumagilline, acide helvolique, tryptacidine, fumitrimorgines, fumiquinazolines, aflatoxines, ochratoxines
<i>Alternaria sp.</i>	Alternariol, acide tenuazonique
<i>Claviceps sp.</i>	Alcaloïdes (ergotamine et dérivés)
<i>Fusarium sp.</i>	Trichothécènes (déoxynyvalénol, toxine T-2, diacétoxy-scirpénol, nivalénol), zéaralénone, fumonisines, fusarine, moniliformine
<i>Penicillium sp.</i>	Ochratoxine A, pénitrem A, acide cyclopiazonique, patuline, citrinine.

2.Revue bibliographique

Tab.4 : Effets des principales mycotoxines sur l’homme et mécanismes d’action cellulaires et moléculaires identifiés (Afssa, 2009)

Mycotoxine	Effets	Mécanismes d’action
Aflatoxine B1 et M1	Hépatotoxicité Génotoxicité Cancérogénicité Immunomodulation	Formation d’adduits à l’ADN Péroxydation lipidique Bioactivation par des CYP 450 Conjugaison aux Glutathion transférases
Ochratoxine A	Néphrotoxicité Génotoxicité Immunomodulation	Impact sur la synthèse des protéines Inhibition de la production d’ATP Détoxication par les peptidases
Trichothécènes (A et B)	Hématotoxicité Immunomodulation Toxicité cutanée	Induction de l’apoptose sur progéniteur Hématopoïétique et cellules immunitaires Impact sur la synthèse des protéines Altération des immunoglobulines
Patuline	Neurotoxicité Mutagenèse in vitro	Inhibition indirecte d’enzymes
Zéaralénone	-Fertilité -Reproduction	-Liaison aux récepteurs oestrogéniques -Bioactivation par des déshydrogénases -Conjugaison aux glucuronyltransférases
Fumonisine B1	-Lésion du système nerveux central -Hépatotoxicité -Génotoxicité -Immunomodulation	-Inhibition de la synthèse de céramide et altération du rapport sphinganine/sphingosine -Altération du cycle cellulaire

2.Revue bibliographique

Tab.5: Maladies de plantes causées par certaines moisissures

Maladies	Moisissures	Symptômes	Images
Agathis Moorei.A .Ovata Kaori (Anthracnose)	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Ce parasite foliaire est surtout actif sur les jeunes plants en pépinière où il peut entraîner d'importantes chutes de feuilles, l'affaiblissement et parfois la mort des arbrisseaux.	
Allium porrum poireau	<i>Alternaria porri</i>	Taches arrondies, crème, couvertes d'un feutrage mycélien diffus, concentrique, brun rouille lors de la production des spores. L'extension des taches peut entraîner le dessèchement complet des feuilles atteintes, principalement les plus extérieures. Les symptômes de cette maladie s'observent également sur l'oignon	
Ail Moisissure de la gousse	<i>Aspergillus niger</i>	Cette moisissure non spécialisée se présente sous l'aspect d'un feutrage mycélien dense, brun foncé à noir, se développant sur une tache nécrosante, entraînant ainsi la pourriture sèche et la momification des gousses. Maladie observée lors de la conservation.	

Matériel et méthodes

3. Matériel et méthodes

3- Matériels et méthodes

Le présent travail est réalisé au niveau du laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LAMyBAM), université des frères Mentouri-Constantine-

3-1 Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des fruits et des fleurs de *Calycotome spinosa*. La partie aérienne a été récoltée dans la région de Constantine, Est de l'Algérie (la forêt de Chattaba-Ain Smaraa) en Juin 2016 (les fruits) et en Mars 2017 (les fleurs) (Fig.4). Elle a été authentifiée par la Professeure Khalfallah Nadra (Département de Biologie et Ecologie végétale, faculté des SNV- Université des Frères Mentouri-Constantine).



Fig.5: *Calycotome spinosa* (Mars 2017 et Juin 2016)

3.1.1. Préparation de la plante

Le matériel végétal a été ensuite découpé puis séché à l'ombre et à température ambiante pendant trois jours. Enfin, les fruits et les fleurs sèches ont été pulvérisés au broyeur pour obtenir une poudre fine.

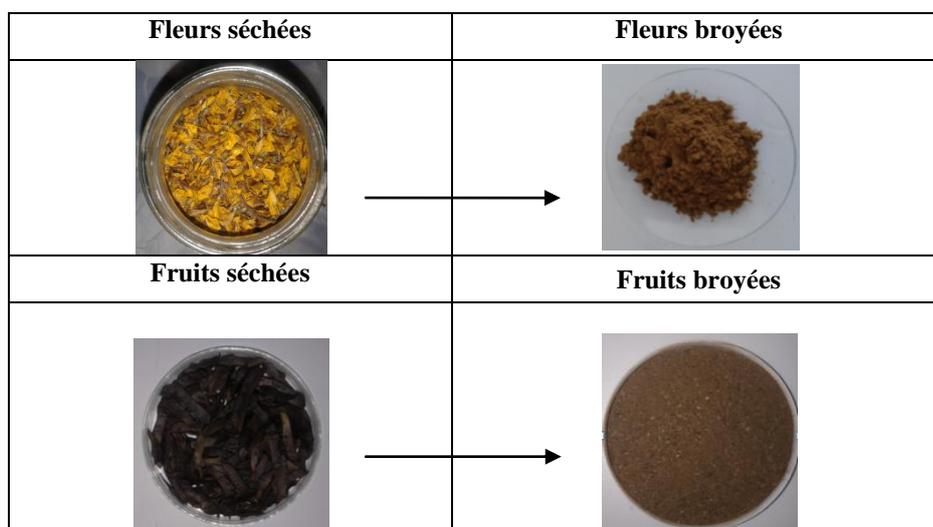


Fig.6 : *Calycotome. spinosa* séchée puis finement broyée

3. Matériel et méthodes

3.1.2. Extraction de la plante

40 g des poudres des fruits et des fleurs de la plante sont agités vigoureusement dans 200 ml méthanol et eau distillée à l'aide d'un vortex. Après 24 heures, les macéras ont été centrifugés pendant 20 min à 4000 t/min à température ambiante, puis filtrés sur papier Wattman N°1. Cette opération a été répétée 3 fois.

Les filtrats obtenus sont concentrés à l'évaporateur rotatif (**Heidolph**) à pression réduite à 45°C.

3.1.3. Détermination du rendement des extraits secs

Le rendement des extraits méthanolique et aqueux est déterminé par le rapport du poids de l'extrait sec après évaporation sur le poids de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction, multiplié par 100% (**Bekhechi-Benhabib, 2001**).

$$R\% = \frac{\text{Masse de résidu d'extrait}}{\text{Masse de la poudre végétale}} \times 100$$

3.2. Activités antimicrobiennes

3.2.1. Souches microbiennes testées

Il s'agit de 13 souches dont six bactéries (*Bacillus sibtillus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella abony*, *Klabseilla pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, une levure (*Candida albicans*) et six moisissures isolées à partir du blé dur : *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Penicillium sp.1*, *Penicillium sp.2* et *Aspergillus sp.*

S. aureus, *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* et *Candida albicans* proviennent des laboratoires de bactériologie, parasitologie-Mycologie médicale et Microbiologie - Hôpital Militaire- Constantine.

B. sibtillus et *S. abony* proviennent du laboratoire de bactériologie - Hôpital Universitaire – Constantine.

3.2.2. Préparation des milieux de cultures

Selon les méthodes employées, les milieux de cultures suivants ont été utilisés:

- Gélose Mueller Hinton
- Milieu Mac Conkey
- Milieu Chapman
- Milieu Sabouraud +Chloramphénicol
- Milieu PDA

3. Matériel et méthodes

3.2.3. Test antibactérien

Ce test a été réalisé par la méthode de diffusion en milieu solide (Vinod *et al.*, 2010, Traoré *et al.*, 2012) en déterminant les diamètres des zones d'inhibition en mm.

- **Préparation des disques**

Des disques de 6 mm de diamètre découpés à partir d'un papier Wattman n°1, stérilisés et imprégnés de différentes concentrations des extraits aqueux et méthanolique (25, 50, 100, 150 et 200mg/mL), de l'antibiotique (Chloramphénicol 1.5mg/ml), de l'antifongique (Fluconazol 1 mg/ml) et de DMSO à raison de 20µL par disque (Traoré *et al.*, 2012).

- **Réactivation des souches bactériennes**

A partir du tube de conservation, les bactéries et la levure à tester ont été ensemencées sur des boîtes de Pétri contenant des milieux sélectifs appropriés aux souches microbiennes utilisées puis incubés à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et 28°C pendant 48h pour la levure, afin d'obtenir des colonies jeunes et bien isolées.

- **Préparation de l'inoculum bactérien**

Après 24 heures d'incubation des souches bactériennes, 1 à 2 colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées à l'aide d'une anse de platine, puis émulsionnées dans un tube contenant l'eau physiologique 0.9% puis agiter au vortex. La densité de l'inoculum a été ajustée à 0,5 Mc Farland (1.2×10^7 cellules /ml) (Daouda, 2015).

- **Test d'efficacité**

A l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la suspension bactérienne standardisée, on ensemence uniformément toute la surface des boîtes contenant le milieu Mueller - Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour la levure (Ouibrahim, 2015).

Après séchage de la surface (environ 5 min), Les disques préparés ont été déposés délicatement à l'aide d'une pince flambée au Bec Bensen sur la surface d'un milieu préalablement ensemencé par les souches microbiennes. Parallèlement, l'antibiotique, l'antifongique et le DMSO ont été utilisés. Les boîtes gélosées ainsi préparées sont maintenues à 4°C durant 20mn afin de permettre la pré-diffusion. Ensuite, elles ont été incubées à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 28°C pour la levure (Traoré *et al.*, 2012).

3. Matériel et méthodes

- **Lecture**

La mesure des diamètres d'inhibition des souches étudiées ont été réalisées après 24 heures d'incubation.

- **Détermination de la CMI par la méthode de dilutions**

La CMI a été déterminée suivant la méthode de diffusion (**Benjlali et al., 1986**) rapporté par (**Billerbeck et al., 2002**). Diverses solutions d'extraits de la plante ont été préparées à des concentrations différentes (25; 50; 100; 150 et 200 mg/ ml). Ces divers extraits ont été imbibés sur des disques (papier buvard stérile) puis, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 heures.

La CMI de l'extrait de la plante sur la souche étudiée est définie comme sa plus faible concentration inhibant l'activité microbienne après 18 à 24 h de contact à 37°C, c'est à dire on observe aucune croissance bactérienne visible à l'œil nu (**Skandamis et Nycha; 2001**)in (**Nsemi muanda, 2010**).

3.2.4. Activité antifongique

Six souches de champignons phytopathogènes isolés à partir d'une collection du blé dur algérienne ont été utilisées: *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Penicillium sp1*, *Penicillium sp2*, *Aspergillus sp.* et *Rhizopus sp.* Les souches fongiques ont été conservées dans (PDA) à 4°C. Les souches étaient autorisées à croître pendant 4 à 7 jours avant utilisation dans le test d'activité antifongique.

L'inhibition de la croissance mycélienne a été déterminée en coupant des disques d'environ 6 mm de diamètre bord d'une culture jeune de champignons et mise en place du disque au centre d'une boîte de Pétri sur PDA contenant 20 mg ml⁻¹ d'extraits aqueux et méthanolique des fruits et des fleurs de *Calycotome spinosa* préalablement stérilisés.

Les boîtes ont été laissés à incuber à température ambiante et l'expérience s'est terminée lorsque le contrôle (PDA sans extrait) a complètement colonisé la surface de la gélose. La croissance radiale a été mesurée par rapport à deux répétitions par expérience.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition dans les milieux contenant des extraits par rapport au contrôle selon la formule de **Bautista-Ban~os et al. (2002)**.

3. Matériel et méthodes

En outre, l'efficacité du fongicide commercial Fluconazol a été évalué en employant 1g L^{-1} en milieu PDA (**Chavez-Quintal et al., 2011**).

Le pourcentage d'inhibition (PI%) a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{PI \%} = [(C-T)/C] \times 100$$

C : Diamètre moyen de 2 répétitions de la croissance mycélienne estimé du champignon testé sur milieu témoin (mm).

T : Diamètre moyen de 2 répétitions de la croissance mycélienne de boîte, traitées avec une concentration précise de produit pur (mm).

3.2.5. Conservation des souches microbiennes

La méthode de conservation des souches la plus communément utilisée car la plus simple, consiste à repiquer les souches en tube sur gélose inclinée (GN et PDA), les cultures sont maintenues pendant 24 heures à 37°C pour les bactéries et 7 jours à 28°C pour les moisissures, puis elles sont stockées à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations (**Botton et al., 1990**).

3.3. Activité anti-oxydante

La mise en évidence de l'activité anti-oxydante *in vitro* des extraits aqueux et méthanolique des fleurs et fruits de la plante testée a été réalisée par deux méthodes: le piégeage du radical libre DPPH et la réduction du fer.

3.3.1. Pouvoir anti radicalaire par la méthode du DPPH

- **Principe**

Le DPPH est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (**Sanchez-Moreno, 2002**).

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation:



(AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet)

3. Matériel et méthodes

pour le transformer en diphényle picryl hydrazine (jaune) (**Brand-William et al., 1995**).

- **Mode opératoire**

La solution de DPPH (2.5 mg dans 100 ml de méthanol 99,7%) a été préparée à l'avance (au moins 1-2 heures) car la solubilisation est difficile, et elle ne se conserve pas plus de 4-5 jours à -5°C et à l'obscurité (**Popovici et al., 2009**).

Nos extraits végétaux et le standard BHT ont été dissous dans une solution du méthanol et dilués en plusieurs concentrations de : (0.02, 0.04, 0.06, 0.08 et 0.1mg/mL).

Un volume de 500µl du standard et des extraits (à différentes concentrations) a été ajouté à 1ml de la solution de DPPH. Le mélange réactionnel a été agité vigoureusement et incubé 30 min à l'obscurité.

Les absorbances ont été mesurées à 517nm contre le blanc (solution DPPH/méthanol).

La capacité de l'antioxydant à piéger le radical libre est estimée en pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol. Le pourcentage d'activité antioxydante (%) a été déterminé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ activité antioxydante} = (A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}) \times 100 / A_{\text{blanc}} \text{ (Harififar et al., 2007).}$$

A_{blanc} : Absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol)

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance du composé d'essai

Le paramètre IC_{50} (concentration équivalente à 50% de DPPH perdu) est défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH (couleur), elle a été calculée par régression linéaire à partir des graphes des taux d'inhibition.

3.3.2. Test de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing- antioxidant power)

- **Principe**

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par (**Oyaiz, 1986 et Bougandoura, 2013**). La méthode de la réduction du fer est basée sur la réduction de fer ferrique en sel de fer par les antioxydants qui donnent la couleur verte dont l'intensité est proportionnelle au potentiel réducteur (**Ou et al., 2001**).

3. Matériel et méthodes

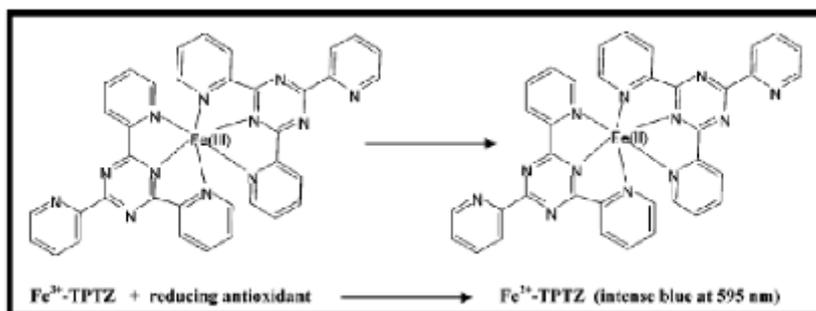


Fig.7 : Mécanisme réactionnel du test FRAP (Ferric reducing-antioxidant power)
(Prior *et al.*, 2005).

- **Mode opératoire**

On a réalisé une gamme de dilutions de (0,1, 0,2, 0,3, 0,4 et 0,5 mg/mL) pour tous les extraits et pour le standard (acide ascorbique).

Les différents extraits dilués dans du méthanol (50µl) ont été mélangés avec 1,25ml de la solution tampon phosphate (0,2M, pH 6,6) et 1,25ml de ferricyanure de potassium ((K₃Fe (CN)₆) à 1%). L'ensemble a été agité et incubé à 50° C pendant 20 min.

Ensuite, 1,25ml d'acide trichloroacétique (TCA) (10%) a été additionné au mélange pour stopper la réaction, le tout centrifugé pendant 10 min à 3000 rpm. L'eau distillée (1,25ml) et le chlorure ferrique (FeCl₃) (250µl à 0,1%) ont été ajoutés à 1,25ml du surnageant. L'absorbance a été mesurée à 700 nm contre un blanc. L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle positif et dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons.

Pour toute l'expérimentation, chaque test est réalisé en triplicata et les résultats ont été calculés par la moyenne des trois essais.

Le blanc est semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (spectrophotomètre UV-VIS) (Singleton et Rossi, 1965).

3.4. Etude phytochimique

3.4.1. Dosage des polyphénols (Folin-Ciocalteu)

- **Principe**

Les métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules végétales, dont leur nature chimique et teneurs sont extrêmement variables d'une espèce à une autre. Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des phénols totaux. L'analyse par le réactif de **Folin-Ciocalteu (1927)** est la plus utilisée.

3. Matériel et méthodes

Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀). Lors de l'oxydation, il est réduit en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène (**Ribéreau-Gayon, 1968**). La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait analysé.

- **Mode opératoire**

Les polyphénols sont déterminés par spectrophotométrie, suivant le protocole appliqué par **Folin-Ciocalteu (1927)**. Pour le standard en générale l'acide gallique, est dilué en plusieurs concentrations de 0.01 ,0.02 ,0.03 ,0.04..... jusqu'à 0.1mg /mL.

200µl de l'extrait est mélangé avec 1 ml du réactif de **Folin-Ciocalteu (2M)** dilué 10 fois. Après 5 min 0,8 ml de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à concentration de 75g/l est ajouté.

L'absorbance est mesurée à 765 nm, après incubation pendant 1 heure à température ambiante dans l'obscurité. La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique, en suivant les mêmes étapes du dosage. Toutes les mesures sont répétées 3 fois.

Le blanc de la réaction est semblablement préparé en remplaçant les 200 µL de l'extrait et du standard par le méthanol (**Boizotet Charpentier, 2006**).

3.4.2. Dosage des flavonoïdes

- **Principe**

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxyles moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle.

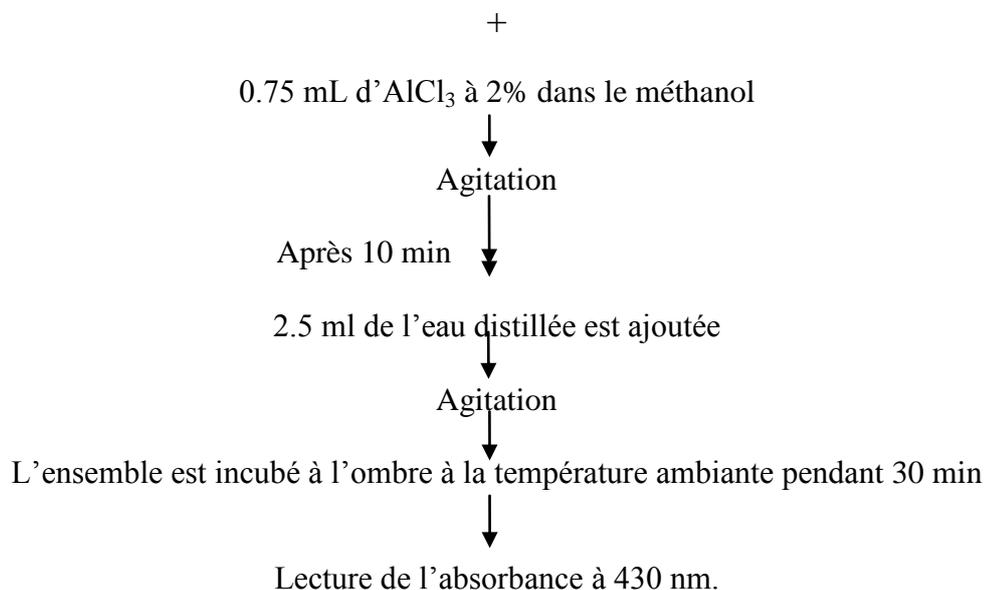
La méthode du trichlorure d'aluminium AlCl₃ (**Kosalec et al., 2004**) légèrement modifiée a été adoptée pour quantifier les flavonoïdes dans les différents extraits de la plante.

- **Mode opératoire**

Pour le standard (quercétine), il est dilué en plusieurs concentrations de : (1.25, 2.5, 5, 10, 20 et 40µg/mL).

3. Matériel et méthodes

0.75 mL de la solution d'extrait et de standard (préparés dans le méthanol)



La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard ; la quercitrine. Le banc est semblablement préparé, mais en remplaçant les 0.75mL d'AlCl₃ par le méthanol.

La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de poids sec de la plante (mg EQ/g PS) (**Kosalec et al., 2004**).

Résultats

4. Résultats

4. Résultats

4.1. Détermination de rendement d'extraction

Les rendements des extraits aqueux et méthanolique des fleurs et des fruits de *Calycotome spinosa* ont été déterminés par la formule suivante:

$$R\% = \frac{\text{Masse de résidu d'extrait}}{\text{Masse de la poudre végétale}} \times 100$$

Pour chaque échantillon, nous avons calculé le rendement de l'extraction, les résultats obtenus sont présentes dans la figure suivante:

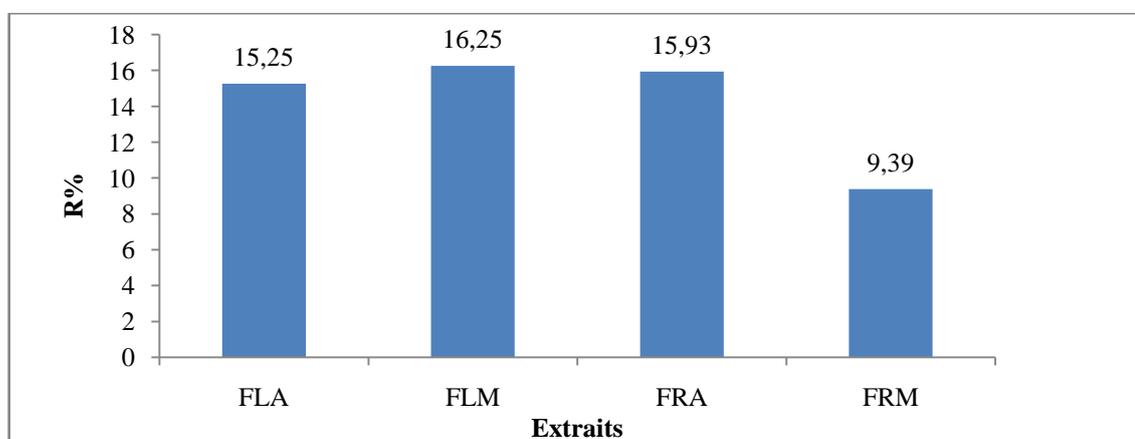


Fig.8 : Histogramme des rendements de l'extraction

A la lumière de ces résultats illustrés dans cette figure, on remarque que l'extrait FLM possède le meilleur rendement de **16.25 %**, suivie de l'extrait FRA avec un rendement de **15.93 %**, puis l'extrait FLA qui représente un rendement de **15.25 %**. Néanmoins, l'extrait FRM a un mineur rendement de **9.35 %** par rapport aux autres extraits (**Fig.08**).

Les extraits obtenus ont des couleurs différentes.

4.2. Activité antimicrobienne

4.2.1. Test antibactérien

L'activité antibactérienne se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné d'extrait brut étudié. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre.

4. Résultats

Tab.06: Zones d'inhibition de l'activité antimicrobienne d'extraits aqueux et méthanolique de la plante, d'antibiotique, d'antifongique et du DMSO

Extrait	[C](mg/ml)	Zones d'inhibition (mm)						
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>K.pneumonia</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S. abony</i>	<i>C.albicans</i>
FRA	25	/	/	/	/	/	/	/
	50	/	7.6±0.66	/	/	/	/	/
	100	8.5±0.07	8.6±0.75	/	/	/	11±0.77	/
	150	9±0.14	9.3±0.83	/	/	/	9.2±0.31	/
	200	10.2±0.24	10.6±0.92	/	/	/	11.5±0.07	/
FRM	25	10.5±0.07	9 ±0.69	/	/	/	12±0.14	/
	50	11.5±0.07	10.6±0.20	/	/	/	13.5±0.07	/
	100	13±0	11.6±0.20	/	/	8	14.2±0.03	/
	150	13.5±0.21	12.6±0.25	13.5±0.21	/	12	14.5±0.07	/
	200	15±0.14	16.3±0.15	15±0.24	/	12	16.5±0.07	13±0.14
FLA	25	/	/	/	/	/	/	/
	50	/	10±0.86	/	/	/	/	/
	100	7±0	13.6±1.18	/	25	/	/	/
	150	7.2±0	15.3±1.32	/	25	/	09	/
	200	7.5±0.07	17.1±0.13	/	28	/	11	/
FLM	25	7.5±0.07	8±0.51	/	/	/	11±0.14	/
	50	09±0	09±0.26	/	/	/	12.5±0.07	/
	100	10±0	10.3±0.25	/	19	/	12.7±0	/
	150	10.5±0.07	12±0.2	/	28	/	13±0.14	/
	200	11.7±0.03	14±0.17	/	28	/	14.5±0.21	/
DMSO	20µl	/	/	/	/	/	/	/
Chlor	1.5	33	40	28	30	32	35	
Fluc	1							50.2

“(Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD)”

« Le diamètre des disques 6mm »

D'après le **Tab.06** et les figures 09, 10, 11 et 12, on a constaté que les diamètres des zones d'inhibition sont augmentés en fonction des concentrations.

Les extraits aqueux et méthanolique des fruits et des fleurs de *C. spinosa* induisent une inhibition remarquable sur la croissance des bactéries à Gram+ : Ils ont montrés zones d'inhibition suivantes :10.2±0.24 (FRA), 15±0.14 (FRM), 07.5±0.07(FLA) et11.7±0.03

4. Résultats

mm(FLM) sur *B. subtilis* et les diamètres maximaux de 10.6 ± 0.92 (FRA), 16.3 ± 0.15 (FRM), 17.1 ± 0.13 (FLA) et 14 ± 0.17 mm (FLM) sur *S. aureus*.

Ces diamètres ont été enregistrés avec la concentration la plus élevée (200mg/ml) (**Tab. 06**)

De plus, tous les extraits de *C. spinosa* présentent un effet pertinent sur la bactérie *S. abony* (Gram-) où le diamètre de la zone d'inhibition le plus élevé est observé avec l'extrait FRM (16.5 ± 0.07 mm).

A partir de la concentration de 100mg/ml, les extraits aqueux et méthanolique des fleurs ont enregistré une action plus marquée sur *K. pneumoniae* avec un diamètre plus élevé (28 mm) que l'extrait aqueux et méthanolique des fruits.

On a noté que l'extrait FRM est le seul qui représente une activité sur les bactéries à Gram- : *E. coli* (15 ± 0.24 mm) et *P. aeruginosa* (12 mm) et même sur la levure *C. albicans* (13 ± 0.14 mm). Cet extrait (FRM) a également révélé un effet plus élevé sur les bactéries sensibles que l'extrait aqueux (FRA).

A partir des zones d'inhibition, l'effet inhibiteur des extraits des fruits et des fleurs de *C. spinosa* contre les souches bactériennes pathogènes peut permettre d'introduire la plante comme un candidat potentiel pour le développement de médicaments pour le traitement d'affections causées par ces bactéries pathogènes.

4. Résultats

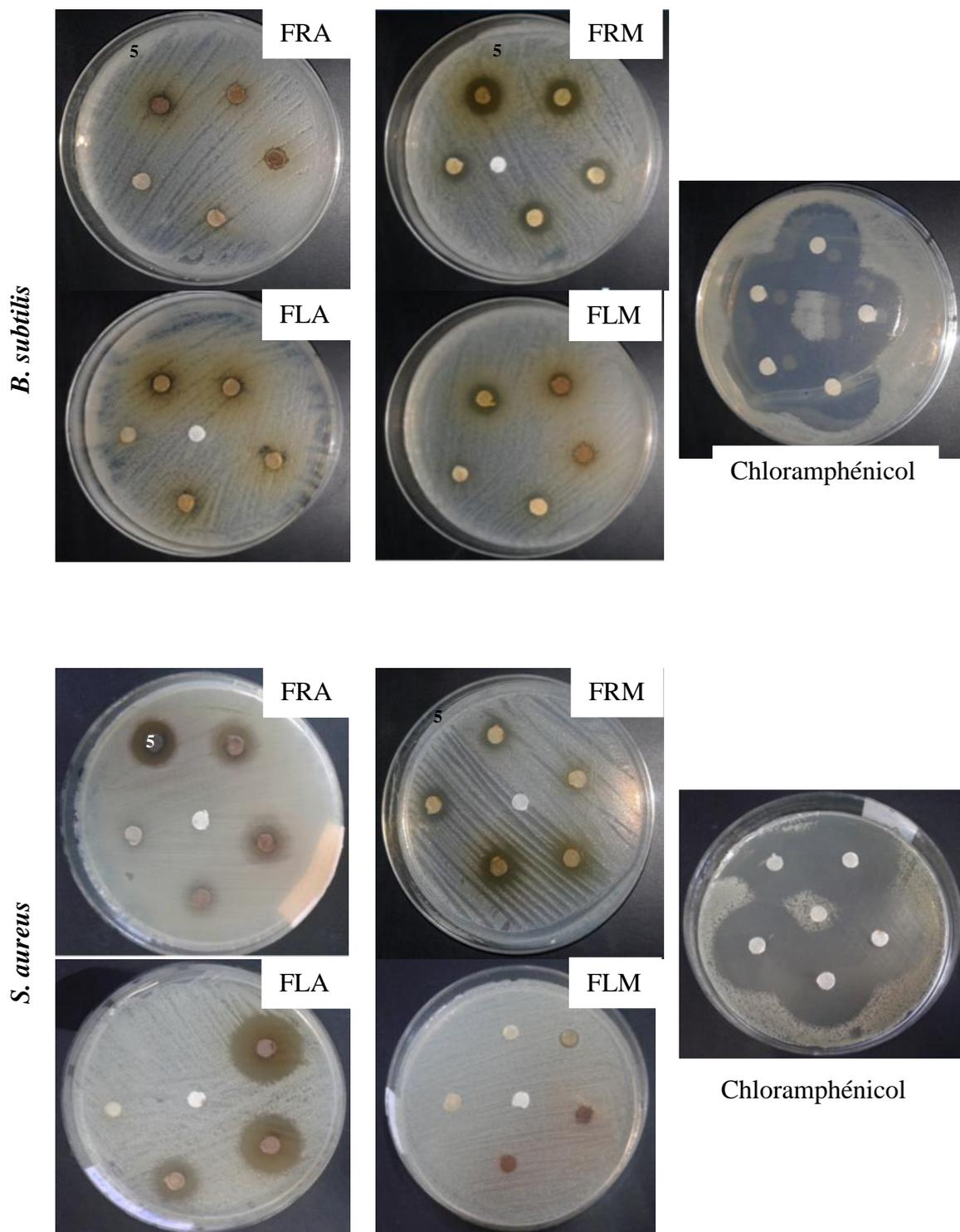


Fig.09: Zones d'inhibitions d'extraits aqueux et méthanoliques de la plante, d'antibiotique et de DMSO sur les bactéries à Gram positif (*S. aureus* *B. subtilis*) ; 5 : 200mg/ml

4. Résultats

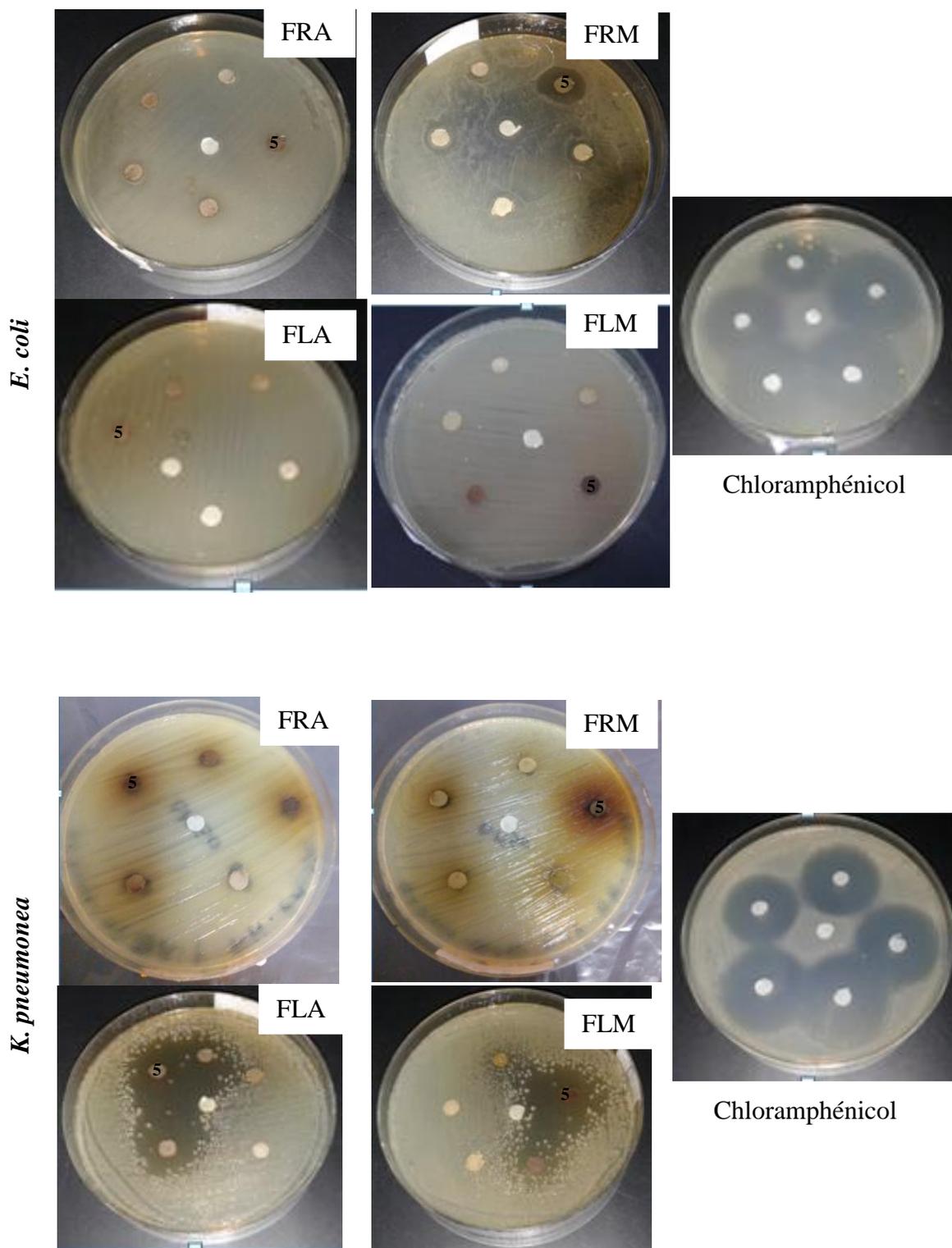


Fig.10: Zones d'inhibitions d'extraits aqueux et méthanoliques de la plante, d'antibiotique et de DMSO sur les bactéries à Gram négatif (*E. coli* et *K. pneumoniae*); 5 : 200mg/ml

4. Résultats

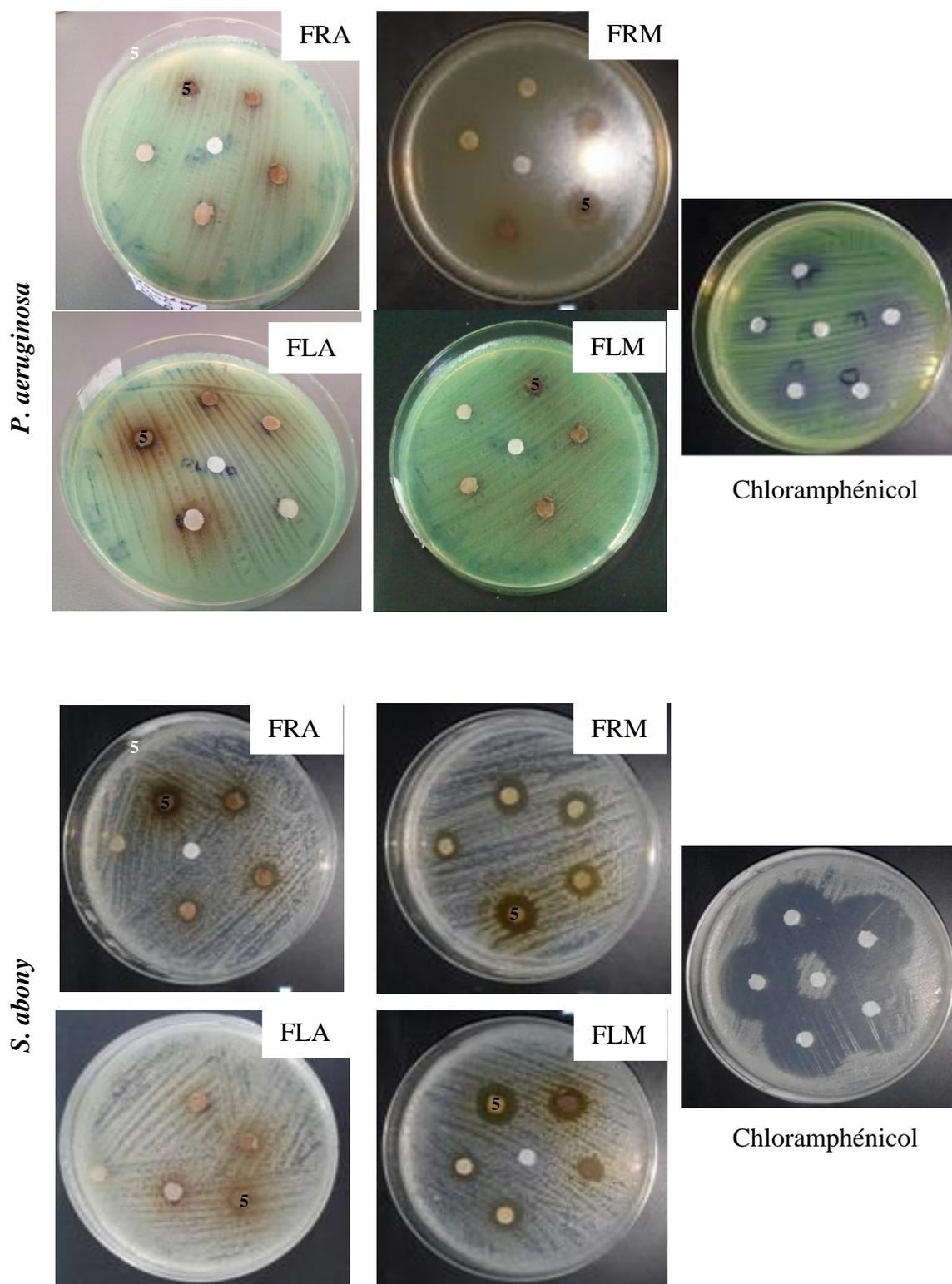


Fig.11: Zones d'inhibitions d'extraits aqueux et méthanoliques de la plante d'antibiotique et du DMSO sur les bactéries à Gram négatif (*P. aeruginosa* et *S. abony*) ; 5 : 200mg/ml

4. Résultats

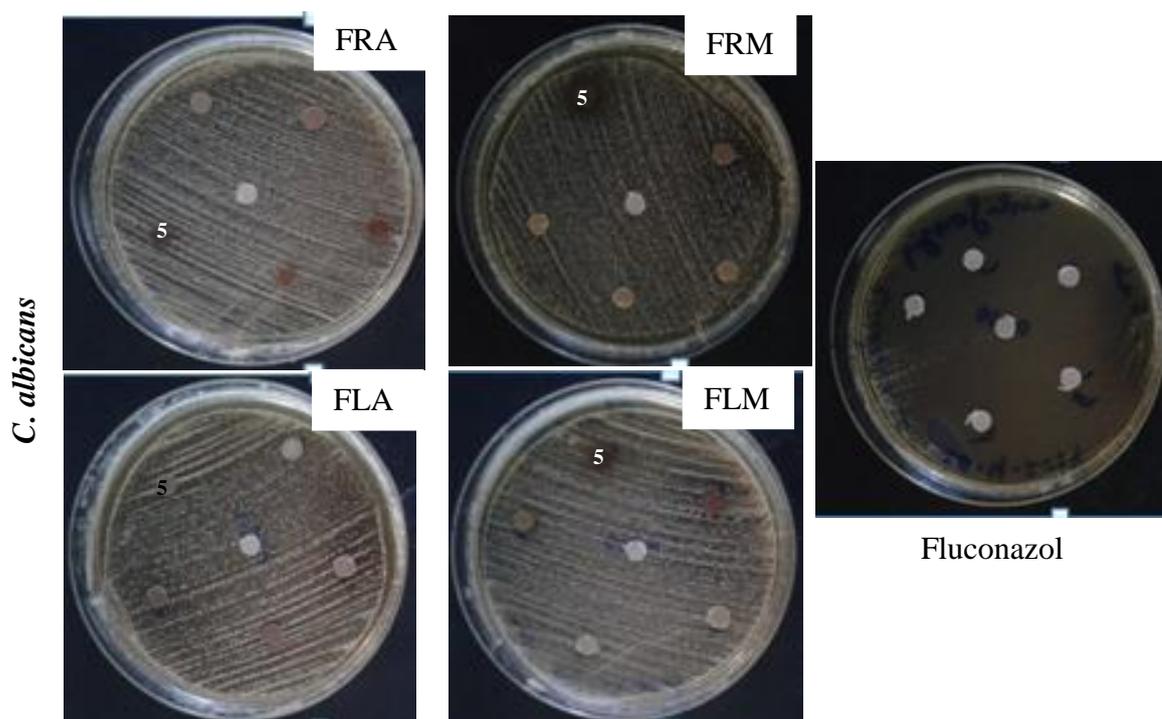


Fig.12: Zones d'inhibitions d'extraits aqueux et méthanolique de la plante, d'antifongique (1mg/ml) et de DMSO sur la levure (*C.albicans*); 5 : 200mg/ml

Tab.07 : Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Extraits	CMI (mg/ml)						
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumonia</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. abony</i>	<i>C.albicans</i>
FRA	100	50	/	/	/	100	/
FRM	25	25	150	/	100	25	200
FLA	100	50	/	100	/	150	/
FLM	25	25	/	100	/	25	/

D'après le tableau ci-dessus, les valeurs de la CMI des différents extraits sont variées de 25mg/ml à 200mg/ml.

La CMI la plus faible (25mg/ml) est enregistrée par les extraits méthanolique: FRM et FLM sur les bactéries *B. subtilis*, *S. aureus* et *S.abony*. Tandis que, la CMI la plus élevée (200mg/ml) est remarquée seulement par l'extrait FRM sur la levure *C. albicans*.

4. Résultats

A partir de ces résultats on peut faire la classification de l'efficacité de l'inhibition des extraits de la plante selon les valeurs de la CMI comme suit: inhibition forte (25 mg/ml) et inhibition faible: CMI attient à 200 mg/ml. D'après cette classification, nos extraits méthanolique exercent une inhibition modérée sur les souches *B. subtilis*, *S. aureus* et *S.abony* ; alors se sont les souches les plus sensibles ;et une faible activité (FRM) sur la souche *C. albicans*(souche moins sensible).

4.2.2. Activité antifongique

L'effet des extraits aqueux et méthanoliques des fleurs et des fruits de *C. spinosa* sur la croissance mycélienne comparativement au témoin est traduit par une diminution de la croissance mycélienne et une modification de l'aspect macroscopique.

Tab.08: Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des champignons en fonction des différents extraits de la plante

		PI %				
		FRA	FRM	FLA	FLM	Fluconazol (1g/L)
Moisissures	<i>Alternaria alternata</i>	48.75	22.14	38.75	26.25	100
	<i>Alternaria solani</i>	56.33	35.83	61.97	41.54	100
	<i>Penicillium sp. 1</i>	0	0	55.17	42.06	25
	<i>Penicillium sp. 2</i>	0%				
	<i>Aspergillus sp.</i>	0%				
	<i>Rhizopus sp.</i>	0%				

Les pourcentages d'inhibition des extraits aqueux et méthanolique des fruits et des fleurs de la plante *Calycotome spinosa* sur les six moisissures testés, après 7 jours d'incubation, varient de 0% à 61,97%.

On a constaté que tous les extraits ont présenté une activité antifongique à 20mg/ml sur les deux espèces d'*Alternaria* : *Alternaria solani* avec des pourcentages de

4. Résultats

56.33%(FRA), 35.83% (FRM),61.97% (FLA) et 41.54% (FLM); et *Alternaria alternata* avec des PI% moins importants que l'espèce précédente : 48.75%, 22.14%, 38.75% et 26.25% avec les extraits FRA, FRM, FLA et FLM respectivement (Tab.08).

Il est à signaler que l'extrait FLA est l'extrait le plus pertinent, il a présenté les pourcentages d'inhibition les plus élevés sur *Alternaria solani* et *Penicillium sp1* avec des PI % de 61.97% et 55.17% respectivement.

Aucune activité antifongique des deux extraits des fruits n'a été enregistrée sur *Penicillium sp.1*, en revanche, les deux extraits des fleurs,FLA et FLM, ont montré une activité inhibitrice remarquable sur cette souche fongique avec des PI% de 55.17% et 42.06% successivement.

L'analyse des résultats du tableau ci-dessus fait apparaître que les trois souches fongiques *Penicillium sp.2*, *Aspergillus* et *Rhizopus* ont une résistance contre les extraits aqueux et méthanolique des fruits et des fleurs de *C. spinosa* à 20mg/ml; ce que montre que ces extraits n'ont pas une activité antifongique sur ces souches.

4. Résultats

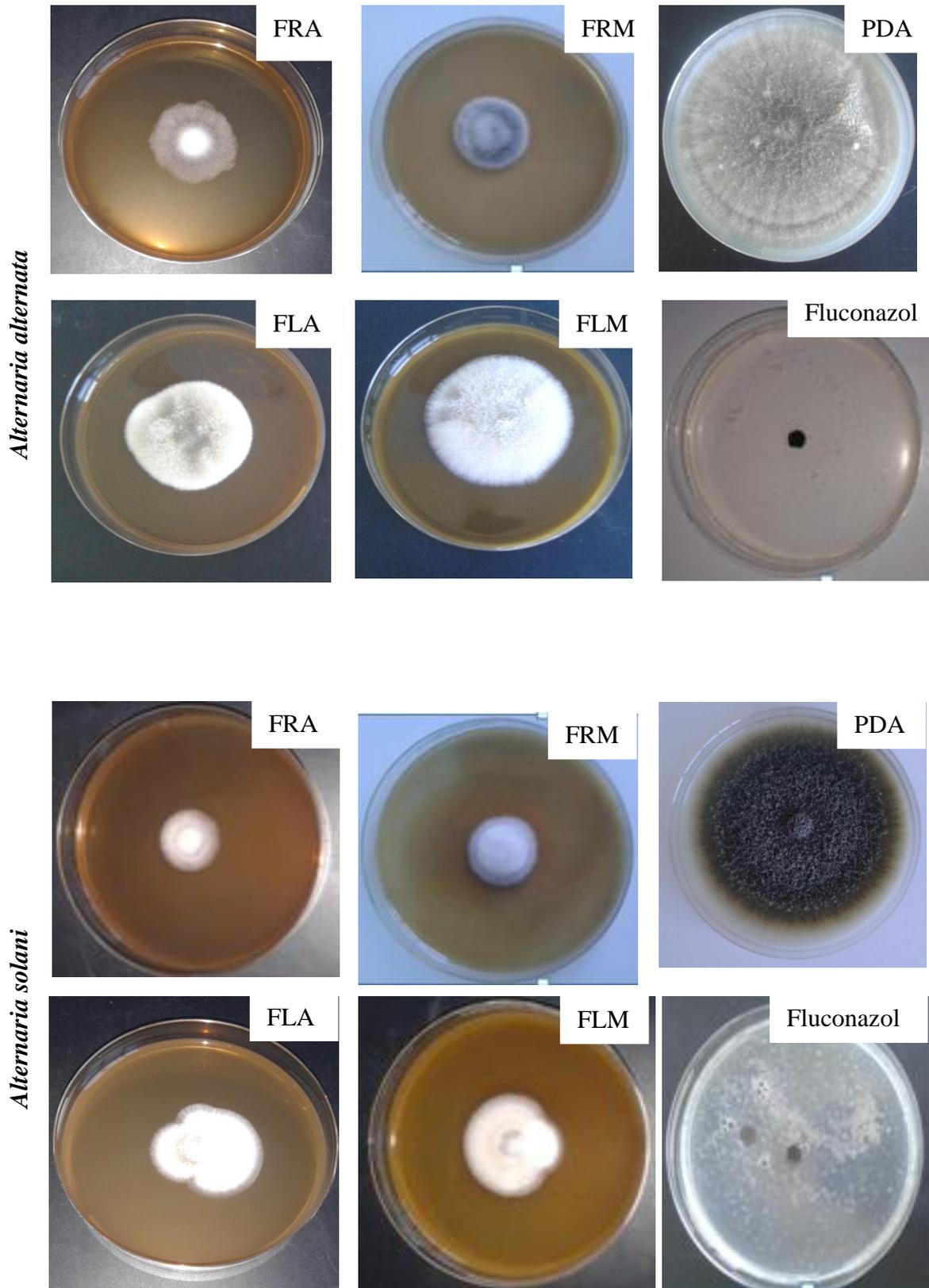


Fig.13: Activité antifongique d'extraits aqueux et methanolique de la plante (20mg/mL), et d'antifongique (1mg/ml) sur *A. alternata* et *A. solani*.

4. Résultats

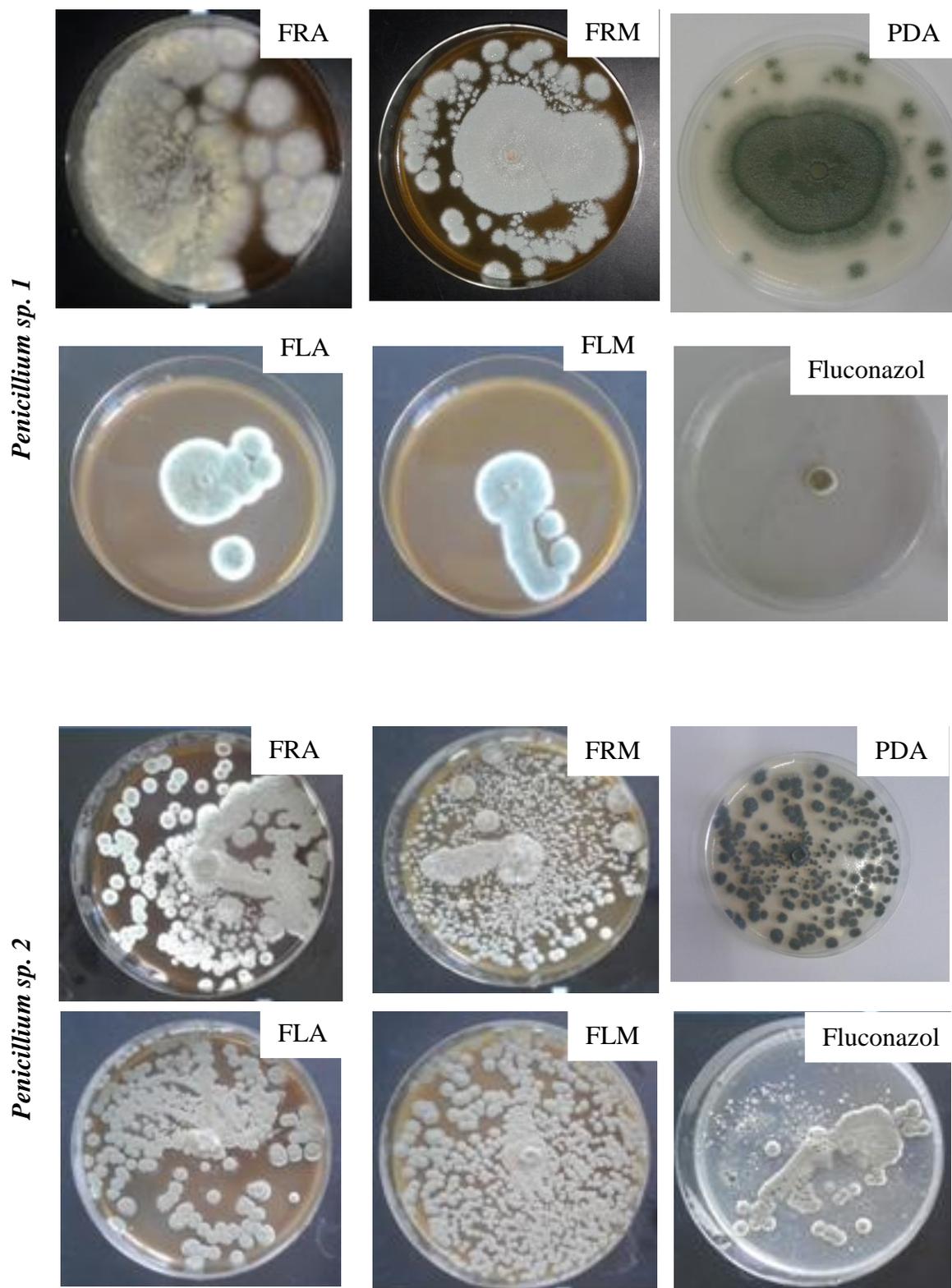


Fig.14: Activité antifongique d'extraits aqueux et methanolique de la plante (20mg/mL), et d'antifongique (1mg/ml) sur *Penicillium sp.1* et *Penicillium sp.2*

4. Résultats

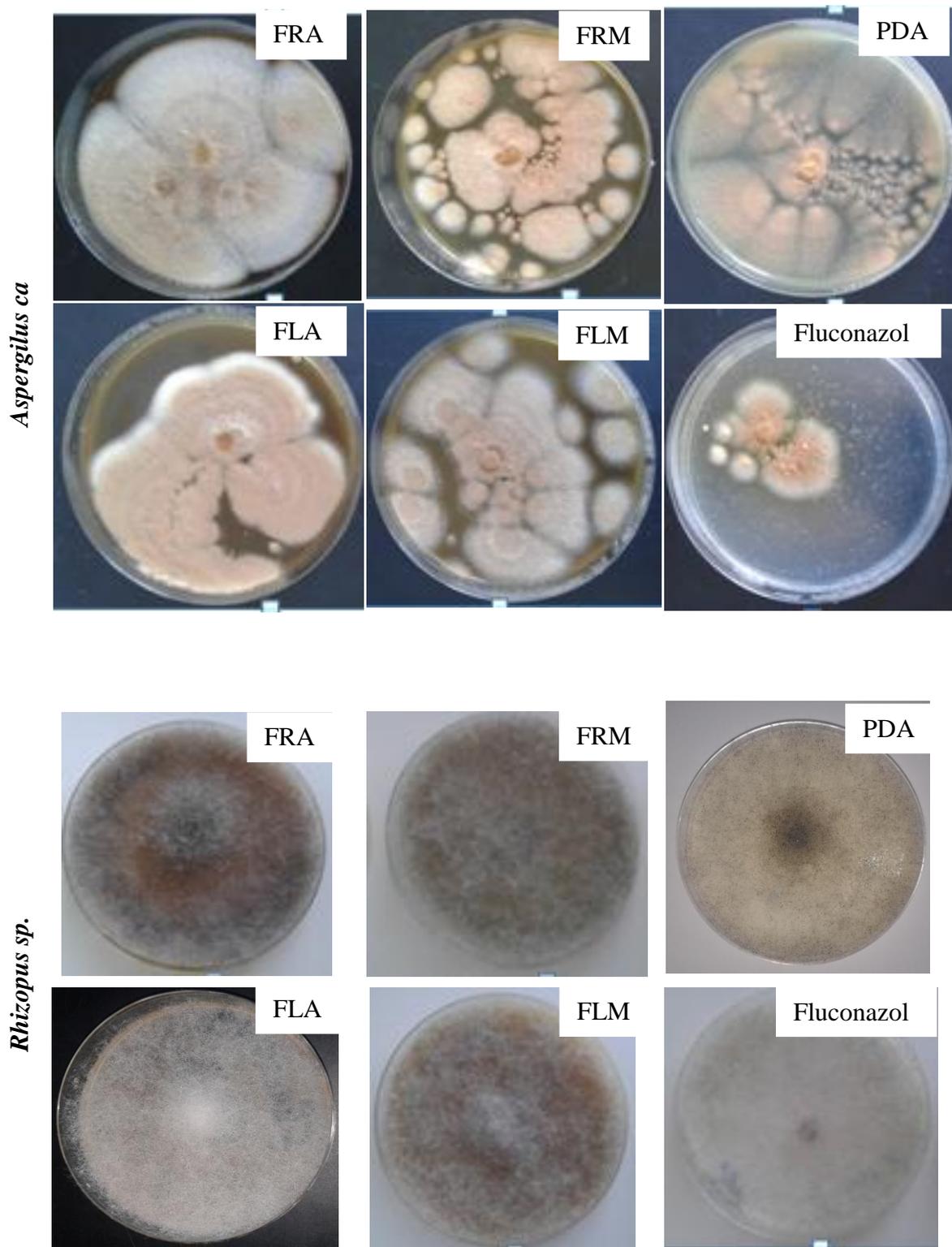


Fig.15: Activité antifongique d'extraits aqueux et methanolique de la plante (20mg/mL), et d'antifongique (1mg/ml) sur *Aspergillus sp.* et *Rhizopus sp.*

4. Résultats

4.3. Activité anti-oxydante

4.3.1. Effet scavenger du radical DPPH

L'activité anti-radicalaire a été estimée spectrophotométriquement en suivant la réduction du DPPH à 517nm (Maisuthiaskul, 2007).

Sur la base des données qui représente le pouvoir anti-radicalaire en fonction des différentes concentrations du standard BHT nous avons construit la courbe de régression ci-dessous :

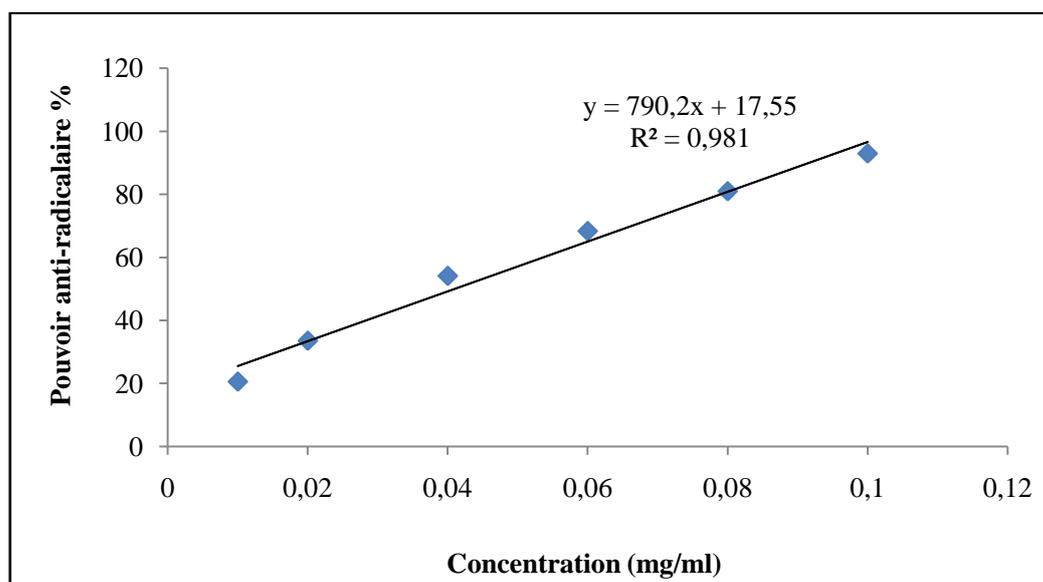


Fig.16 : Activité anti-radicalaire du BHT

(Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD)

L'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec le BHT est ($y = 790.2x + 17.55$) avec le coefficient de corrélation **R2 =0.951**. Chaque essai a été répété trois fois.

4. Résultats

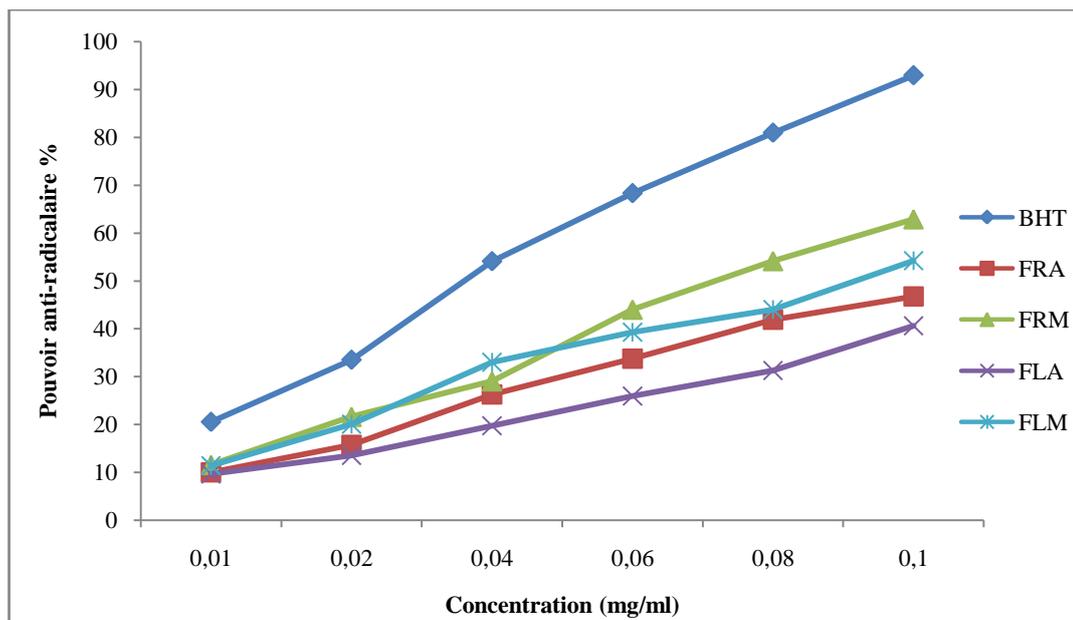


Fig.17: Activité antiradicalaire des extraits de la plante *C. spinosa* (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD)

La figure 17 illustre l'efficacité des extraits et du BHT à piéger le radical DPPH, traduite par le taux d'inhibition (I%) ou le pourcentage de l'activité anti-radicalaire en fonction des différentes concentrations dans le milieu réactionnel.

Le pourcentage de l'activité anti-oxydante augmente graduellement ou progressivement c'est une relation proportionnelle.

Les pourcentages de l'activité anti-radicalaire en suivant la réduction du DPPH du standard et des quatre extraits de la plante testée *C. spinosa*, se sont respectivement élevés à 92.63% (BHT), 62.88% (FRM), 54.19% (FLM), 46.75% (FRA) et (FLA) à la concentration **0.1** mg/ml (figure 17). Ainsi, on constate que l'extrait **FRM** possède une activité anti-radicalaire de **62.88%** supérieure aux autres extraits. Néanmoins, il est faible par rapport au standard qui s'est élevé à 92.63% à **0.1** mg/mL. Cependant, l'extrait **FLA** possède une activité réductrice de 40.63% plus faible par rapport aux autres extraits.

Les IC₅₀ de chacun des différents extraits ont été déterminées.

A partir des courbes des taux d'inhibition (Annexe 2), nous avons pu déduire graphiquement les valeurs d'IC₅₀ du BHT et des quatre extraits; représentées dans la figure 18.

4. Résultats

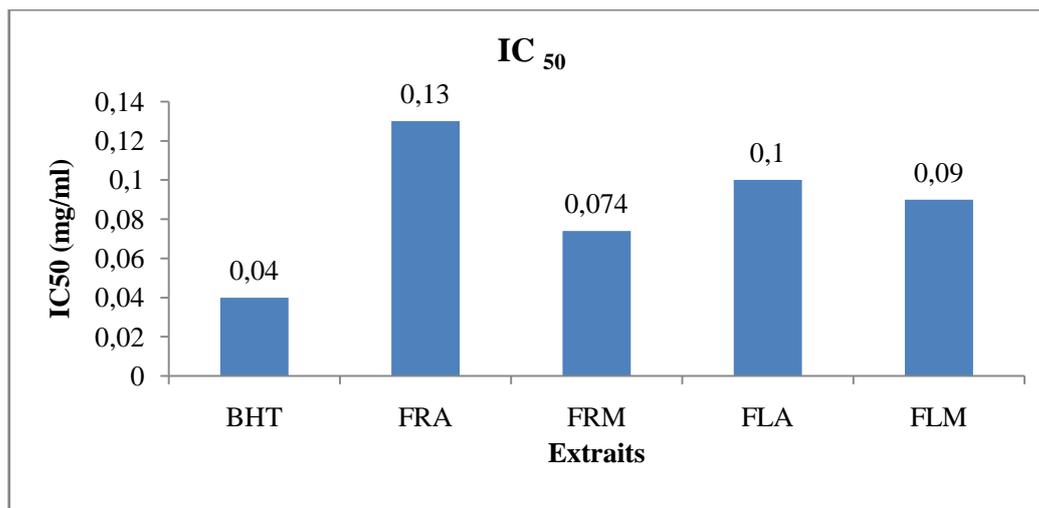


Fig.18 : Histogramme représentant les IC₅₀ des différents extraits

La valeur de l'IC₅₀ est inversement proportionnelle à la capacité anti-oxydante d'un composé, car elle reflète la quantité d'antioxydant requise pour neutraliser 50% de la concentration initiale du radical libre dans le milieu.

Le potentiel anti-radicalaire global des extraits testés a été inférieur à celui du BHT dont l'IC₅₀ est de 0.04. Parmi ces quatre extraits, l'extrait FRM arrive en tête des résultats avec un IC₅₀ égal à 0.074 mg/mL, suivie d'extrait FLM avec une valeur de 0.09 mg/ml, ensuite l'extrait FLA arrive avec une valeur de 0.1 mg/mL et finalement l'extrait FRA qui semble être la moins performante avec un IC₅₀ de 0.13± mg/ml en comparaison avec l'antioxydant standard.

Plus la valeur d'IC₅₀ est faible, plus l'activité anti-radicalaire d'un composé est appréciable.

4. Résultats

4.3.2. Pouvoir réducteur (FRAP)

Le pouvoir réducteur a été déterminé selon la méthode d'Oyaizu (1986). Sur la base des données qui représente l'absorbance en fonction des différentes concentrations du standard 'acide ascorbique' ; nous avons construit la courbe de régression ci dessous :

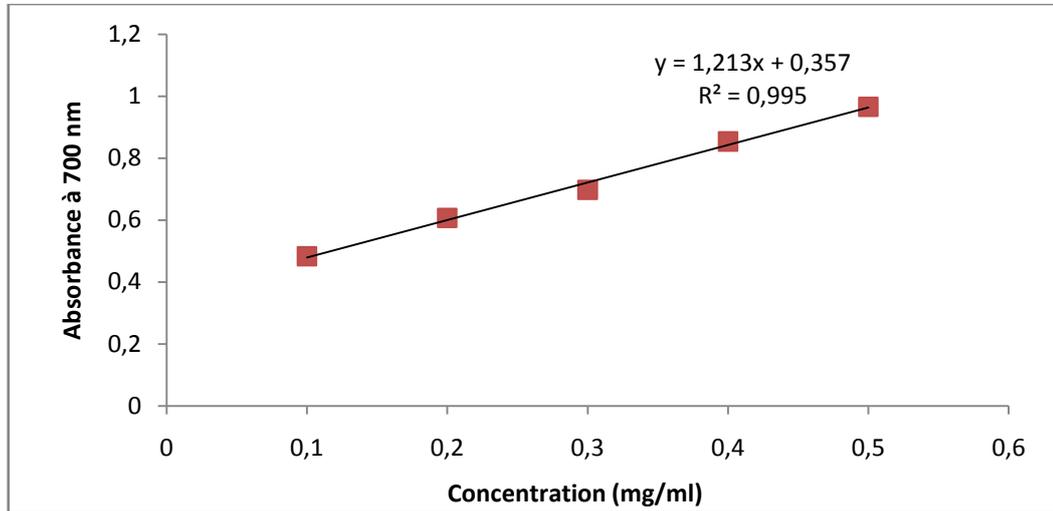


Fig.19: Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique

L'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide ascorbique est ($y = 1.213x + 0.357$) avec le coefficient de corrélation $R^2 = 0.995$. Chaque essai a été répété trois fois ainsi que, chaque valeur reportée est une moyenne.

Les différents extraits sont traités de la même façon que ceux de la solution standard de l'acide ascorbique (V.C). Les résultats de l'activité réductrice des quatre extraits et de l'acide ascorbique sont représentés dans la figure ci-dessous :

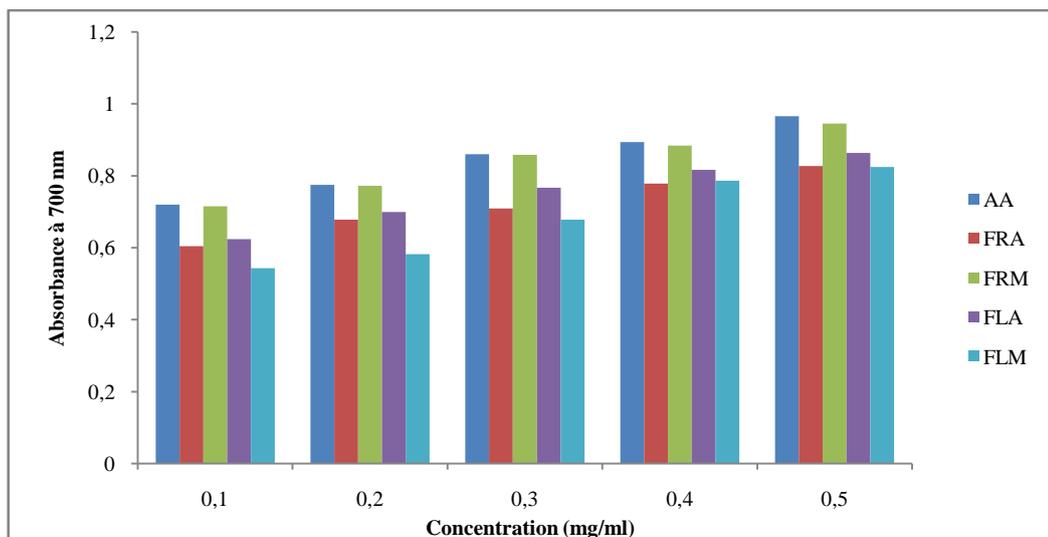


Fig.20 : Pouvoir réducteur des quatre extraits de la plante testée et de l'acide ascorbique.

4. Résultats

Les absorbances du pouvoir réducteur des quatre extraits FRA, FRM, FLA et FLM de la plante testée *C. spinosa* se sont respectivement élevées : 0,827, 0,945, 0,864 et 0,825nm à la concentration 0,5 mg/ml respectivement (figure20). Ainsi, on constate que l'extrait FRM possède une activité réductrice supérieure aux autres extraits, néanmoins, faible par rapport à l'acide ascorbique qui s'est élevé à 0,966 à 0,5mg/ml. L'extrait **FLM** possède une activité réductrice de 0,825nm plus faible par rapport aux autres extraits.

Ces résultats pourront être expliqués par le fait que l'extrait FRM présentant un pouvoir réducteur important renferme des molécules ayant un potentiel réducteur donneur d'électron plus fort, tandis que l'extrait FLM qui est montré un pouvoir réducteur moins fort peut renfermer des substances à potentiel réducteur donneur d'électron aussi moins fort.

4.4. Etude phytochimique

4.4.1. Dosage des polyphénols

La teneur en polyphénols a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu.

La quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=ax+b$) réalisée par une solution étalon (l'acide gallique) à différentes concentrations.

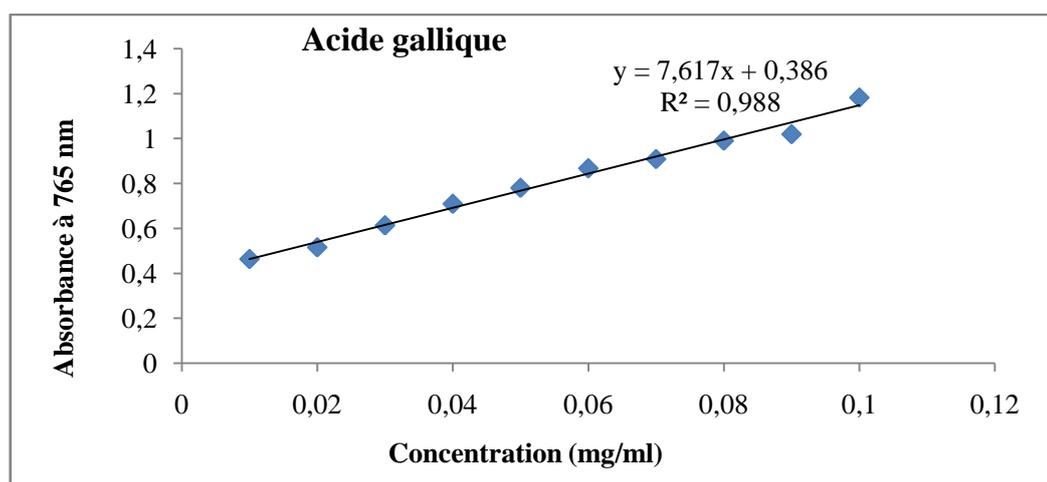


Fig.21 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes équivalent en acide gallique par gramme de la matière sèche (mg EAG/g d'extrait).

4. Résultats

La mesure de la densité optique a été effectuée à la longueur d'onde de 760 nm. La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 760 nm. Elle est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits. Chaque essai a été répété trois fois ainsi que, chaque valeur reportée est une moyenne.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tab.09: Quantité des phénols totaux dans les extraits

Polyphénols totaux (mg GAEs / g extrait)			
Fleurs		Fruits	
Aqueux	Méthanol	Aqueux	Méthanol
2,36	1,31	16,5	13,6

La quantité de composés phénoliques totaux aurait varié considérablement à travers les diverses parties de plante ; Fleurs et fruits.

On remarque d'après les résultats du tableau ci-dessus et la figure ...que la quantité des composés phénoliques varie entre 1,31 et 16,5 mg GAEs / g extrait. Le taux des composés phénoliques le plus élevé a été détecté dans l'extrait FRA (16,5mg/g), suivi par l'extrait **FRM** avec une valeur de **13,6** mg/g, puis l'extrait **FLA** avec **2,36** mg/g et finalement l'extrait **FLM** avec **1,31** mg/g.

4.4.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode d'AlCl₃ en utilisant comme standard, la quercétine. Les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en mg EQ/g d'extrait.

Sur la base des données qui représente l'absorbance en fonction des différentes concentrations de la quercétine, nous avons construit la courbe d'étalonnage ci-dessous :

4. Résultats

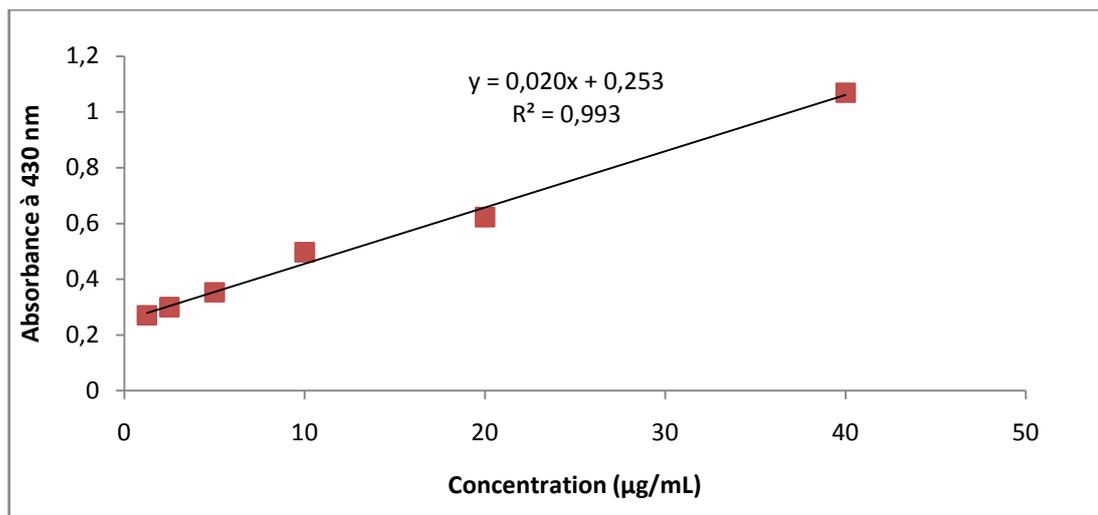


Fig.22: Courbe d'étalonnage de la Quercitine

La teneur en flavonoïdes de chaque extrait a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes équivalent en *Quercitine* par gramme de la matière sèche, la mesure de la densité optique a été effectuée à la longueur d'onde de 430 nm. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tab.10: Quantification des flavonoïdes dans les quatre extraits

Extrait	quantité des flavonoïdes (µg EQ/mg extrait)
FRM	0,7
FRA	2,3
FLM	2,25
FLA	4,1

La quantité des flavonoïdes totaux aurait varié considérablement à travers les diverses parties de plante ; Fleurs et fruits.

On remarque d'après les résultats du tableau ci-dessus que la quantité de flavonoïdes varie entre 0.7 et 4.1 mg/ g de la matière sèche. Le taux de flavonoïdes le plus élevé a été détecté dans l'extrait FLA (4.1mg/g), suivi par l'extrait **FRA** avec une valeur de **2,3** µg/mg, puis l'extrait **FLM** avec **2,25** µg/g et finalement l'extrait **FRM** avec **0,7**µg/mg.

Discussion

5. Discussion

Cette étude avait pour objectif d'évaluer, *in vitro*, les activités antimicrobiennes des extraits aqueux et méthanolique des fruits et des fleurs de *C. spinosa*, sur la croissance des bactéries, d'une levure et des moisissures.

Les rendements des extraits aqueux et méthanolique des fleurs et des fruits de *Calycotome spinosa* ont été estimée : FLM (16.25 %), FRA(15.93 %),FLA (15.25 %)et FRM (9.35 %).

La récolte de la plante a été effectuée pendant le stade de la floraison, ce qui peut aussi expliquer le rendement obtenu.

En fait, le rendement est sous la dépendance de l'origine géographique, le stade phénologique et les facteurs environnementaux tels que la température et la qualité du sol (Bruneton, 1993; Bennadja *et al.*, 2013).

A partir de ces comparaisons, on constate que le rendement de l'extrait fleur méthanolique de 16.25 % est supérieur par rapport à l'extrait fleur aqueux de 15.25 %.Ce résultat est plus proche de celle de (Harrar,2012) qui a travaillé sur la plante *Rhamnus alaternus* L ,il a trouvé des rendements de (10 et 11 %) pour les extraits méthanoliques , qui sont supérieurs par rapport aux extraits aqueux de (6 et 8 %), La différence de rendement entre les extraits est due aux techniques d'extraction utilisées, qui sont totalement différentes et à la composition chimique qui diffère d'un extrait à l'autre (Harrar,2012). Dans une étude réalisée par Ben ammar *et al.* (2008) sur *Rhamnus alaternus* L originaire de Tunisie, des résultats similaires ont été trouvés. En effet la macération des feuilles dans le méthanol suivi par le butanol saturée en eau a donné un rendement de 9 %.

Cependant,le rendement de l'extrait (FRA)15.93 % est supérieur par rapport à l'extrait (FLA)15.25 % cette différence est due cause de la composition chimique qui diffère d'une partie à autre.

L'analyse des résultats obtenus indique que les deux souches bactériennes à Gram+ testées (*S. aureus* et *B. subtilis*) sont toutes sensibles aux différents extraits par contre aux bactéries à Gram- . Par ailleurs, il est comparable à ceux trouvés par Yala *et al* (2016) qui montre que, l'extrait aqueux total (EAT) d'*Eryngium. foetidum* a une activité antibactérienne aussi bien sur les bactéries Gram positives (Gram+) que négatives (Gram-),

5. Discussion

sur différentes familles bactériennes *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonaceae*, *Staphylococaceae* et *Streptococaceae*, et présente à cet effet un spectre d'action large. Cette activité antibactérienne large est conférée par la présence des biomolécules comme les alcaloïdes, les tanins, les flavonoïdes dont les propriétés antibactériennes ont été démontrées (Moroh et al., 2008; Tene et al., 2009).

Ces résultats sont aussi en accord avec ceux des travaux de Soundararajan et al (2012) qui montrent que les extraits d'*Elaeis guineensis* présentaient une meilleure activité sur les bactéries Gram+ que sur les Gram-.

Selon plusieurs études (Tian et al., 2009; Soundararajan et al., 2012), cette différence d'activité pourrait s'expliquer par la différence de la composition pariétale des deux types de bactéries. Effectivement, les bactéries Gram+ composées d'une paroi exclusivement de peptidoglycane épais semblent être plus favorables à la pénétration des phytomolécules qui atteindraient facilement leurs cibles intracellulaires. A l'opposé, les bactéries Gram- avec leur membrane externe composée des phospholipides qui interfèrerait avec les molécules, rend leur passage à travers la paroi difficile surtout les composé hydrophobes.

Aussi, la variation de l'activité de ces extraits trouverait une justification sur la partie de la plante utilisée (fruits ou fleurs). Manifestement, il a été prouvé que la composition et l'activité de l'extrait varie selon que l'on travaille avec les feuilles, la tige ou les racines de la plante. Une étude de Koroma et Ita (2009) a montré que lors que l'extrait des feuilles d'*Alchornea hirtella*, l'extrait de l'écorce des racines de *Craterispermum laurinum* avaient une action modérée sur *S. aureus*, l'extrait de l'écorce de *Craterispermum laurinum* inhibe fortement la croissance de *S. aureus* (Koroma et Ita, 2009).

Les resultat obtenus dans cette étude ont montré que l'extrait méthanolique des fruits de la plante est le seul extrait qui a une activité remarquable sur les bactéries *E. coli* (15 ± 0.24) *P. aeruginosa* 12 mm, et la levure *C. albicans* (13 ± 0.14) avec la concentration maximale de 200mg/ml. Ce résultat est semblable avec les résultats de Naili et al (2010), qui a montré que l'extrait méthanolique des feuilles d'*A. campestris* possède un effet inhibiteur sur *S. aureus*, *E.coli* et *P. aeruginosa*. Alors que Djeddi (2015) a révélé que l'extrait brut de méthanol de *C. villosa* n'a montré aucune activité antibactérienne contre toutes les souches de bactéries testées *Acinetobacter sp*, *E. coli*, *K. pneumonia*, *P. mirabilis*, *P.aeruginosa*, *S. marcescens* et *S. aureus*. En revanche, l'extrait brut de dichlorométhane

5. Discussion

de la même plante a montré une forte activité antimicrobienne contre *K. pneumoniae* ($20,5 \pm 2,7$ Mm) ainsi que *Acinetobacter sp.* ($15,7 \pm 1,3$ mm). L'extrait brut de dichlorométhane a montré un effet antibactérien modéré contre *E. coli* ($12,9 \pm 0,9$ mm), *P. aeruginosa* ($13,1 \pm 2,3$ mm) et *S. marcescens* ($10,2 \pm 0,3$ mm) et aucun effet contre *P. mirabilis*.

De plus, l'effectivité de l'activité d'un extrait est fonctionné du pouvoir polarisant du solvant utilisé. Assurément, plusieurs travaux ont souligné que les extraits acétoniques présentaient des meilleurs activités que les extraits éthanoliques et aqueux (**Bagre et al., 2006; Traoré et al., 2012; Akinsulire et al., 2007**).

Ces résultats confirment ceux de plusieurs autres chercheurs qui ont déjà démontré les activités antimicrobiennes de *Calycotome vilosa* sur divers germes dont *Staphylococcus aureus*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* et *S. typhimurium* (**Chikhi, 2016**).

Chikhi (2016) montre que l'huile essentielle de *Calycotome vilosa* présentait la meilleure activité antibactérienne contre les bactéries *S. aureus*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* et *S. typhimurium*. Cependant, l'extrait d'éthanol a présenté une gamme différente. L'huile essentielle et l'extrait d'éthanol présentent une activité antibactérienne contre deux bactéries Gram positives et une activité dans une moindre mesure contre deux espèces de Gram négative.

Mubashir et al (2009) signalent que l'extrait aqueux des feuilles de l'espèce *Marrubium vulgare* exerce une forte activité inhibitrice sur les souches de *Staphylococcus aureus* MTCC 740, *Staphylococcus epidermidis* MTCC 435 et une activité de degré moindre sur *Proteus vulgaris* MTCC 426 et *E. coli* MTCC 443.

Les pourcentages d'inhibitions ont été calculés pour déterminer l'efficacité des extraits de *C. spinosa* pour l'inhibition des six moisissures testés.

Les quatre extraits testés sur les moisissures *Alternaria alternata* et *Alternaria solani* présentent des effets inhibiteurs significativement différents, l'extrait FLA a donné le pourcentage d'inhibition le plus élevé sur *Alternaria alternata* avec une valeur de 61.97%, alors que l'extrait FRA a représenté le pourcentage d'inhibition le plus élevé sur *Alternaria solani* avec une valeur de 48.75%.

Aucune activité antifongique des quatre extraits n'a été détectée sur *Penicillium sp2*, *Aspergillus sp.* et *Rhizopus sp.*

5. Discussion

Les travaux de **Ebi et Kamalu (2001)** ont montré l'activité antifongique des extraits dichlorométhane, méthanolique, éthanolique de *Mitracarpus scaber* (Rubiaceae), sur *Aspergillus flavus* et *C. albicans*.

Ils ont indiqué la présence d'alcaloïdes et de saponines dans ces extraits et ont attribué l'activité des extraits aux saponines qui interagiraient avec les stérols, les protéines et les phospholipides des membranes cellulaires des champignons.

Tatsadjieu et al(2003) ont montré par la suite, l'action des huiles essentielles extraites de *Xylopiiaaethiopica*, *Monodora myristica*, *Zanthoxylumxanthoxyloides* et *Zanthoxylum leprieurii* sur *Aspergillus flavus*.

Badr Satrani (2006) a trouvé que l'huile essentielle brute du Myrte (*Myrtus communis* L.) et les principales fractions B et C présentent une bonne activité antimicrobienne. Les fractions A et D ne présentent aucune activité contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Aspergillus niger*, même à la plus grande concentration testée. Les germes les plus sensibles sont *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* et *Penicillium digitatwn* qui sont inhibés à la concentration de 11500 VIV de l'huile essentielle de la principale fraction C.

L'activité anti radicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH-H est formée (**Bortolomeazzi et al., 2007**). L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration des différents extraits utilisés et du témoin BHT (antioxydant de référence) (0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 et 0.1 mg/ml).

L'activité anti-oxydante des extraits est exprimée en IC₅₀, ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats (**Abdulmajed et al., 2005; Ahmad et al., 2012; Ranga et al., 2009**), il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH(couleur). Ces IC₅₀ sont déterminées à partir des graphes (Annex 2) dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait brut et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage. Elle est de **0.13 mg/mL** pour l'extrait **FRA**, **0.1 mg/mL** pour l'extrait **FLA** et **0.09 mg/mL** pour l'extrait **FLM**, alors qu'avec l'extrait **FRM** la valeur est **0.074 mg/mL** assez proche de celle du BHT qui est de **0.04 mg/mL**.

5. Discussion

Tous les extraits ont un pouvoir anti-radicalaire envers le DPPH. Plus la valeur de l'IC₅₀ est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant.

Une étude menée par **Ben ammar et al(2008)** sur l'espèce de plante de la Tunisie *Rhamnus alaternus* L a montré des IC₅₀ de 7 et 19 µg/ml des écorces des racines et des feuilles respectivement, lorsque l'extraction a été menée par le méthanol suivie par une extraction dans le butanol saturé en eau. Ces valeurs nettement supérieures à celle trouvée avec nos extraits.

Ferreira et ses collages (2006) ont étudié l'activité antioxydante de trois extraits (huile essentielle, extrait éthanolique et décoction) de *Laurusnobilis*, cet espèce montre des valeurs élevées pour l'activité antioxydante en chacun des trois extraits et elle est plus haute pour les extraits polaires. Dans le laurier l'isoquercitrine, les glycosides flavonol et la vitamine E peuvent expliquer l'activité démontrée (**Demo et al., 1998 ; Kivçak et Mert, 2002 ; Simic et al., 2003**).

L'activité antioxydante des extraits méthanolique et aqueux de *Calycotomespinosa* a été évaluée aussi en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible (**Benzie et al.,1996**). Il est universel peut être appliqué aussi bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux (**Li et al.,2008**). Plus l'absorbance mesurée à 700 nm augmente plus le pouvoir réducteur du composé est élevé (**Ebrahimzadehet al.,2008**).

Le pouvoir réducteur des extraits de la plante *Calycotomespinosa* est dose dépendante (concentration dépendante). A la concentration de 0.5 mg/mL, le pouvoir réducteur de l'extrait **FRM** de *Calycotomespinosa* est largement supérieur (**DO=0.945**) par rapport aux autres extraits, mais nettement inférieur à celui de l'acide ascorbique (**DO=0,966**).

Notre résultat est similaire au résultat trouvé par (**Bougandoura et al., 2012**). Ils ont montré que le pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique de *Saturejacalaminthaest* largement supérieur (**DO=0,484**) par rapport à l'extrait aqueux A la concentration de 2,5mg/ml mais nettement inférieur à celui de l'acide ascorbique.

(**Mami,2014**) a constaté que les extraits phénoliques ont une forte activité de réduire le fer à faible concentration mais toujours inférieur à celle de l'acide ascorbique (antioxydant de référence). La forte activité antioxydante du **Sorgho** peut être due aux fortes teneurs en composés phénoliques (flavonoïdes) et à la présence d'autres constituants ou familles de

5. Discussion

composés en petites quantités ou à une synergie entre eux et à la position du OH sur le noyau phénolique. Selon **Godon(1991)**, le pourcentage d'inhibition, augmente avec la substitution des mono phénols avec le groupement hydroxyle en position ortho. La substitution du groupe hydroxyle est plus efficace qu'avec le groupement méthoxy.

Il est à signaler que l'extrait le plus puissant concernant les deux méthodes ; l'activité antiradicalaire DPPH et le pouvoir réducteur Frapce est le même : extrait **FRM**. De plus il est le meilleur extrait qui a montré la potentialité antimicrobienne la plus pertinente.

L'étude quantitative des extraits bruts de *Calycotome spinosa*, au moyen des dosages spectrophotométriques, avait pour objectif la détermination de la teneur des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux.

La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des plantes leur sont attribuées.

Les polyphénols sont estimés par plusieurs méthodes, comme la méthode de bleu de Prusse (**Graham, 1992**), mais la plus utilisée est celle de Folin-Ciocalteu.

Nos résultats du dosage des polyphénols totaux montrent que l'extrait **FRA** est le meilleur extrait dont il contient une grande quantité de polyphénols; cependant l'extrait **FLM** est le moindre extrait dont il contient une faible quantité de polyphénols.

Nos résultats sont significativement inférieurs aux valeurs de polyphénols trouvés dans les deux extraits méthanoliques et aqueux de la plante *Nigella sativa* L par **Talbi et al(2014)**. Ses résultats montrent que la teneur moyenne en phénols totaux de l'extrait aqueux est de $(163,33 \pm 10,26 \mu\text{g}/\text{mg})$ alors que celle de l'extrait méthanolique est de $(163,33 \pm 3,05 \mu\text{g}/\text{mg})$. Néanmoins, nos résultats sont significativement proches aux celles de **Boudiaf**, qui a étudié les effets anti-xanthine oxydoréductase et anti-radicalaires des extraits des graines de *Nigella sativa*. Il a trouvé $(23,81 \pm 2,67 \mu\text{g}/\text{mg})$ de polyphénols dans l'extrait aqueux de la nigelle. Et aussi nos résultats sont presque semblables aux celles trouvés par **Meziti (2013)** qui a étudié l'activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L in vitro et in vivo. Il a trouvé $(27,07 \pm 0,58 \mu\text{g}/\text{mg})$ de polyphénols totaux.

5. Discussion

La quantité de polyphénols qu'on a trouvé dans nos extraits est aussi faible pareillement à celle trouvée par **Mechernene (2014)** qui a montré que la quantité de polyphénols dans l'extrait aqueux de **laracine de Bryoniadioica** est nettement faible de **29,14 µg.eq acide gallique/mg**. Cependant la quantité de polyphénols qui a trouvé dans l'extrait **n-butanol 1** est riche en composé phynoliques avec un taux de **565,52 mg eq d'acide gallique par mg d'extrait**. Suivi par l'extrait **acétate d'éthyle 1** de **393,49 µg.eq acide gallique/mg d'extrait**, ensuite **275,73 µg.Eq acide gallique/mg d'extrait** pour l'extrait **n-butanol 2**, pour l'extrait Acétate d'éthyle 2 renferme **272,45µg.eq acide gallique/mg**,

Les résultats de la teneur en flavonoïdes des macéra de différentes parties de la plante *C spinosa* (Fuits et fleurs) par les différents solvants (méthanol et l'eau) montrent que la macération est préférable pour extraire les flavonoïdes dont on a trouvé que l'extrait **FLA** est le meilleur extrait parmi les autres, car il contient un taux de **2,529 (µg/g)** de flavonoïdes ,cependant l'extrait **FRM** est le moindre extrait qui contient une quantité faible de flavonoïdes de **0,153**.

La différence entre les teneurs en flavonoïdes est en fonction de la partie de la plante. La grande distinction entre les parties apparait au niveau de la richesse de certaines et la pauvreté des autres.

Nos résultats sont hautement significatifs. Et ils sont presque semblables aux résultats trouvés par (**Mahmoudi et al.,2013**) qui a montré que l'extrait des fleurs de l'artichaut violet qui sont macérés avec 100 ml de solutions aqueuses des solvants : éthanol, acétone, méthanol à 70 % v/v et eau ;enregistrent un maximum de flavonoïdes (18,78 mg éqQu/g PS en moyenne) tandis que la tige, les bractées et le réceptacle renferment des teneurs de 3 à 7 fois plus faibles (5,32, 3,02 et 2,58 mg éqQu/g PS en moyenne respectivement). En effet, (**Kukicet al.,2008**) ont trouvé des résultats différents et ils ont indiqué que le réceptacle d'artichaut est le plus riche en flavonoïdes.

Jokić et al., 2010 ont indiquent, en ce qui concerne le solvant d'extraction, quel que soit le mode d'extraction, l'éthanol et l'acétone restent les meilleurs extracteurs des flavonoïdes soient des moyennes très proches de 8,44 et 8,08 mg éqQu/g PS respectivement. L'éthanol

5. Discussion

et l'eau sont préférables car ils ont l'avantage d'être non polluants, moins chers et non toxiques par rapport à d'autres solvants comme le méthanol.

Nos résultats sont significativement proches à ceux qui sont trouvés par **(Meziti, 2013-2014)** pour l'extrait aqueux. Elle a indiqué que l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait de chloroforme sont les plus riches en flavonoïdes avec des teneurs de $(4,19 \pm 0,089 \mu\text{g EQ/mg d'extrait})$ et $(5,20 \pm 0,025 \mu\text{g EQ/mg d'extrait})$ respectivement. Par la suite vient l'extrait brut $(3,80 \pm 0,077 \mu\text{g EQ/mg d'extrait})$ suivi par l'extrait aqueux $(2,45 \pm 0,061 \mu\text{g EQ/mg d'extrait})$. Cependant seulement $(0,43 \pm 0,064 \mu\text{g EQ/mg d'extrait})$ sont trouvés dans l'extrait hexanique.

Conclusion et perspectives

6. Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques.

Ce dépistage préliminaire a montré des résultats intéressants et indiquait le potentiel antimicrobien et antioxydant de *Calycotome spinosa*.

À la lumière de ces expériences, on peut conclure que l'extrait méthanolique des fruits a présenté une activité antibactérienne, un intérêt intéressant, contre certaines souches pathogènes. Cet extrait a également montré un pouvoir anti-radicalaire important.

L'activité antimicrobienne et anti-oxydante de *C. spinosa*, notamment l'extrait FRM, pourrait être attribuée à divers constituants phytochimiques (flavonoïdes et composés phénoliques) présents dans les extraits bruts.

Quantitativement, l'évaluation du contenu des polyphénols et des flavonoïdes totaux a révélé la présence des quantités moyennement importantes en polyphénols et en flavonoïdes. Il ressort de ces analyses que *C. spinosa* est riche en ces biomolécules.

Sachant que notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches, de cet effet, et comme perspectives on propose de :

- ✓ Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.
- ✓ Développer des médicaments anti-radicalaires à base de plantes, doués d'une activité anti-oxydante.

Résumé

L'objectif des travaux présentés dans cette étude est la valorisation d'une plante endémique de l'Est d'Algérie, *Calycotome spinosa*. Des extraits bruts des parties aériennes (fleurs et fruits) ont été préparés en utilisant des solvants de diverses polarités (H₂O et MeOH). Le pouvoir antibactérien des extraits aqueux et méthanolique a été étudié par la méthode de diffusion en milieu solide, sur des souches bactériennes de références. De plus, l'activité antifongique des extraits bruts de *C. spinosa* a été évaluée sur des moisissures de stockage. En outre, l'activité anti-oxydante est également testée par la méthode de la réduction du radical DPPH et par la réduction du fer. La quantification des polyphénols et flavonoïdes a été aussi faite en utilisant le Folin ciocalteu et AlCl₃ respectivement. L'extraction a révélé un rendement variable dont le plus important est celui de l'extrait FLM (17.58%). On a trouvé aussi que l'extrait **FRM** a révélé une forte activité contre les bactéries multi-résistantes suivantes: *E.coli*, *P. aeruginosa* et la levure *C. albicans*, en revanche, les extraits des fleurs induisent une inhibition remarquable sur *K. pneumoniae* et les deux souches fongiques d'*Alternaria*. Les bactéries *S. aureus* et *B. subtilis* sont sensibles aux quatre extraits. Concernant l'activité anti-radicalaire des différents extraits, les résultats obtenus par DPPH montrent des IC₅₀ remarquables qui varient entre **0.074 (FRM)** et 0.13mg/ml (FRA). De plus, le pouvoir réducteur le plus élevé, utilisant la méthode de FRAP, a été obtenu par le même extrait **FRM**. Les dosages des polyphénols et flavonoïdes ont révélé des teneurs variées, les plus importantes ont été détectées par **FRM**. Cette étude appuie l'utilisation potentielle de l'extrait de *Calycotome spinosa* pour éliminer les bactéries causant des maladies infectieuses.

Mots clés : *Calycotome spinosa*, activité antimicrobienne, pouvoir antioxydant, polyphénols et flavonoïdes totaux

Abstract

The objective of the work presented in this study is the valorization of an endemic plant from the East of Algeria, *Calycotome spinosa*. Crude extracts of the aerial parts (flowers and fruits) were prepared using solvents of various polarities (H₂O and MeOH). The antibacterial capacity of aqueous and methanol extracts has been studied by the diffusion method in solid medium, on pathogenic bacterial strains of references. In addition, the antifungal activity of these crude extracts was evaluated on storage molds. Furthermore, the antioxidant activity is also tested using two methods; DPPH radical scavenging assay and Ferric Reducing-Antioxidant Power method. Total Polyphenols and flavonoids quantification was moreover calculated using Folin ciocalteu and AlCl₃ respectively. The extraction showed a variable yield; the most important was that of the FLM extract (17.58%). It was also found that the FRM extract revealed a strong activity against the following multi-resistant bacteria: *E.coli*, *P. aeruginosa* and yeast *C.albicans*, on the other hand, flower extracts induce a remarkable inhibition on *K.pneumoniae* and the two fungal strains of *Alternaria*. The *S. aureus* and *B. subtilis* bacteria are sensitive to the four extracts. As regards the anti-radical activity of the various extracts, the results obtained by DPPH showed remarkable IC₅₀ which vary between 0.074 (FRM) and 0.13 mg / ml (FRA). In addition, the highest reducing power using the method of FRAP, was obtained by the same extract FRM. The quantification of polyphenols and flavonoids revealed varying levels, the most important was detected by FRM. This study supports the potential use of *Calycotome spinosa* extract to eliminate microbes that cause infectious diseases.

Key words: *Calycotome spinosa*, antimicrobial activity, antioxidant power, total polyphenols and flavonoids.

المخلص

الهدف من الأعمال التي عرضت في هذه الدراسة هو تقييم نبات متوطن في شرق الجزائر، القندول الشوكي. تم إعداد المستخلصات الخام من الأجزاء الهوائية (الأزهار والفواكه) باستخدام مذيبات مختلفة قطبية (H₂O و MeOH). حيث تم دراسة النشاط المضاد للجراثيم للمستخلص المائي والميثانول بطريقة الانتشار في الوسط الصلب، على سلاسل بكتيرية معروفة. وبالإضافة إلى ذلك، تم تقييم النشاط المضاد للفطريات من طرف المستخلصات الخام من القندول الشوكي على فطريات المخزن. زيادة على ذلك تم اختبار النشاط المضاد للأوكسدة باستخدام طريقتين DPPH و FRAP. كما تم تقدير كمية البوليفينول والفلافونويد الكلية باستخدام Folin ciocalteu و AlCl₃ على التوالي.

كشفت نتائج الإستخلاص أن المرود الأكثر كان من طرف المستخلص FLM (17.58%). كما وجد أن مستخلص FRM أظهر نشاطا قويا ضد البكتيريا المتعددة المقاومة *P. aeruginosa* و *E. coli* والخميرة *C. albicans*، وعلى النقيض من ذلك، مستخلصات الأزهار أظهرت تثبيطا ملحوظا للبكتيريا الحساسة *S. aureus* و *B. subtilis*. وفيما يتعلق بالنشاط المضاد للأوكسدة، فإن النتائج التي حصل عليها بواسطة DPPH تظهر نشاطا ملحوظا IC₅₀ تتراوح بين 074 (FRM) و 0.13 مغ / مل (FRA)، كما تم الحصول على أكبر نشاط من طرف نفس المستخلص FRM بطريقة FRAP. كما كشفت نتائج كميات مادة البوليفينول والفلافونويد مستويات مختلفة، وأهمها أظهرت من طرف المستخلص FRM. وتدعم هذه الدراسة إمكانية استخدام مستخلص القندول الشوكي للقضاء على البكتيريا المسببة للأمراض المعدية.

الكلمات المفتاحية: *spinosa Calycotome*، النشاط المضاد للميكروبات، مضادات الأوكسدة، كمية الفلافونويد والبوليفينول الكلية

Références bibliographiques

7. Références bibliographiques

- Ameenah G. F. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow *Molecular Aspects of Medicine*, 27:1-93.
- Ata Martin I. (2006). Etude phytochimique d'une fabacee tropicale, lonchocapus nicou evaluation biologique preliminaire. Thèse de doctorat. Université de Limoges.
- Aubry P. et Gaüzère B. (2015). Panorama des principales affections dermatologiques en milieu tropical.
- Babar A.M., Hahn E.J. et Paek K.Y. (2007). Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules*, 12: 607-621.
- Bahorun T. (1997). Substances Naturelles actives.La flore Mauricienne .une source d'approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research councilMauritias.p83-94.
- Bautista-Bañõs S., Barrera-Necha LL., Bravo-Luna I. et Bermudes-Torres L. (2002). Antifungal activity of leaf and stem extracts from various plant species on the incidence of *Colletotrichum gloeosporoides* of papaya and mango fruit after storage. *Rev Mex Fitopatol* 20:8–12.
- Bénard C. (2009). Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate. Thèse de Doctorat. Université de Nancy.
- Benjlali B., Tantaoui-Elarki A. et Ismaili-Alaoui M. (1986). Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélose. *Plant MédPhytothér.* 20: 155-167.
- Billerbeck V.G., Roques C., Vanière P. et Marquier P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique des produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes X-n°3*: 248-251.
- Botton B., Breton A., Fevre M. et al. (1990). Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. p: 34-428.
- Boubekri Ch. (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de doctorat en science .Université Mohamed Khider-Biskra.
- Boudechiche M., Chemmam M., Boudechiche L., Matallah S. (2014). productions et reproduction, expérimentation et thérapie cellulaire des animaux domestiques et sauvages, Laboratoire d'épidémio-surveillance, santé, Université d'El Tarf, B.P 73, 36 000, EL Tarf, Algérie.

7. Références bibliographiques

- Boudjouref M. (2011). Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Thèse de magister. Université Ferhat Abbes-Sétif.p99 .
- Bouix M. et Leveau J.Y. (1991). Les levures Ds : Bourgeois, C.M., Leveau, J.Y., Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 2 Lavoisier-Tec & Doc, Paris. 3, pp 206 - 229.
- Bouix M., Leveau J.Y. (1993). Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Ed. Technique et documentation-Lavoisier-Apiaria. Paris, pp 523.
- Boutaghana N. (2013). Etude phytochimique et pharmacologique de plantes médicinales algériennes *Genista ulicina* Spach (Fabaceae) et *Chrysanthemum macrocarpum* (Sch.Bip.) Coss. & Kralik ex Batt (Asteraceae). Thèse de doctorat université constantine 1.
- Bruneton J. (1993). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 2ème Ed. Lavoisier, Paris.
- Bruneton J. (1999). Flavonoïdes. In : *Pharmacognosie, Phytochimie: Plantes médicinales*, 3ème édition, *Technique et Documentation* (Paris), pp: 310-353.
- Bullerman L.B. et Bianchini A. (2007). Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal Food Microbiology* 119:140 -146.
- Carretero A. et Fernandez-Gutierrez A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1220-1234.
- CHAABI M. (2008). Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : *Euphorbia stenocla* Baill. (Euphorbiaceae), *Anogeissus liocarpus* Guill. Etperr. (Combrétaceae), *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae). Thèse de doctorat en pharmacologie chimie, Université, Louis Pasteur et Université mentouri de Constantine (Alger): 179, 180.
- Chavez-Quintal P., González-Flores T., Rodríguez-Buenfil I. et Gallegos-Tintore S. (2011). Antifungal Activity in Ethanolic Extracts of *Carica papaya* L. cv. Maradol Leaves and Seeds. *Indian J Microbiol*. 51(1):54–60.
- Cheynier V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am.J. Clin. Nutr.* 81 (suppl), 223S-229S.
- Chikhi I. (2014). Composition chimique et activités biologiques des extraits de cinq plantes aromatiques et médicinales de l'ouest d'Algérie. Thèse de doctorat. Université abou bekr belkaid-tlemcen.

7. Références bibliographiques

- Crozier S. et Woimant F. (2007). Infarctus cérébral grave: quelle prise en charge? Acute management of severe ischemic stroke. *Réanimation*. 16 : 441- 451.
- D'halewyn M. , Leclerc J. , Norman K. , Bélanger M. , Legris M. (2002). Les risques de la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur, Yves Frenette ©Institut national de santé publique du Québec
- Dai J. et Mumper R. J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 15(10). 7313-52.
- Damerджи A. et Djeddid A. (2012). Les orthoptéroïdes associés à une plante xérophile (*Calycotome spinosa* L. (Link) (Fabaceae) dans la région de Tlemcen (nord-ouest algérien) Université Aboubekr Belkaid-Tlemcen. (Algerie). 111 – 123
- Daouda T. (2015). Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de Côte d'Ivoire. Thèse de doctorat. Université Félix Houphouët-Boigny.
- Dicko M. H., Gruppen H., Traoré A. S., Voragen A. G. J. & Van Berkel W. J. H. (2006). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 1 (1), 21-38.
- Djeddi S., Djahoudi A.G., Benchalia N. et Himour H., (2015). Antibacterial activity of *Calycotum villosa* (Poiret) Link extracts. 3(1): 13-18.
- Dupont F. and Guignard J.L. (2007). *Abrégé de Botanique* 14^{ème} édition, Editions Masson. Paris; 285 p.
- Emerenciano V. P., Barbosa K. O., Scotti M. T. et Ferrero M. J. P. (2007). Self organising maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae: a classification of tribes using flavonoid data. *Journal of Brazilian Chemical Society*. 18 (5) : 891-899.
- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. et Abdelly C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*. 331: 372-379.
- Ghosh D., Scheepens A. (2009). Vascular action of polyphenols. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53 : 322 – 331.
- Gomez-Caravaca A.M., Gomez-Romero M., Arraez-Roman D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez A. (2006) Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1220-1234.
- Guiraud J.P. (2012). *Microbiologie alimentaire*. Paris : Dunod. 576 p.
- Guiraud J. et Galzy P. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Ed. Dunod. Paris, pp 615.

7. Références bibliographiques

- Guiraud J.P. (1996). Microbiologie alimentaire. (Ed) Dunod. Paris, pp 9 - 320.
- Hartmann T. (2007). Fromwasteproducts to ecochemicals: fiftyyearsresearch of plant secondarymetabolism. *Phytochemistry*. p68, 2831–2846.
- Hartwell J.L. (1982). *Plants Used Against Cancer. A survey, USA7*. Lawrence, MA: Quarterman Publications.
- Heywood V.H. (1996). *Flowering Plants of the World*. 3th edition, OxfordUniversity Press. Oxford. pp. 141-145, 149-152.
- Hodgson J.M., Croft, K.D. (2010). Tea flavonoids and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, 31: 495–502.
- Hoffmann D. (2003). *Medical Herbalism: The Science and Practice of Herbal Medicine*. Edition Inner Traditions / Bear & Co., p 90.
- Hoffmann I. (2003). Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son s-substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Thèse de doctorat. Université de Louis pasteur-strasbourg I.
- Hoffmann L., Besseau S., Geoffroy P., Ritzenthaler C., Meyer D., Lapiere C., Pollet B. et Legrand M.(2004). Silencing of hydroxycinnamoyl coenzyme A shikimate / quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoidbiosynthesis. *Plant cell*,16 (6) : 1446- 1465.
- Jasso de Rodriguez D., Herna´ndez-Castillo D., Rodriguez-Garcia R. et Angulo- Joly J. (2003). *Infectiologie (Paris)*, pp 145-162.
- Jeun J. M., Annie F. et Chrystian J. L. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux*, p203-204.
- Karaali A., Boyacioǎlu D., Günez G. et Özçelik B. (2004). Flavonoids in fruit and vegetables: their impact on foodquality, nutrition and health–STREP or CA. Europeancommision's the 6th framework programme for research. Istanbul technicaluniversity. Turkey.
- Kening Y., Vincenzo D. L. et Normand B. (1995). Creation of a metabolicsink for tryptophanalters the phenylpropanoidpathway and the subsceptibility of potato to *Phytophthora infestans*. *The plant cell*,7 : 1787-1799.
- Krief S. (2003). *Métabolites secondaires des plantes et comportement animal*, thèse doctorat, muséum national d'histoire naturelle. 32p.

7. Références bibliographiques

- Laaboudi W. (2012). L'extraction des composés phénoliques à partir des zestes d'argumes et l'étude de leur activité antiradicalaire, mémoire de fin d'études Pour l'obtention du diplôme de master sciences et Techniques, Laboratoire de Biotéchnologie [LB] de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz.
- Larit F., Benyahla S., Benayache S., Benayache F., Leon F., Brouard I., Bermijo J. (2012). Flavonoïdes Fromcalycotomespinosal. Lnk.Int. J. Med.Arom. Plants., 2(1): 34-37.
- Larpent J.P. (1990). Biotechnologie des levures masson, Paris, pp 132 - 315.
- Lentini F., Aleo M. et Amenta R., (1993). L'uso popolare delle piantenelle Isole Egadi (Sicilia). Giorn Bot Ital. 127 (3): 702.
- Lhuillier A. (2007) Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauriasalicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauriapolyphylla* Baker (*Ericaceae*), *Tambourissatrichophylla* Baker (*Monimiaceae*) et *Embeliaconcinna* Baker (*Myrsinaceae*). Thèse de doctorat. Toulouse.
- Macheix J J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. p4-5.
- Malešev D. et Kuntić V. (2007). Investigation of metal-flavonoidchelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. Journal of the Serbian chemicalsociety., 72 (10) : 921-939.
- Manach C., Mazur A. et Scalbert A. (2005). Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, 16 : 1–8.
- Manallah A., (2012). Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. mémoire de magister. Université Ferhat Abbas – sétif.
- Marfek A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoides. Etude de leur réactivité avec les radicaux libres issus des alcools : formation des depsides. Thèse de doctorat de l'université de Limoges.
- Martin S. et Andriantsitohaina R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. Annales de cardiologie et d'angéiologie. 51: 304-315.
- Mebirouk-Boudechiche L., Cherif M., Boudechiche L. et Sammar F. (2014). Teneurs en composés primaires et secondaires des feuilles d'arbustes fourragers de la région humide d'Algérie Revue Méd. Vét. 165, 11-12, 344-352

7. Références bibliographiques

- Meddour R., Mellal H., Meddour O., Derridj A. (2009). La flore médicinale et ses usages actuels en kabylie (wilaya de tiziouzou, algérie) : quelques résultats d'une étude ethnobotanique , Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri, BP 17 RP, 15 000 TiziOuzou, Algérie *Revue des Régions Arides*, n° Spécial, pp :181-201.
- Meziti A. (2009). Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L étude in vitro et in vivo. Mémoire de magister.
- Middleton E., Kandaswami C. et Theoharidies T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological reviews*. 52: 673-751.
- Milane H., (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Strasbourg.
- Mokhtari M. (2012). Etude phytochimique de la plante *calycotomespinosa*. link. ChimieOrganique. Université El-Hadj Lakhdar. Batna. Algérie. p : 15.
- Morel S. (2011). Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae). Thèse de doctorat. Université d'Angers.
- Morel S., Landreau A., Nguyen V.H., et al. Preparative isolation, FastCentrifugal Partition Chromatography purification and biological activity of cajaflavanone from *Derris ferruginea* stems. *Phytochemical analysis*. Accepté le 14/04/2011.
- Narayana K.R., Reddy M.S., Chaluvadi M.R. et Krishina D.R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*. 33: 2-16.
- Nothias J.L. (2009). « *Peut-on manger des aliments moisissés ?* ». Le figaro, <http://www.lefigaro.fr/sciences/2009/02/11/01008-20090211ARTFIG00589-peut-on-manger-des-aliments-moisissés-nettoyés-.php>
- Oteng-Gyang K. (1984). Introduction à la microbiologie dans les pays chauds. Ed. Lavoisier. Paris, pp 43 - 46.
- Ouibrahim F. (2015). Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de trois plantes aromatiques (*Laurus nobilis* L., *Ocimum basilicum* L. et *Rosmarinus officinalis* L.) de l'est algérien. Thèse de doctorat. université badji mokhtar – Annaba.

7. Références bibliographiques

- Phaff H.G., Miller M.W. et Mrak E.K., (1968). The life of yeasts. In: Oteng-Gyang K. Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. Technique & Documentation Lavoisier, Paris. 8; pp 43.
- Pincemail J., Degruene F., Voussure S., Malherbe C., Paquot N. et Defraigne J.O. (2007). Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. Nutrition clinique et métabolisme 21. 66–75.
- Piquemal G. (2008). Les flavonoïdes (en ligne) : <http://www.detoursante.com/index.php>
Option=com_content&view=article&id=166&Itemid=215
- Pol D. (1996). Travaux pratiques de biologie des levures. Guide de laboratoire. ellipses édition marketing S.A, Paris. 15, pp 20 - 38; 42 - 57; 141 - 151.
- Quèzel P. et Santa S., (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome 2, Ed. Centre nationale de la recherche scientifique, Paris. pp.935-936.
- Roquebert M.F. (2013). Les moisissures. <http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/cours/roqueber.htm>
- Sanchez JL. (2005). Antifungal activity in vitro of Aloe vera pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. Ind Crops Prod 21:81–87.
- Santé et Services Sociaux Québec. (2013). Moisissures. <http://www.msss.gouv.qc.ca/sujets/santepub/environnement/index.php?moisissures>
- Sari M., Hendel N., Sarri D., Boudjelal A., Benkhaled A. (2013). Ethnobotanical study of medicinal flora used by the people of the Forest El Haourane-Msila (Algeria). Journal of Ecoagritourism, 9(2): 27.
- Scriban R.. (1993). Biotechnologie. (4^{ème} Ed) Technologie et documentation - Lavoisier. Paris, pp 886.
- Seyoum A., Asres K., El-Fiky F.K. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. Journal of phytochemistry. 67: 2058-2070.
- Skandamis P.N. and Nychas G.J.E., (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. J. Applied Microbiol. 91: 1011-1022.
- Traoré Y., Ouattara K., Yéo D., Doumbia I. et Coulibaly A., (2012). Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d'Annona senegalensis Pers. (Annonaceae) 58: 4234– 4242.

7. Références bibliographiques

- Urquiaga I. et Leighton F. (2000). Plant polyphenolantioxidants and oxidative stress. *Biological Research*, 33 (2) : 55-64.
- Vinod K.G., Amit R., Vikas KN. et Kalishankar M. (2010). Antimicrobial activity of *Spondias pinnata* resin. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(16). pp. 1656-1661
- Visioli F., Borsani L. et Galli C. (2000). Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of Phytochemicals. *Cardiovascular Research* 47, 419–425.
- W-Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly., Hollman J. P., L –Keen C., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., Williamson G. Et Burrowes J. (2007). Flavonoids and hearthealth : Proceeding of the ILSI NorthAmerica flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition*, 137 (3 supp 1) : 718 s-737 s.
- Waksmundzka-Hajnos M. et Sherma J. (2011). High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical ience. *Chromatographic Science Series*, 477-478.
- Wojciechowski M.F., Lavin M. and Sanderson M.J. A. (2004). phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid MATK genes resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany*; 11: 1846-2004.
- Xiuzhen H., Tao S. et Hongxiang L. (2010). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8: 950-988.
- Yahiaoui B. (2014-2015). Cours de Microbiologie générale.
- Zellagui A., Gherraf N., Kaabache M. et Rhouati S. (2011). Phytochemical and biological survey from two endemic Species: *genista microcephala* coss. et dur. and *filago Pomelli* Batt. et Trab. *Plant Sciences Feed*; 1(11): 190-193

Annexes

Annexe 1 : Composition des milieux de cultures

Mueller Hinton (MH) pH=7.4

Infusion de viande	300 g
Hydrolysate de caseine	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Agar	17 g
Eau distillée.....	1000 ml

Stériliser par autoclavage à 121° C pendant 15 min.

Gélose nutritive (GN) pH=7.2

Peptone	10 g
Extrait de viande	5
Chlorure de sodium	5
Gélose	15
Eau distillée.....	1000 ml

Stériliser par autoclavage à 121° C pendant 15 min. **(Guiraud, 1998).**

Gélose Sabouraud Chloramphénicol (SAB+) pH= 6,4

Peptone de viande (bovin ou porcin)	3 g
Peptone de caséine (bovin)	3 g
Peptone de soja	3 g
Extrait de levure	2 g
Extrait de malt	1 g
Glucose	19g
Phosphate monopotassique	0.5g
Phosphate disodique	0.5g
Agar	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

Stériliser par autoclavage à 121° C pendant 15 min. **(Delarras, 2007).**

Mc Farland

Barium chloride($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)1%.....	0.5ml
Sulfuric Acid(H_2SO_4)1%.....	99.5ml

Milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Pomme de terre.....	250 g
Glucose.....	20 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

- Laver la pomme de terre non pelée;
- Couper en cubes dans 500 ml d'eau distillée;
- Porter à ébullition pendant 30 – 45 min;
- D'autre part, faire fondre l'agar dans 500 ml d'eau distillée;
- Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution d'agar;
- Ajouter le glucose;
- Compléter le volume à 1000 ml;
- Stériliser par autoclavage à 121° C pendant 15 min. **(Larpen, 1997)**

Milieu Chapman pH= 7.4

Peptone.....	10,0 g/l
Extrait de viande de bœuf.....	1 g/l
Chlorure de sodium.....	75,0 g/l
Mannitol.....	10,0 g/l
Rouge de phénol.....	0,025 g/l
Agar.....	15,0 g

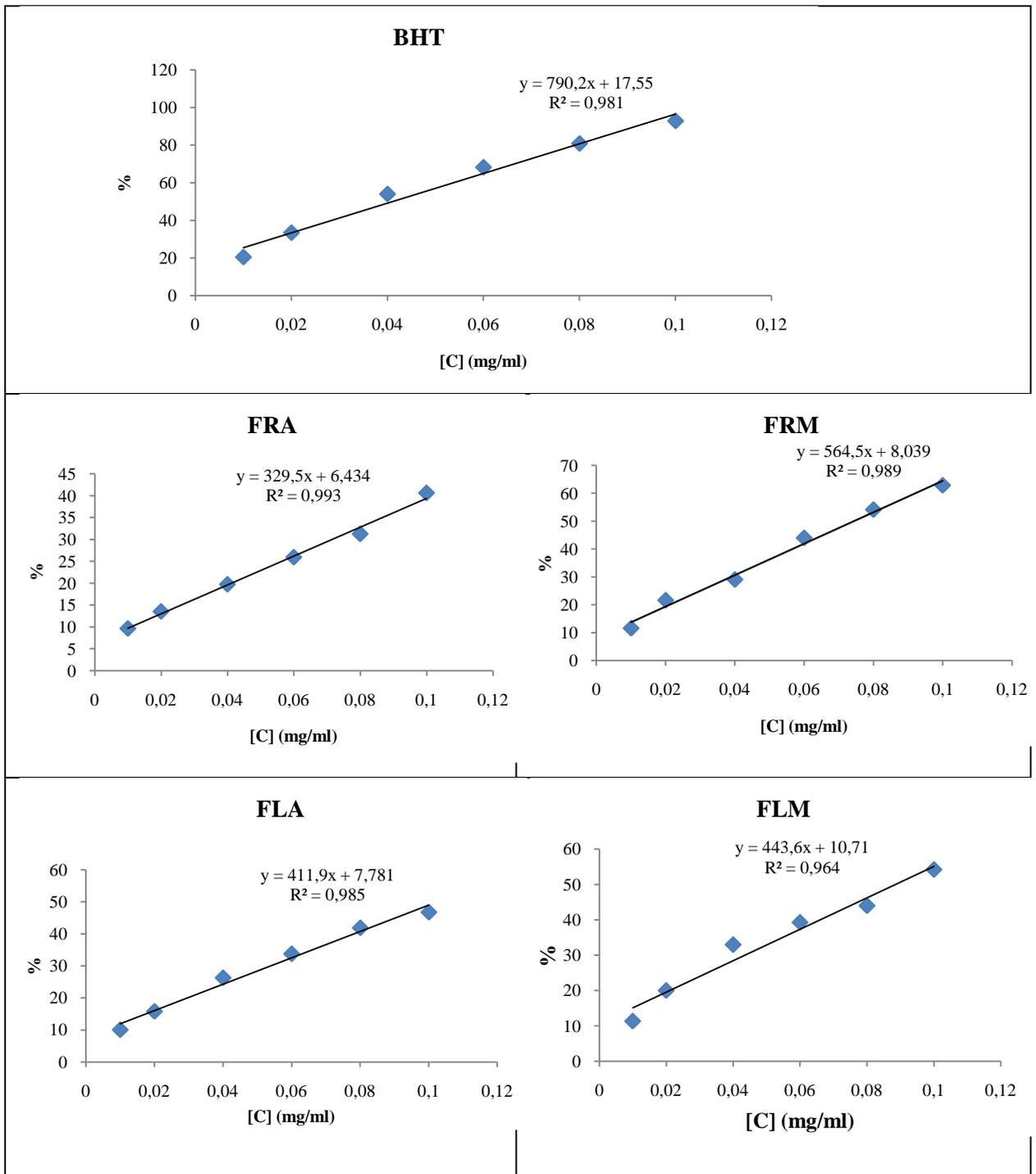
Stériliser par autoclavage à 121° C pendant 15 min.

Milieu MacConkey pH= 7.4

Pancréatique Digest de Gelatine.....	17 g/l
Peptones (viande et caséine).....	3 g/l
Lactose.....	10 g/l
Sels biliaires No. 3.....	1.5 g/l
Chlorure de sodium.....	5 g/l
Rouge neuter.....	0.03 g/l
Crystal violet.....	0.001 g/l
Agar.....	13.5g/l

Stériliser par autoclavage à 121° C pendant 15 min.

Annexe 2: Courbes représentant le pouvoir d'inhibition des différents extraits (DPPH)



Annexe 3 : Photos représentant les résultats de l'activité anti-oxydante et du dosage

DPPH	FRAP
	
Dosage des polyphénols	Dosage des flavonoides
	

Evaluation de l'activité antimicrobienne et anti-oxydante de certains extraits d'une plante endémique

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie des Mycètes

Résumé

Les travaux présentés dans cette étude à la valorisation d'une plante endémique de l'Est d'Algérie, *Calycotome spinosa*. Des extraits bruts des parties aériennes (fleurs et fruits) ont été préparés en utilisant des solvants de diverses polarités (H_2O et MeOH). Le pouvoir antibactérien des extraits aqueux et méthanolique a été étudié par la méthode de diffusion en milieu solide, sur des souches bactériennes de références. De plus, l'activité antifongique des extraits bruts de *C. spinosa* a été évaluée sur des moisissures de stockage. En outre, l'activité anti-oxydante est également testée par la méthode de la réduction du radical DPPH et par la réduction du fer. La quantification des polyphénols et flavonoïdes a été aussi faite en utilisant le Folin ciocalteu et $AlCl_3$ respectivement. L'extraction a révélé un rendement variable dont le plus important est celui de l'extrait FLM (17.58%). On a trouvé aussi que l'extrait **FRM** a révélé une forte activité contre les bactéries multi-résistantes suivantes: *E.coli*, *P. aeruginosa* et *C. albicans*, en revanche, les extraits des fleurs induisent une inhibition remarquable sur *K. pneumoniae* et les deux souches fongiques d'*Alternaria*. Les bactéries *S. aureus* et *B. subtilis* sont sensibles aux quatre extraits. Concernant l'activité anti-radicalaire des différents extraits, les résultats obtenus par DPPH montrent des IC_{50} remarquables qui varient entre **0.074 (FRM)** et 0.13mg/ml (FRA). De plus, le pouvoir réducteur le plus élevé, utilisant la méthode de FRAP, a été obtenu par le même extrait **FRM**. Les dosages des polyphénols et flavonoïdes ont révélé des teneurs variées, les plus importantes ont été détectées par **FRM**. Cette étude appuie l'utilisation potentielle de l'extrait de *Calycotome spinosa* pour éliminer les bactéries causant des maladies infectieuses.

Mots clés: *Calycotome spinosa*, activité antimicrobienne, pouvoir antioxydant, polyphénols et flavonoïdes totaux.

Laboratoire de recherche: Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBaM), Département de Microbiologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université des Frères Mentouri- Constantine

Jury d'évaluation :

Président du jury : Pr. KACEM CHAOUICHE Noredine Pr- UFM Constantine

Rapporteur : Mme. CHERFIA Radia M.A.A- UFM Constantine

Examineur : Mme. ZITOUNI Hind M.C.B- UFM Constantine

Date de soutenance : 06/07/2017

