



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine 1

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée.

Intitulé

**Evaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne
«in vitro» de l'extrait méthanolique (feuilles) de
Crataegus monogyna Jacq.**

Présenté et soutenu par:

Le: 16 / 07 /2019.

Hamdane Imene et Rahamna Amina

Jury d'évaluation :

Président : Madi Aicha (Maitre de conférences B-UFM Constantine).

Rapporteur : Maameri-Habibatni Zineb (Maitre de conférences A-UFM Constantine).

Examineur : Bensouici Chawki (Maitre de Recherche B-CRBT).

Remerciement

*Tout d'abord nous tenons à remercier DIEU tout puissant
de nous*

Avoir donné le

Courage et la volonté de terminer ce travail.

*En tout premier lieu nous tenons à remercier notre
promoteur et promotrice **M^{me} MAAMERI-HABIBATNI Zineb**,
Maître de conférences classe A à l'université de Constantine.*

*Pour le temps et l'attention qu'elle a bien voulu consacrer
au bon déroulement de ce travail.*

*Je la remercie vivement pour son aide, sa confiance et son
soutien moral.*

*Nous tenons à remercier **M^{me} MADI Aicha**, Maître de conférences
classe B à l'université de Constantine*

De nous avoir fait l'honneur de presider notre soutenance

*Un grand merci va à **MR BENSOUISSI Chawki**, Maître de
recherche à CRBT d'avoir gentiment accepté d'examiner et de
juger notre mémoire ,*

qu'ils trouvent ici notre sincère gratitude.

*et son équipe de laboratoire de biochimie
de CRBT pour toute l'aide qu'il nous a apporté au cours de notre
pratique.*

*Et aussi le personnel de laboratoire de référence de sante de
wilaya de Skikda pour la générosité de leur accompagnement
indispensable et leur patience, toute au long de notre stage
pratique.*

*Spécialement à **Dr BOUZRARA Moufida**,*

MRZEROUK Kamel

d'avoir mis à notre

Disposition leurs connaissances.

A toute l'équipe du laboratoire de biochimie

*Nous tenons également à remercier tous les personnes
qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail*

Qu'ils trouvent ici notre sincère et profonde gratitude.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à toutes les personnes que

J'aime :

*Mes très **chers parents** à qui je dois le mérite d'être arrivée là, qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude et mon affection.*

*Mes très chers frères **Nacer Eddine, Nadir et Younes***

*Mes très chères sœurs **Bouchra, Asma et Amel***

Toute ma famille et les amis (es)

Spéciale dédicace a ma chère amie Imene avec qui j'ai tout partagé ces dernières années.

*Ma binôme **AMINA** et toute sa famille*

Toute la promotion biochimie appliquée 2018/2019.

Imene



Dédicace

*A toi mon père, toi qui m'aidé beaucoup dans tout mon parcours scolaire,
A toi ma mère, toi qui me comble d'amour et d'affection,
Ensemble vous avez su m'encourager et me soutenir tout
au long de mes études. Que dieu vous protège.*

*A toi mon marié: **Toufik***

*A vous tous mes chers sœurs: **Merieme** et **Yasmine***

*A toi ma chère frère: **Abdelatif***

*A nos petites : **Sidrat el Muntaha** et **Aissa Yazen***

*A vous mes adorables amis (es): **Nour EL Houda, Imene**....*

*A ma camarade **IMENE** avec qui j'ai passé des moments
inoubliables et à toute sa famille,*

*A tous mes enseignants, du primaire à l'université,
Je dédie ce modeste travail qui n'aurait pu aboutir et voir
la lumière sans l'aide de dieu le tout puissant.*

Amina



Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 01: Noms vernaculaires..... | 05 |
| Tableau 02: Principales sources des radicaux libres (endogènes et exogènes)..... | 17 |
| Tableau 03: Espèces réactives de l’oxygène radicalaire et non radicalaire..... | 18 |
| Tableau 04: Les souches bactériennes testées..... | 34 |
| Tableau05: Les souches bactériennes testées..... | 49 |
| Tableau 06: Résultats du criblage phytochimique des feuilles <i>Crataegus monogyna</i> Jacq..... | 54 |
| Tableau 07: Taux de polyphénols totaux et des flavonoïdes contenus dans l’extrait méthanolique des feuilles de <i>Crataegus monogyna</i> Jacq..... | 60 |
| Tableau 08: Pourcentage d’inhibition d’activité antiradicalaire DPPH..... | 62 |
| Tableau 09: Activité du pouvoir réducteur par la méthode FRAP..... | 64 |
| Tableau 10: Activité de la réduction de cuivre par la méthode CUPRAC..... | 65 |
| Tableau 11: Test de la capacité antioxydante par ABTS | 66 |
| Tableau 12: Test de la réduction de fer par méthodephenanthroline..... | 67 |
| Tableau 13: La capacité antioxydante pargalvinoxyl radical GOR..... | 68 |
| Tableau 14: Diamètres de la zone d’inhibition (en mm) induits par les différentes concentrations en extrait méthanolique testé sur les souches bactériennes..... | 70 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 01: Présentation de l'arbuste de <i>Crataegus monogyna</i> Jacq..... | 04 |
| Figure 02: Fleurs, Fruits et Feuilles de <i>Crataegus monogyna</i> Jacq..... | 04 |
| Figure 03: Répartition des espèces du <i>Crataegus</i> en Algérie..... | 08 |
| Figure 04: Stress oxydant..... | 11 |
| Figure 05: Schéma modifié de l'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie..... | 15 |
| Figure 06: Espèces réactives oxygénées et systèmes de protection antioxydants..... | 17 |
| Figure 07: Les pathologies associées aux espèces réactives oxygénées..... | 20 |
| Figure 08: Méthode de diffusion en milieu gélosé..... | 23 |
| Figure 09: Méthode E-test..... | 24 |
| Figure 10: Détermination de l'activité bactériostatique et bactéricide..... | 24 |
| Figure 11: Colonies de <i>S.aureus</i> après coloration de Gram sous microscope électronique..... | 25 |
| Figure 12: Bactéries <i>Streptococcus</i> | 26 |
| Figure 13: <i>Escherichia coli</i> | 28 |
| Figure 14: Colonie de <i>Proteus mirabilis</i> observée au microscope optique..... | 29 |
| Figure 15 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> au microscope électronique à balayage..... | 30 |
| Figure 16: Protocole de l'étude expérimentale..... | 32 |
| Figure 17: Lieu de la récolte de l'Aubépine <i>Crataegus monogyna</i> | 33 |
| Figure 18: Filtration de macérât sous vide..... | 34 |
| Figure 19: Évaporation du filtrat..... | 35 |

| | |
|---|----|
| Figure 20: Extrait brut d'éther de pétrole..... | 35 |
| Figure 21: Macération dans solution hydroalcoolique..... | 36 |
| Figure 22: Filtration de macérât Sous vide..... | 36 |
| Figure 23: Évaporation du filtrat..... | 36 |
| Figure 24: Extrait méthanolique brut..... | 36 |
| Figure 25: Représentation schématique de différentes dilutions de l'extrait..... | 41 |
| Figure 26: Forme réduite et libre du DPPH..... | 42 |
| Figure 27: Test du DPPH..... | 43 |
| Figure 28: Test du pouvoir réducteur..... | 44 |
| Figure 29: La réaction de test du CUPRAC..... | 44 |
| Figure 30: Test du CUPRAC..... | 45 |
| Figure 31: Test de l'ABTS..... | 46 |
| Figure 32: Test du phénanthroline..... | 47 |
| Figure 33: Test du GOR..... | 48 |
| Figure 34: Préparation du milieu de culture M-H..... | 50 |
| Figure 35: Préparation du milieu de culture GN..... | 50 |
| Figure 36: La dilution d'extrait méthanolique dans le DMSO..... | 51 |
| Figure 37: Exemple de repiquage de l'E. Coli..... | 52 |
| Figure 38: Insertion des disques sur la gélose inoculée..... | 53 |
| Figure 39: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique..... | 59 |
| Figure 40: Courbe d'étalonnage de la Quercetine..... | 60 |
| Figure 41: Comparaison des teneurs des polyphénols et des flavonoïdes..... | 61 |
| Figure 42: IC ₅₀ de l'extrait méthanolique et BHA du test DPPH..... | 63 |

| | |
|---|----|
| Figure 43: Valeurs $A_{0,5}$ du test FRAP..... | 64 |
| Figure 44: $A_{0,5}$ de l'extrait méthanolique et BHA du test CUPRAC..... | 65 |
| Figure 45: IC_{50} de l'extrait méthanolique et BHA du test ABTS..... | 66 |
| Figure 46: $A_{0,5}$ de l'extrait méthanolique et BHA du test phenanthroline..... | 67 |
| Figure 47: IC_{50} de l'extrait méthanolique et BHA du test GOR..... | 68 |
| Figure 48: Test de diffusion en milieu gélosé de l'extrait méthanolique de feuilles <i>Crataegus monogyna</i> Jacq..... | 71 |
| Figure 49: Halos d'inhibition (mm) des cinq souches bactériennes testées par des différentes concentrations d'extrait..... | 72 |
| Figure 50: Zones d'inhibition des cinq souches bactériennes testées en fonction des différentes concentrations d'acide gallique..... | 72 |

Liste des abréviations

Caractères

A

Abs : Absorbance.

ABTS : Acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

ADN : Acide désoxyribonucléique.

APG II : *Angiosperme Phylogeny Group*.

ATCC : American type culture collection.

B

BHA : Butylhydroxyanisole.

BHT : Hydroxytoluène butylé.

C

CMB : Concentration minimale bactéricide.

CMI : Concentration minimale d'inhibition.

Cu(II)-Nc : Cuivre (II)-Néocuproïne.

Cu²⁺ : Ion cuivre.

CUPRAC : Cuivrique Réduire Antioxidant Capacity.

Cu-SOD : Superoxyde dismutase cuivre.

D

DMF : Diméthylformamide.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DPPH : Diphényl picryl- hydrazyle.

E

E. Coli : *Escherichia coli*.

E.AG : Equivalent d'acide gallique.

EMe : Méthanol.

EOA : Espèces oxygénées activées.

EQ : Equivalent de quercétine.

EROA : Espèces de l'oxygène ou d'azote.

O

O₂ : Oxygène.

O₂^{°-} : Anion superoxyde.

O₂^{•-} : Radical superoxyde.

OH : Hydroxyle.

OH[•] : Radical hydroxyle.

F

Fe²⁺ : Ions ferreux.

Fe³⁺ : Ions ferriques.

FeCl₃ : Chlorure de fer.

Fe-SOD : Superoxyde dismutase ferreux.

G

GOR : Galvinoxyl radical.

GsH-Px : Glutathion peroxydase.

I

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%.

K

KOH : Hydroxyde de potassium.

H

h : Heure.

H⁺ : Protons.

H₂O : Eau.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

H₃PMo₁₂O₄₀ : Acide phosphomolybdique.

H₃PW₁₂O₄₀ : Acide phosphotungstique

HCl : Acide chlorhydrique.

L

LDL : Low Density Lipoprotein.

M

MeOH : Méthanol.

Mn-SOD : Superoxyde dismutase manganèse.

N

NaOH : Soude.

P

P. Mirabilis : *Proteus mirabilis*.

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*.

R

R[•] : Radical libre.

R² : Coefficient de corrélation.

RL : Radicaux libres.

ROO[•] : Radical peroxyde.

ROS : Reactive oxygen species.

S

S : Solution.

S.aureus : *Staphylococcus aureus*.

Sm : Solution mère.

SO : Stress oxydatif.

SOD : Superoxyde dismutase.

U

UV : Ultraviolet.

Unités

°C : Degré Celsius.

mg : Milligramme.

ml : Milli litre.

nm : Nanomètre.

Ppm : Partie par million.

µg : Microgramme.

µg EAG/mg : Microgramme d'équivalent de l'acide gallique par milligramme d'extrait sec.

µg EQ/mg : Microgramme d'équivalent de la quercitine par milligramme d'extrait sec.

µg/ml : Microgramme par millilitre.

µl : Micro litre.

> : Supérieur.

± : Plus ou moins.

Sommaire

| | |
|-----------------------------|----|
| Liste des tableaux..... | I |
| Liste des figures..... | II |
| Liste des abréviations..... | V |
| Introduction générale..... | 01 |

Synthèse bibliographique

Chapitre I :

Présentation de *Crataegus monogyna* Jacq

| | |
|--|----|
| I.1. Etymologie..... | 03 |
| I.2. Origine..... | 03 |
| I.3. Description botanique..... | 03 |
| I.4. Dénominations vernaculaires..... | 05 |
| I.5. Exigences climatiques..... | 05 |
| I.6. Position dans la systématique..... | 06 |
| I.6.1. Selon la classification des plantes à fleurs de Cronquist (1981)..... | 06 |
| I.6.2. Place du taxon dans la classification APG II (2003)..... | 06 |
| I.6.3. Place du taxon dans la classification APG III (2009)..... | 06 |
| I.7. Aires de répartition..... | 07 |
| I.8. Chimie de la plante..... | 08 |
| I.8.1 Composition en métabolites primaires..... | 08 |
| I.8.2. Composition en métabolites secondaire..... | 08 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| I.9. Utilisation..... | 09 |
| I.10. Données pharmacologiques..... | 09 |
| I.11. Toxicité..... | 10 |

Chapitre II

Stress oxydant

Introduction

| | |
|---|----|
| II.1. Stress oxydant..... | 12 |
| II.2. Radicaux libres | 12 |
| II.3. Origine de stress oxydant..... | 13 |
| II.3.1. Espèces réactives d'oxygène (ERO)..... | 13 |
| II.3.2. Principaux types des espèces réactives d'oxygène (ERO)..... | 13 |
| II.4. Cibles biologiques du stress oxydant..... | 15 |
| II.4.1. Lipides..... | 15 |
| II.4.2. Protéines..... | 16 |
| II.4.3. Acides nucléiques (ADN)..... | 16 |
| II.4.4. Glucides..... | 16 |
| II.6. Antioxydants..... | 16 |
| II.6.1. Systèmes de défenses antioxydants..... | 17 |
| II.6.1.1. Systèmes antioxydants endogènes..... | 17 |
| II.6.1.2. Systèmes antioxydants exogène..... | 18 |

| | |
|--|----|
| II.7. Implications pathologiques du stress oxydatif..... | 19 |
|--|----|

Chapitre III

Activité antibactérienne

Introduction

| | |
|---|----|
| III. Etude de l'activité antibactérienne <i>in vitro</i> | 22 |
| III.1. Les techniques d'évaluation de l'activité antibactérienne..... | 22 |
| III.2. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées..... | 25 |
| III.2.1. Les bactéries à Gram positif | 25 |
| III.2.2. Les bactéries à Gram négatif..... | 27 |

Etude expérimentale

Chapitre I

Matériel et Méthodes

| | |
|--|----|
| I. Matériel et Méthodes..... | 32 |
| I.1. Matériel..... | 33 |
| I.1.1. Matériel végétal..... | 33 |
| I.1.2. Souches bactériennes testées..... | 33 |
| I.2. Méthodes..... | 34 |
| I.2.1. Préparation des extraits..... | 34 |
| I.2.1.1. Préparation de l'extrait de l'éther de pétrole..... | 34 |
| I.2.1.2. Préparation de l'extrait hydroalcoolique..... | 35 |

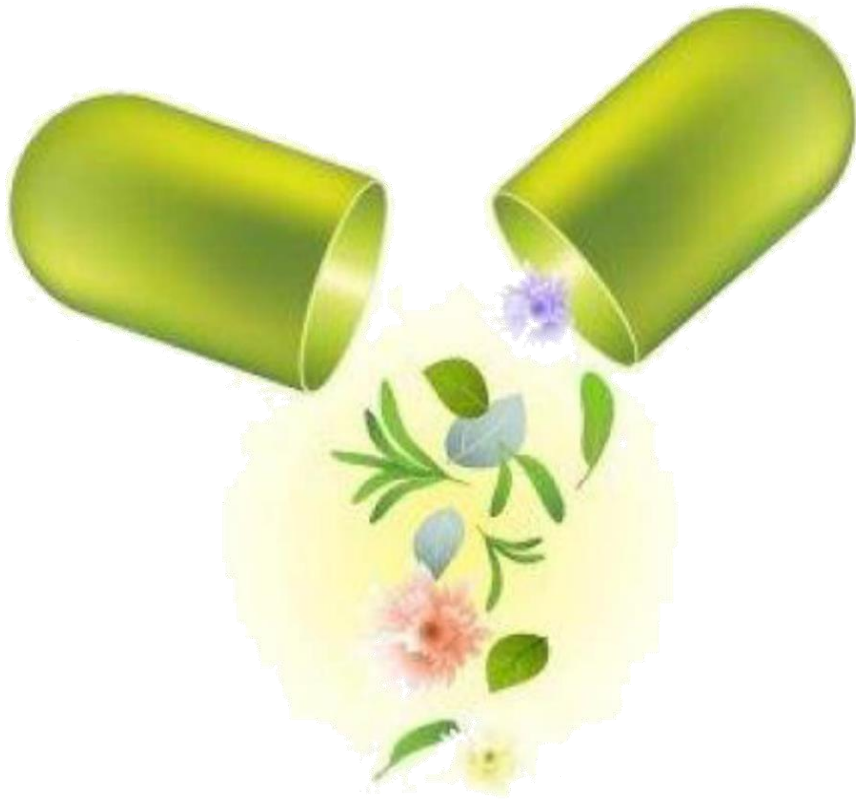
| | |
|--|----|
| I.2.2. Criblage « screening » phytochimique..... | 37 |
| I.2.3. Dosage colorimétrique (spectrophotométrique)..... | 39 |
| I.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux..... | 39 |
| I.2.3.2. Dosage des flavonoïdes..... | 39 |
| I.2.4. Evaluation de l'activité biologique <i>in vitro</i> | 40 |
| I.2.4.1. Evaluation de l'activité Antioxydante..... | 40 |
| A. Evaluation de l'activité antioxydante par (DPPH)..... | 41 |
| B. Pouvoir réducteur..... | 43 |
| C. Test de la capacité antioxydante par (CUPRAC)..... | 44 |
| D. Test du ABTS..... | 45 |
| E. Test du phénanthroline..... | 46 |
| F. Activité du piégeage du radical galvinoxyl (GOR)..... | 47 |
| I.2.4.2. Evaluation de l'activité antibactérienne..... | 48 |
| I.2.5. Analyses statistiques..... | 53 |

Chapitre II

Résultats et Discussion

| | |
|---|----|
| II.1. Criblage « Screening » phytochimique..... | 54 |
| II.2. Dosages spectrophotométrique..... | 58 |
| II.2.1. Dosage des polyphénols totaux..... | 58 |
| II.2.2. Dosage des flavonoïdes..... | 59 |
| II.3. Activités Antioxydantes..... | 62 |
| II.3.1. Activité antiradicalaire DPPH..... | 62 |

| | |
|--|----|
| II.3.2. Pouvoir réducteur (FRAP)..... | 63 |
| II.3.3. Réduction de cuivre (CUPRAC)..... | 65 |
| II.3.4. Activité du piégeage du cation radical ABTS ⁺ | 66 |
| II.3.5. Activité de phenanthroline..... | 67 |
| II.3.6. Activité du radical galvinoxyl GOR..... | 67 |
| II.4. Evaluation de l'activité antibactérienne..... | 69 |
| Conclusion et Perspectives..... | 75 |
| Références Bibliographiques. | |
| Annexes. | |
| Résumé. | |



Introduction générale

Introduction générale

La phytochimie ou chimie des végétaux est la science qui étudie la structure, le métabolisme et la fonction ainsi que les méthodes d'analyse, de purification et d'extraction des substances naturelles issues des plantes (**Kalishe, 2014**).

Depuis des milliers d'années, l'homme utilisé les plantes trouvées dans la nature pour traiter et soigner des maladies (**Sanago, 2006**). Près de 80% de la population mondiale a recours aux plantes médicinales par manque d'accès aux médicaments prescrits. Mais aussi parce que les plantes ont pu démontrer une réelle efficacité (**Benaissa, 2011**).

Les plantes médicinales constituent depuis toujours une alternative idéale à travers leurs emplois dans plusieurs secteurs y compris le domaine médical et pharmaceutique. À cet égard, plusieurs résolutions ont été adoptées afin de répondre au regain d'intérêt suscité par leurs usages et comprendre ainsi certaines propriétés préconisées par nos ancêtres (**Nostro et al, 2002; Djeridane et al, 2005**). Avec le progrès de la biochimie et l'analyse organique et pharmacologique ainsi que la physiologie végétale, un tri rationnel dans la masse des actions attribuées aux plantes a été entamé pour comprendre certaines activités tributaires aux molécules bioactives présentes dans les végétaux (**Nascimento et al, 2000**).

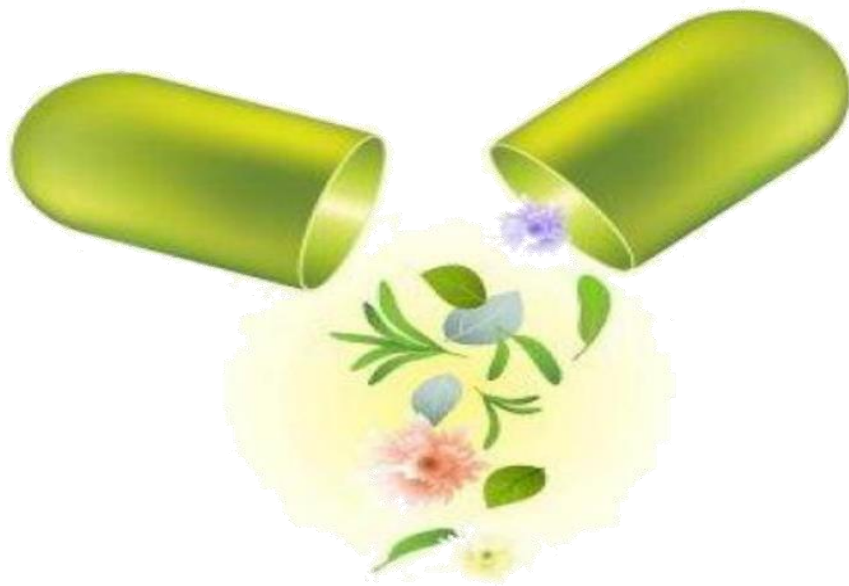
L'Algérie possède une richesse floristique considérable, ce potentiel de plantes médicinales comporte des milliers d'espèces présentant divers intérêts et constituent un axe de recherche scientifique et plus particulièrement dans le domaine des substances naturelles (**Aberkane, 2006**).

Parmi la flore Algérienne, nous nous sommes intéressés à une espèce peuplant spontanément le mont de Bouchatâta Mahmoud (Skikda est-Algérien), connu pour sa richesse floristique diversifié. Il s'agit de l'aubépine monogyne (*Crataegus monogyna* Jacq), plante médicinale appartenant à la famille des *Rosaceae*, utilisée en phytothérapie pour ses propriétés sédatives, vasculoprotectrices et antioxydantes (**Bahorun, 1997**). Les substances naturelles issues des feuilles et fleurs ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie, en alimentation et en cosmétologie, parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure des

métabolites secondaires qui sont surtout illustrés en thérapeutique (**Bahorun, 1997**). Elle est aussi utilisée comme plante ornementale (**Mohand, 2006**).

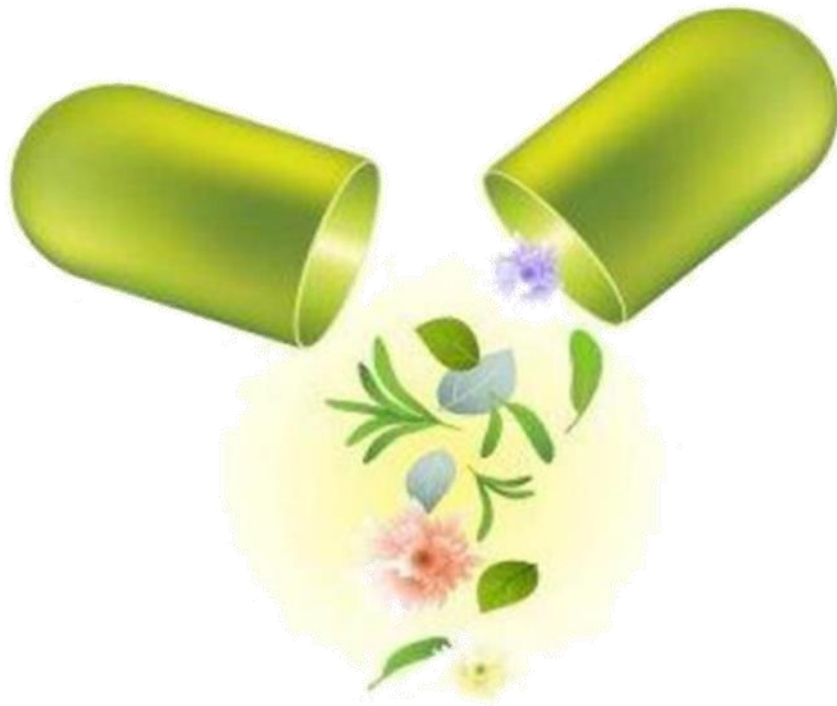
Dans ce contexte s'inscrit le présent travail de recherche dont le but principal est l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante et antibactérienne de l'extrait méthanolique préparé à partir de la partie aérienne (feuilles) de *Crataegus monogyna* Jacq. Pour cela on s'est fixé les objectifs suivants :

- ✚ Une synthèse bibliographique sur la plante étudiée, le stress oxydatif et antioxydants, et aussi la méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne (Méthode de diffusion).
- ✚ Analyse qualitative par criblage « screening » phytochimique du contenu en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins de l'extrait méthanolique de *Crataegus monogyna* Jacq.
- ✚ Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *Crataegus monogyna* Jacq.
- ✚ Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique par la méthode de diffusion en milieu solide (méthode de contact). Ce travail s'achève par une conclusion générale et perspective.



Synthèse bibliographique

Chapitre I



Présentation de Crataegus monogyna Jacq

I. Présentation de la plante *Crataegus monogyna* Jacq

I.1. Etymologie

L'Aubépine est un mot féminin qui vient du nom du latin "*alba spina*" épine blanche en raison de sa fleur blanche (du type de la rose) et des épines à la base (Zhang, 2002).

Crataegus monogyna Jacq, du grec *Krataigos* (fort, résistant; faisant allusion à la dureté de son bois) et *monogyna* (souligne la particularité de sa fleur à n'avoir qu'un seul pistil) (Aymonin, 1993; Mazzocchi et al, 1999).

I.2. Origine

Originnaire de toute l'Europe jusqu'en Afghanistan, l'Aubépine monogyne est la plante la plus commune de toutes les espèces de haie, idéale à cet égard en raison de ses rameaux denses et épineux et de sa résistance (Mitchetti, 1992; Edin et Nimmo, 1999). Elle est actuellement répandue dans toute les régions tempérées de l'hémisphère nord où elle s'installe volontiers à la lisière de boisés (Pittler et al, 2003).

I.3. Description botanique

L'Aubépine, un nom commun de toutes les espèces végétales du genre *Crataegus*, est un arbuste épineux ou petit arbre qui a des feuilles vertes claires, fleurs blanches, et baies rouges vives (Chang et al, 2002).

Elle appartient à la famille des *Rosaceae* et incluse de 150 à 1200 espèces (Yanar et al, 2011). *Crataegus monogyna* est un arbuste de 4 à 10 mètres de hauteur, à écorce lisse gris pâle, puis brune et écailleuse (Gire, 2000); encore appelée épine blanche (Mességué, 1975; Wichtl et Anton, 2003); sa longévité peut atteindre 500 ans (Rameau, 1989).

Crataegus monogyna sont les plus utilisées dans la médecine traditionnelle (Svedstrom et al, 2002; Yao et al, 2008; Liu et al, 2010; Silva da Costa, 2011).



Figure 01: Présentation de l'arbuste de *Crataegus monogyna* Jacq. (Anonyme 01)

Les feuilles d'un vert brillant ont 5 à 7 lobes aigus été cartés. Les fruits (cenelles) ovoïdes (de 8 à 10 mm), ont une chaire farineuse et douceâtre; ils renferment une seule graine, lisse et luisante. Ils prennent une couleur rouges ombre à maturité(en Septembre). Les Fruits sont des baie non toxique (Mességué, 1975; Chang *et al*, 2000).

Les fleurs, très abondantes en mai, blanches, ont une odeur vive plutôt désagréable (Bruneton, 1993; Chevalier et Crouzet-Segarra, 2004).

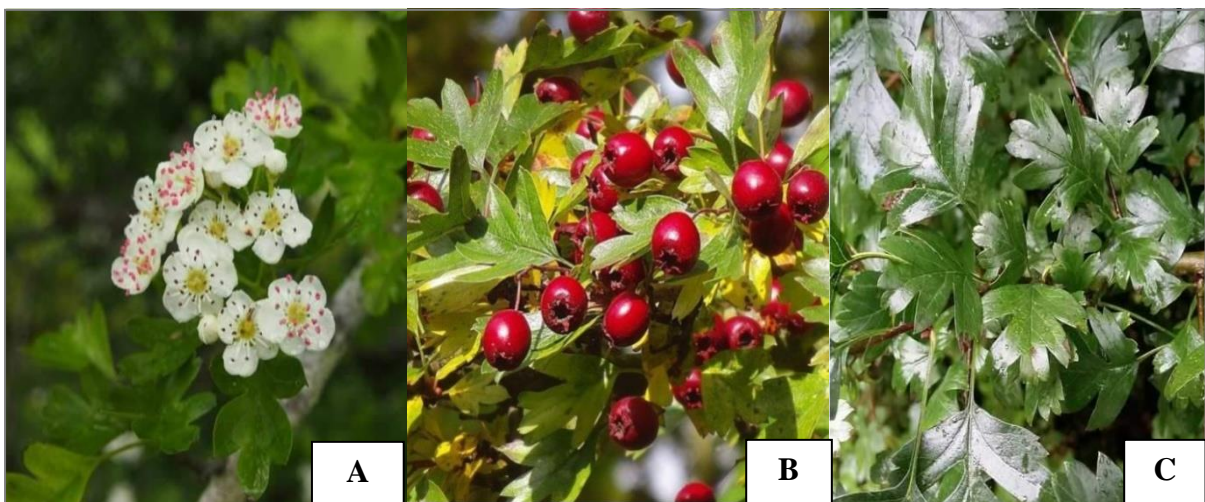


Figure 02: A: Fleurs, B: Fruits et C: Feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq.
(Anonyme 02)

I.4. Dénominations vernaculaires

Plusieurs noms vernaculaires ont été attribués à l'Aubépine dans différents pays du monde et parfois même eu sein de la même région.

Tableau 01: Noms vernaculaires.

| Langue | Nom vernaculaire | Références |
|----------|--|--|
| Arabe | Zaarour Berri, Admam, Boumekhri, baba aajina | (Djerroumi et Nacef, 2004) |
| Berbère | Idhmim, atelmen, Zaarour | |
| Français | -Épine blanche, Épine de mai, Valériane du cœur, Senellier -Aubépine monogyne, albépine, noble Épine, Cennelier | (Fabre <i>et al</i> , 1992) (Zhang, 2002) |
| Indien | Vansaangli | (Kashyap <i>et al</i> , 2012) |
| Anglais | Hawthorn, Quickthorn | (Zhang, 2002) |

I.5. Exigences climatiques

L'Aubépine monogyne s'accommode à tous les terrains, mais elle préfère les sols calcaires (riche en calcium) et se satisfait des plus secs. Cette espèce préfère les emplacements ensoleillés, à terre légère qui ne contient pas beaucoup d'argile, elle peut se développer dans les sols acides, neutres et même alcalins (Aymonin, 1993). Elle supportant aussi le froid (Williams et Bruxton, 1986).

I.6. Position dans la systématique

La classification de *Crataegus monogyna* Jacq, est la suivante :

I.6.1. Selon la classification des plantes à fleurs de Cronquist (1981)

Selon **Arthur Cronquist**, (1981). La classification classique des angiospermes est comme suit :

- **Embranchement** : Spermaphytes.
- **Classe** : Magnoliopsida.
- **Sous/classe** : Rosidae.
- **Ordre** : Rosales.
- **Famille** : Rosaceae.
- **Genre** : *Crataegus*.
- **Espèce** : *Crataegus monogyna* Jacq.

I.6.2. Place du taxon dans la classification APG II (2003)

Selon la classification botanique des angiospermes (phylogénétique) établie par APG II, est la suivante :

- **Embranchement** : Spermatophyta.
- **Sous embranchement** : Anthophytina.
- **Classe** : Tricolpées évoluées.
- **Sous classe** : Rosidae.
- **Super ordre** : Eurosidées I.
- **Ordre** : Rosales.
- **Famille** : Rosaceae.
- **Genre** : *Crataegus*.
- **Espèce** : *Crataegus monogyna* Jacq.

I.6.3. Place du taxon dans la classification APG III (2009)

La classification APG III est une classification phylogénétique, considérée comme la troisième version de la classification botanique des angiospermes établie par l'Angiosperme Phylogeny Group III. C'est la classification botanique la plus importante aujourd'hui. Cette

classification est construite sur la base de deux gènes chloroplastiques et un gène nucléaire de ribosome.

- **Cladus** : Angiospermes.
 - **Cladus** : Dicotylédones Vraies.
 - **Cladus** : Dicotylédones Vraies Supérieures.
 - **Cladus** : Rosidées.
 - **Cladus** : Fabidées.
 - **Ordre** : Rosales.
 - **Famille** : Rosaceae.
 - **Genre** : *Crataegus*.
 - **Espèce** : *Crataegus monogyna* Jacq.
- 2- Variété : *maritima*. {

1- Variété : *laciniata*.

3- Variété : *monogyna*.

Cladus : Catégorie taxonomique utilisé en 1868 par **Haeckel**

I.7. Aires de répartition

Dans le monde, *Crataegus monogyna* occupe une aire très vaste comprenant toute l'Europe, l'Afrique du Nord et l'Asie occidentale jusqu'à l'Inde, et se trouve dans toute la France surtout le Midi (sud de la France) (**Aymonin, 1993; Brosse, 2000; Koyuncu et al, 2007**).

C'est une espèce euro-méditerranéenne, elle est présente et spontanée dans les pays du Maghreb, en Algérie et au Maroc où elle est commune, en Tunisie ainsi que dans tous les pays d'Europe notamment en France et en Asie occidentale; elle est naturalisée en Amérique du nord. Elle pousse sur tous les terrains, de préférence dans les haies et les bois, jusqu'à 1600 mètres d'altitude. Elle est originaire de toute l'Europe jusqu'en Afghanistan et l'Inde (**Mitchetti, 1992; Edin & Nimmo, 1999**), en Asie septentrionale, elle est commune dans les bois clairs et les forêts de chênes (**Paul, 2006**).

En Algérie, elle est commune dans tout le pays, sauf sur les hauts plateaux; elle est commune dans les forêts et les maquis de l'Atlas Tallien, elle peut être confondue avec d'autres espèces (**Farhat, 2007**).

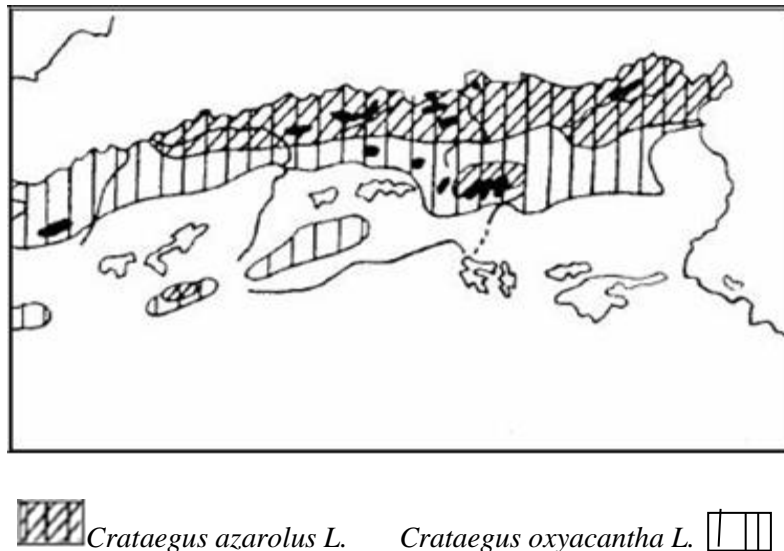


Figure 03: Répartition des espèces du *Crataegus* en Algérie (Quezel et Santa, 1962).

I.8. Chimie de la plante

Des études réalisées par différents chercheurs montrent que l'Aubépine est une source riche en plusieurs éléments important, ayant un effet positif sur la santé.

I.8.1 Composition en métabolites primaires

Crataegus monogyna Jacq contient des fractions protéiques et lipidique (dans 100 g de matière sèche) (Herrara, 1984); des glucides (Saadoudi, 2008), des vitamines et des minéraux (Boudraa, 2008).

I.8.2. Composition en métabolites secondaires

Le *Crataegus monogyna* Jacq ont de nombreux composés de métabolites secondaires (Garcia et al, 1997; Bruneton, 1999; Chang et al, 2002; Degenring et al, 2003; Urbonaviciuté et al, 2006; Svedstroma et al, 2006; Bouzid, 2009; Dineshet al, 2012) ont décelés les constituants suivants :

- ✚ **Acides phénoliques (1-2%):** acide chlorogénique, acide caféique, Hyperoside (Dineshet al, 2012).
- ✚ **Flavonoïdes (2-3%):** Vitexin, Quercétine, Vitexine-2 rhamnoside, proanthocyanidine, Anthocyanine, Epicatechine et A pigenin-6,8-di-C glycoside.
- ✚ **Tanins, Saponines et l'Amygdaline** (Chang et al, 2002; Verma et al, 2007; Altinterim, 2012; Kumar et al, 2012).

✚ Coumarines, Triterpènes, acides triterpéniques et Huiles essentielle (Bouزيد, 2009).

I.9. Utilisation

Les nombreuses qualités technologiques du frêne font de son bois un produit très adulé. Il est très résistant, se rétracte peu et se prête bien au façonnage manuel ou mécanique. En aménagement intérieur ses abondantes régénérations naturelles, son fort potentiel de croissance et sa qualité font de cette plante une essence sylvicole importante en forêt. Le frêne contribue à la stabilisation de pentes menacées par des mouvements de terrain. Son réseau racinaire étendu et dense fixe les talus de rives et permet ainsi d'éviter qu'elles ne soient érodées et emportées par l'eau (Percivala et al, 2006). On les utilise en infusion comme préparation laxative et diurétique (Mességué, 1975; Djerroumi et Nacef, 2004).

I.10. Données pharmacologiques

Crataegus monogyna Jacq est une plante couramment utilisée en phytothérapie et inscrite à la pharmacopée française pour ses propriétés sédatives, vasculoprotectrices et antioxydantes (Bahorun, 1997). Soutenir aussi le système immunitaire (Lakshmi et al, 2012).

La partie aérienne utilisée est la feuille grâce sa teneur élevée en composés actifs, flavonoïdes, coumarines, tanins (Bruneton, 1999; Bézanger-Beauquesne et al, 1990).

Bien que traditionnellement, les fruits de l'aubépine fussent employés pour le traitement des troubles cardiaques d'origine nerveuse, les extraits actuels sont presque exclusivement préparés avec les feuilles et les fleurs de l'arbuste (Degenring et al, 2003).

Les sommités fleuries ont une action sédative sur le système nerveux et une action régulatrice sur le système cardio-vasculaire; elles corrigent les troubles du rythme cardiaque; elles sont hypotensives efficaces dans le traitement des insuffisances cardiaques de stade I et II (Zapfe, 2001; Pittler et al, 2003; Schroder et al, 2003), et antispasmodiques au niveau des muscles lisses vasculaires. Ces actions neurosedatives, cardiosedatives, vasodilatatrices et antispasmodiques peuvent être utilisées dans les insomnies, le nervosisme, l'émotivité et le surmenage (Girre, 2000; Veveris et al, 2004; Cuit, 2006). Les fruits sont légèrement astringents et s'emploient en gargarisme contre les maux de gorge (Beloued, 1998).

Les décoctions des feuilles et des fruits de *Crataegus* sont utilisées pour traiter les maladies cardiovasculaires, le diabète, le cancer et l'impuissance sexuelle dans la médecine arabe traditionnelle (Ljubuneire et al, 2005).

L'activité antioxydante, antiinflammatoire, hypotensive des extraits alcooliques de l'Aubépine (fruits, fleurs et feuilles) a été prouvée «*in vitro*» (**Bahorun et al, 1996; Fong et Bauman, 2002; Maria et al, 2005**). Des études réalisées «*in vitro*» ont démontré que les extraits à base de procyanidines de l'Aubépine aident à réduire le niveau du cholestérol et à diminuer le taux des triglycérides (**Chang et al, 2002; Zhang et al, 2006; Svedstroma et al, 2006**).

Des expériences réalisées «*in vivo*» par **Zhang** et ses collaborateurs (**2004**) ont démontré que l'administration de l'extrait obtenu à partir de la partie charnue des fruits du genre *Crataegus* augmente la concentration du α Tocophérol et inhibe l'oxydation des LDL (Low Density Lipoprotein) humains.

Les acides phénoliques de l'Aubépine ; acide crategique, acide chlorogénique, acide tartrique et l'acide triterpénique augmentent et favorisent l'écoulement du sang. L'acide citrique équilibre les niveaux de l'acidité du corps, et favorise la fonction digestive en augmentant la production de la bile (**Davie, 2000**) et aussi est un bon remède pour les douleurs de l'appareil urinaire (**Rose et Treadway, 1999**).

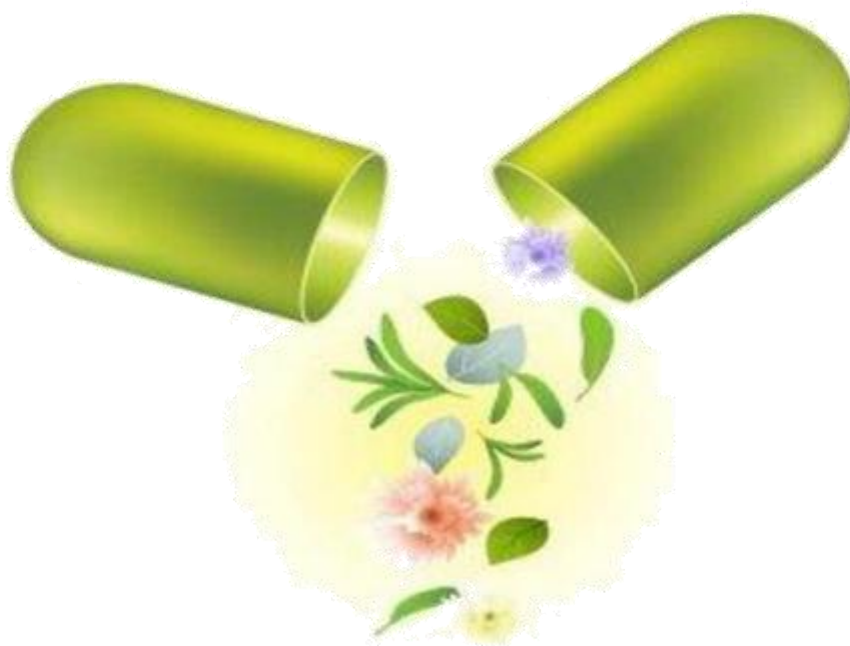
En Europe, l'Aubépine a un usage interne contre la tachycardie (**Garcia et al, 1997; Sparska et Martin, 1999**). Cette plante a également des propriétés anti protozoaires (*Trichomonas vaginalis*) (**Girre, 2000**).

I.12. Toxicité

Chez l'homme, de trop fortes doses provoquent des troubles cardiaques, respiratoires (dépression), des troubles digestifs bénins et de légères allergies cutanées. Une consommation excessive de fruits par de jeunes enfants pourrait produire une hypotension sévère. D'autre part, il s'agit d'une plante allergisante par son pollen (**Girre, 2000**).

Des recherches semblent prouver que et un ralentissement du pouls (**Pierre, 2004**). Graham(1940) signale aussi une atténuation du tonus intestinal et même en cas d'intoxication chronique, la nécrose du foie. Les doses médicinales habituelles ne présentent pas ces dangers, mais il est bon dans les cures l'aubépine à des doses élevées, exerce une action néfaste sur le dynamisme du cœur, entraîne l'hypotension prolongées de prévoir des intervalles réguliers de repos (**Pierre, 2004**).

Chapitre II



Stress oxydant

Introduction

L'oxygène de l'air ambiant est essentiel à la vie des êtres vivants. Paradoxalement, en trop grande concentration, l' O_2 peut engendrer du stress oxydatif (SO) en augmentant la production de radicaux libres (RL) et d'espèces oxygénées activées (EOA), ce qui endommage les membranes cellulaires. Cette augmentation de RL très réactifs est arrêtée par la synthèse de plusieurs molécules antioxydantes endogènes, assurant ainsi un système de défense pour l'organisme. Lorsque la production des RL et (EOA) s'accroît en proportion plus grande que la synthèse d'antioxydants, l'organisme s'expose à un état de SO. Le SO est néfaste pour l'organisme, il est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies (Sana, 2010).

En 1969, les Américains McCord, et Fridovich, isolent à partir de globules rouges humains, un système enzymatique antioxydant, le superoxyde dismutase (SOD), capable d'éliminer l'anion superoxyde, démontrant ainsi pour la première fois, que notre organisme produit des EOA. Cette découverte a été le point de départ, dans le monde entier, de nombreuses recherches sur le stress oxydant et les antioxydants (Haleng, 2007).

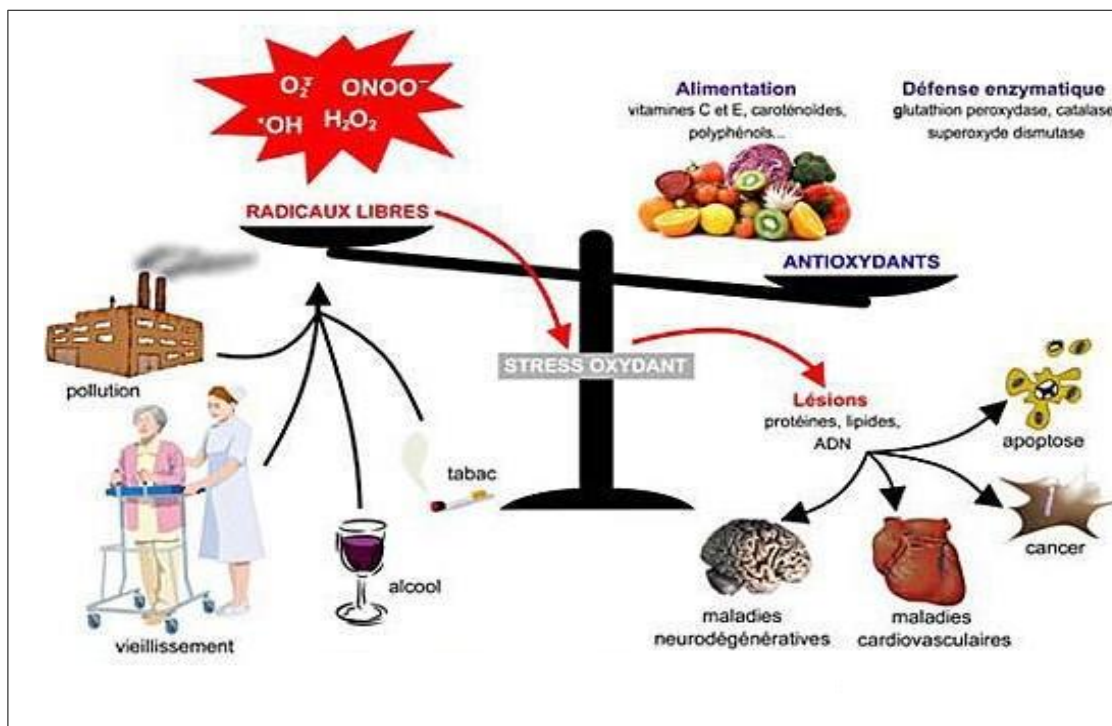


Figure 04: Stress oxydant (Durackova, 2008).

II.1. Stress oxydant

Le stress oxydant est un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydants d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire. Cette situation peut être due à une diminution des défenses antioxydants ou à une augmentation de production des radicaux libres (**Orban, 2010**).

II.2. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique (**Delattre et al, 2005**). Les espèces dites oxydantes peuvent être arbitrairement classées en espèces activées de l'oxygène et en espèces composées d'oxygène et d'azote ou de chlore (**Vamecq et al, 2004**). Les sources principales de ces radicaux libres sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 02: Principales sources des radicaux libres (endogènes et exogènes) (**Delattre et al, 2005**).

| Sources des radicaux libres | |
|---|---|
| Endogènes | Exogènes |
| <ul style="list-style-type: none"> - NADPH oxydase - Chaîne respiratoire mitochondriale - Peroxysomes - Cytochromes P450 - Xanthine oxydase - Cyclo-oxygénases - Lipo-oxygénases | <ul style="list-style-type: none"> - Toxiques environnementaux - Radiations ionisantes - Radiations UV - Champ électrique - Xénobiotiques pro-oxydants - Cytokines pro-inflammatoires |

II.3. Origine de stress oxydant

Les agents responsables du stress oxydant font partie de la famille des espèces de l'oxygène (ERO).

II.3.1. Espèces réactives d'oxygène (ERO)

Ces organismes utilisent l'oxygène pour oxyder les substances riches en carbone et en hydrogène. Cependant, quand on oxyde les molécules avec oxygène, ce dernier forme des intermédiaires radicalaires, très réactifs connus sous le nom espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces ERO comprennent des espèces radicalaires et espèces non radicalaires.

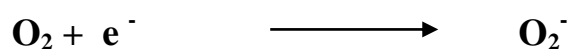
Tableau 03: Espèces réactives de l'oxygène radicalaire et non radicalaire (Halliwell, 2006).

| ERO (radicalaire) | ERO (non radicalaire) |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - Oxygène moléculaire - Dioxygène singulet - Anion superoxyde - Radical hydroxyle - Radical hydroperoxyde - Radical peroxyde - Radical alkoxyde - Radical oxyde nitrique - Peroxinitrite | <ul style="list-style-type: none"> - Hydroperoxyde - Hypochlorite - Ozone - Peroxyde d'hydrogène |

II.4. Principaux types des espèces réactives d'oxygène (ERO)

II.4.1. Anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$)

La source principale de la production de l'anion superoxyde est la chaîne respiratoire mitochondriale. Il résulte de l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire qui est catalysée par le cytochrome oxydase (Ait Yahia, 2014).

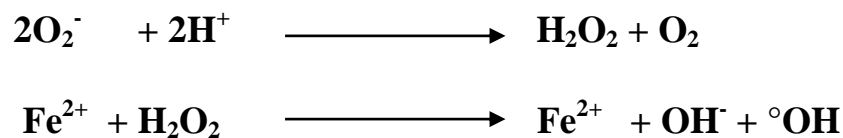


II.4.2. Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) est également un agent oxydant très réactif ; c'est pour cela qu'on l'utilise souvent comme désinfectant et comme agent de blanchiment. S'il n'est pas rapidement détruit, il peut se décomposer et produire des radicaux hydroxyles qui s'attaquent aux macromolécules de la cellule (**karp, 2010**).

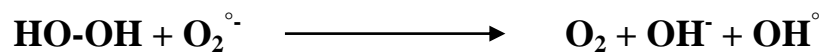
La combinaison de l'anion superoxyde avec deux protons (H⁺) conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Le H₂O₂ n'est pas un radical libre mais une molécule avec tous ces électrons appariés qui présente une toxicité par l'intermédiaire des réactions de type fenton (présence de cations métalliques comme Fe²⁺ ou Cu²⁺) (**wardman et candeias, 1996**).



II.4.3. Radical hydroxyle (OH[°])

Le radical hydroxyle (OH[°]) est très réactif, il se forme soit par dégradation du peroxyde d'hydrogène en présence de métaux de transition sous leur forme réduite, ou par son action avec le radical superoxyde selon la réaction de Haber Weiss (**Ait Yahia, 2014**).



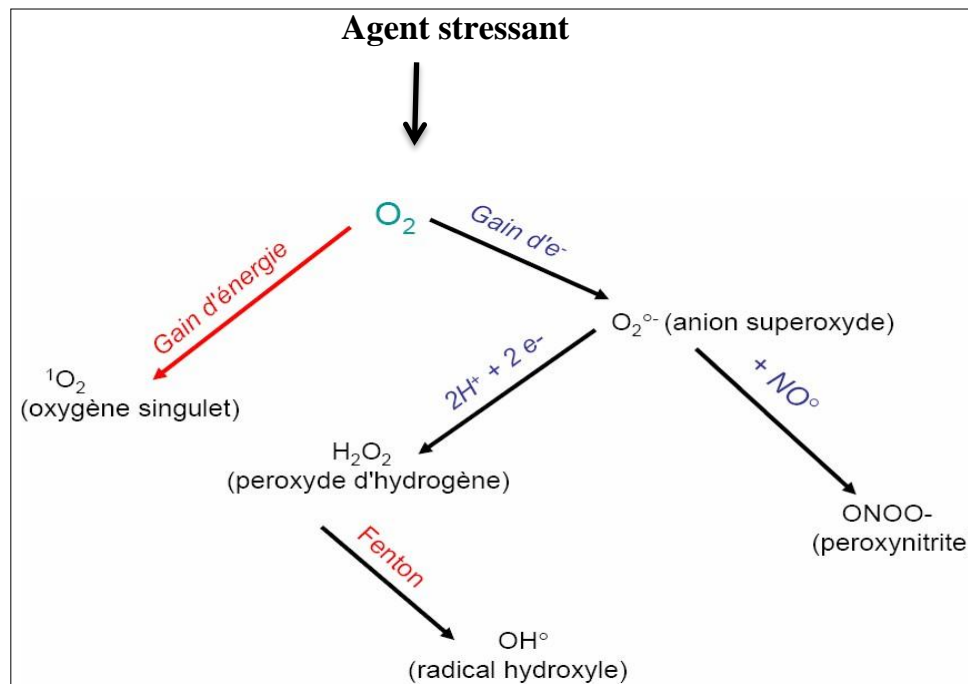


Figure 05: Schéma modifié de l'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003).

II.5. Cibles biologiques du stress oxydant

Le stress oxydant va dénaturer les lipides, les protéines, l'ADN et provoquer des pathologies (Gutteridge, 1992; Curtin et al, 2002).

II.5.1. Lipides

Les lipides sont la cible privilégiée des ERO: le radical hydroxyle instable réagit avec les lipides constitués d'acides gras polyinsaturés pour former un radical peroxyde (ROO^\cdot), suffisamment réactif pour déclencher une réaction en chaîne sur les acides gras voisins : c'est la lipo-péroxydation des membranes cellulaires. Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire. Cette réaction provoque aussi la dissociation des lipoprotéines à faible densité du sang et provoque un dépôt de lipides oxydés dans les vaisseaux sanguins ou athérosclérose (Stomper et al, 1993; Tsimikas et al, 2005).

II.5.2. Protéines

Les acides aminés: l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine sont particulièrement visées par les radicaux libres. Leurs oxydation ont pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes, ce qui entraîne des modifications fonctionnelles importantes telles que la non reconnaissance d'un récepteur par un ligand et la perte d'activité enzymatique (**Delattre et al, 2005**). Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire comme dans le cas de la maladie de Parkinson ou Alzheimer (**Beal, 1995**).

II.5.3. Acides nucléiques(ADN)

L'acide désoxyribonucléique est très sensible à l'attaque des ERO. La guanine peut réagir avec le OH^\bullet pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8OH-dG), entraînant des mutations au sein de l'ADN impliquées dans le déclenchement du cancer (**Palmer, 1997; Cadenas et al, 2000; Valko et al, 2006**) et le vieillissement.

II.5.4. Glucides

Les glucides peuvent subir des anomalies de glycation et induire un diabète (**Chugh et al, 1999; Selvaraj et al, 2006**).

II.6. Antioxydants

Les antioxydants sont toutes substances capables de prévenir ou retarder l'oxydation d'autres molécules (**Orban, 2010**). On peut diviser les molécules antioxydants en deux catégories distinctes. Celles provenant d'une source endogène, produites directement par le corps humain et celles provenant d'une source exogène, apportées par l'alimentation.

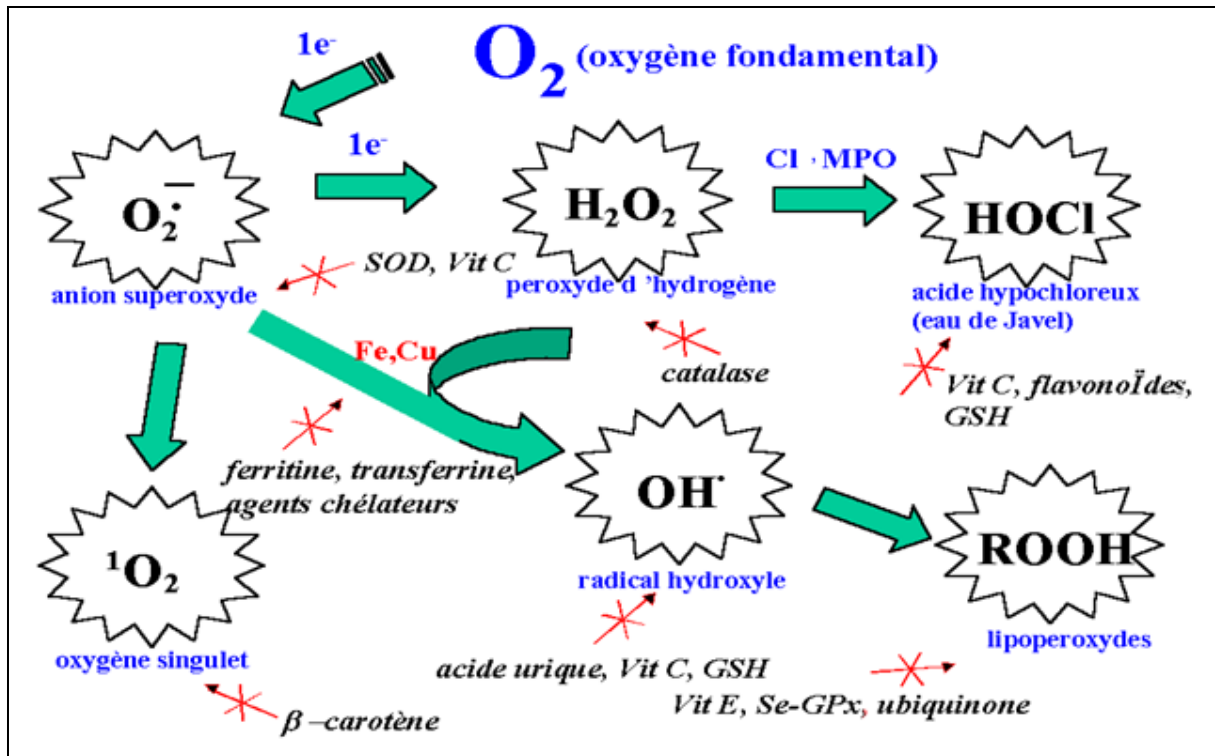


Figure 06: Espèces réactives oxygénées et systèmes de protection antioxydants

(Pincemail et al, 1999).

GSH: glutathion, Cl^- : anion chlorure, MPO: myéloperoxydase, SOD: superoxyde dismutase, Se-GPx: glutathion peroxydase séléno-dépendante.

II.6.1. Systèmes de défenses antioxydants

Les antioxydants peuvent être des enzymes ou de simples molécules. Certains sont produits par l'organisme, ce sont les antioxydants endogènes, ou proviennent de l'alimentation ou la médication, et sont donc exogènes (Benaissa, 2012).

II.6.1.1. Systèmes antioxydants endogènes

L'organisme a développé des systèmes de défense très efficace contre la production des radicaux libres dérivés de l'oxygène (Delattre et al, 2005).

II.6.1.1.1. Systèmes de défense enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques représentent la composante la plus importante des systèmes de défenses cellulaires contre les attaques oxydatives.

A. Superoxydes dismutase (SOD)

Les superoxydes dismutases (SOD) sont une classe d'enzymes apparentées qui catalysent la dégradation de l'anion superoxyde en O_2 et H_2O_2 .

Il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (**Zelko et al, 2002**).

B. Glutathion S- transférase (GST)

GST est un système très important dans la protection de la cellule contre les ERO par sa capacité de conjuguer le glutathion avec les composés électrophiles et la réaction des peroxydes (**Zhuhua et al, 2004**).

C. Système thiorédoxine

Cet enzyme joue un rôle protecteur contre une grande variété de stress oxydants grâce à ses propriétés de capture des radicaux libres. Des données biochimiques montrent que les thiorédoxines réduisent des protéines clés pour le développement, la division cellulaire ou la réponse au stress oxydant (**Reichheld et al, 2005**).

II.6.1.1.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

Les principaux systèmes antioxydants non enzymatiques présents dans l'organisme humain comprennent le glutathion (un tripeptide à pouvoir réducteur), bilirubine (capable de piéger des radicaux peroxy et l'oxygène singulet), les hormones sexuelles (œstrogènes capables d'inhiber la peroxydation lipidique), l'acide urique (un piègeur puissant de radicaux $\cdot OH$, $RO_2\cdot$, d'oxygène singulet et de $NO_2\cdot$), le coenzyme Q10 (un puissant inhibiteur de peroxydation lipidique, en synergie avec la vitamine E) (**Delattre et al, 2005; Haleng et al, 2007**).

II.6.1.2. Systèmes antioxydants exogène

La composition de notre alimentation joue un rôle primordial dans notre capacité à nous défendre contre la production non contrôlée des espèces radicalaires de l'oxygène. Les principaux antioxydants d'origine nutritionnelle sont (**Delattre et al, 2005; Haleng et al, 2007**).

A. Vitamine E

La forme naturelle de la vitamine E inclut quatre tocophérols isomères α , β , γ , δ , avec une activité antioxydante variable. L' α -tocophérol est la forme la plus active de la classe des tocophérols. Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' α -tocophérol, connu comme inhibiteur de la propagation de la peroxydation lipidique, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO₂ (Singh et al, 2005).

B. Vitamine C

Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle prend une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée (Singh et al, 2005).

C. Oligoéléments

Les oligoéléments interviennent comme cofacteurs d'enzymes indispensables dans la lutte contre les radicaux libres. Parmi ces oligo-éléments on cite ; le zinc, le sélénium et le manganèse (Pastre, 2005).

D. Polyphénols

Les polyphénols possèdent des propriétés antioxydantes. Effectivement, il a été démontré qu'ils inhiberaient ou préviendraient la peroxydation lipidique et notamment la formation des Low Density Lipoprotein (LDL) oxydés (Osakabe et al, 2001; Schroeter et al, 2002; Valko et al, 2006; Wu et al, 2009; Yoshihara et al, 2010). Les polyphénols présentent également un effet protecteur vis-à-vis de certaines pathologies cardiovasculaires ou de cancers (Damianaki et al, 2000; Valko et al, 2006; Yoshihara et al, 2010; Ding et al, 2013).

II.7. Implications pathologiques du stress oxydatif

Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreuses pathologies (Figure 07) comme facteur déclenchant ou associé à des complications (Favier, 2003). Il peut être associé à l'athérosclérose, l'arthrite, l'hépatite, l'attaque cardiaque, les traumatismes, les accidents vasculaires cérébraux, les dermatites, les cancers (Cohen et al, 2000; Packer et Weber, 2001). Néanmoins, la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec

l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des radicaux (**Favier, 2003**).

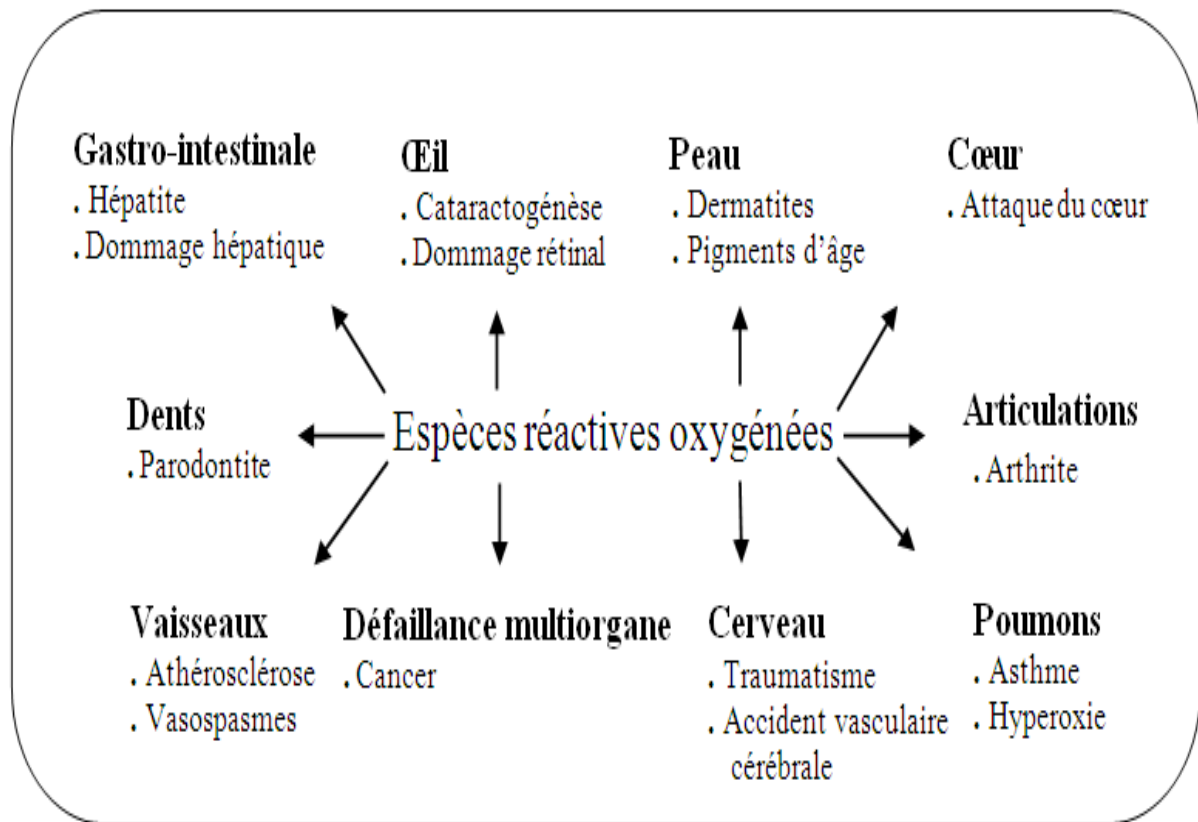
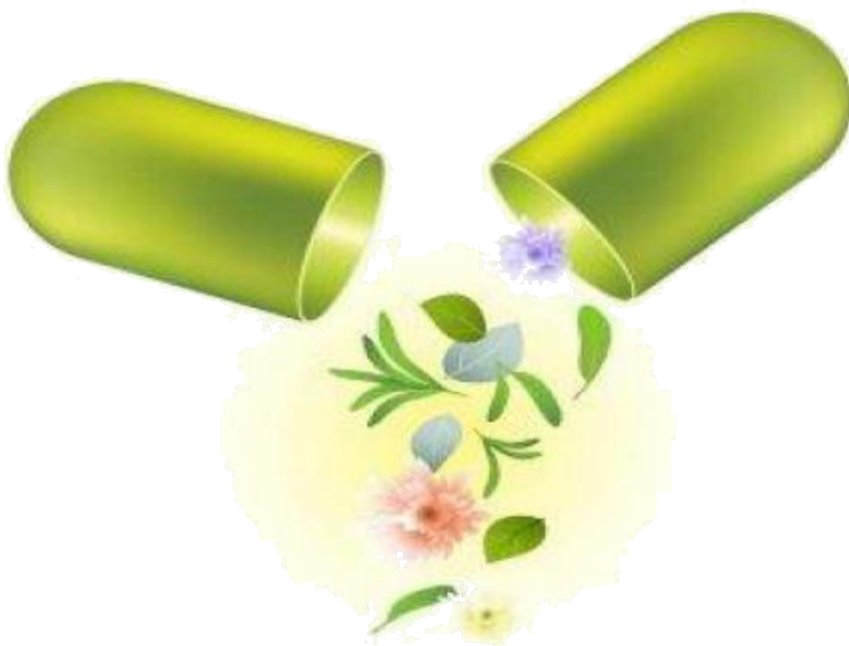


Figure 07: Les pathologies associées aux espèces réactives oxygénées (**Lee et al, 2004**).

Chapitre III



Activité antibactérienne

Introduction

L'homme a de tout ère, cherché et exploité des panacées à base de plante susceptibles d'opérer des modifications une fois employées (**Zouhdi et al, 1997**). Leurs mérites sont attribués entre autre à des nutriments ou phytonutriments dotés de plusieurs propriétés biologiques et pharmacologiques bénéfiques (**Cowan, 1999; Ferreira de Lima et al, 2006**).

Bien que les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité (**Bahorun, 1997**).

Les recherches actuelles sur les molécules antimicrobiennes d'origine naturelle se concentrent principalement sur les plantes, car ils peuvent être achetés plus facilement et seront sélectionnés sur la base de leur utilisation en médecine traditionnelle (**Yano et al, 2006**).

De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche portent sur les propriétés antimicrobiennes des plantes médicinales (**Flamini et al, 1999; Marino et al, 1999; Cox et al, 2000; Dorman et al, 2000**). Et aussi ouvert une porte à de nouveaux débouchés sur les remèdes dérivants des plantes (**Papadopoulou et al, 2004; Al-Fatimi et al, 2007**).

III.1. Etude de l'activité antibactérienne *in vitro*

Les bactéries sont des organismes vivants qui ne sont constitués que d'une seule cellule : on dit qu'ils sont unicellulaires. Dotés d'une membrane cellulaire et d'un matériel génétique (ADN), les bactéries sont capables d'assumer les fonctions élémentaires propres au vivant : se reproduire, transmettre l'information génétique, mais aussi tirer matière et énergie de l'environnement. Elles possèdent une certaine autonomie et un métabolisme propre (Nauciel, 2005).

Les bactéries nocives peuvent être combattues par les antibiotiques. Ce sont souvent des molécules synthétiques qui vont détruire ou bloquer la croissance des bactéries. Ils agissent de manière spécifique sur celles-ci, en bloquant la synthèse de la paroi de la cellule ou en inhibant leur métabolisme. L'avantage de ce traitement est qu'il est suffisamment sélectif pour ne viser que les bactéries : il n'aura donc aucun impact (sauf exception) sur les cellules du patient traité (Elghozi et Duval, 1992).

III.1.1. Les techniques d'évaluation de l'activité antibactérienne

A. Méthode de diffusion en milieu gélosé

Les dilutions d'antibiotique sont incorporées dans une gélose de Mueller-Hinton coulée en boîte de Pétri. Chaque boîte contient une concentration d'antibiotique différente. La surface de la gélose estensemencée par des stries de suspension de bactéries. Une dizaine de souches peuvent être testées sur une boîte.

La méthode de diffusion en milieu gélosé ainsi permet de prévoir avec certitude l'efficacité «*in vitro*» d'extrait méthanolique, il s'agit en fait d'une appréciation qualitative de l'activité. L'aspect quantitatif sera ensuite estimé par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

La sensibilité d'un germe est nulle pour un diamètre inférieur ou égale à 8 mm. La sensibilité est limitée pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm. Elle est moyenne pour un diamètre entre 14 et 20 mm. Pour un diamètre supérieur ou égale à 20 mm le germe est très sensible (Duraffourd et al, 1990).

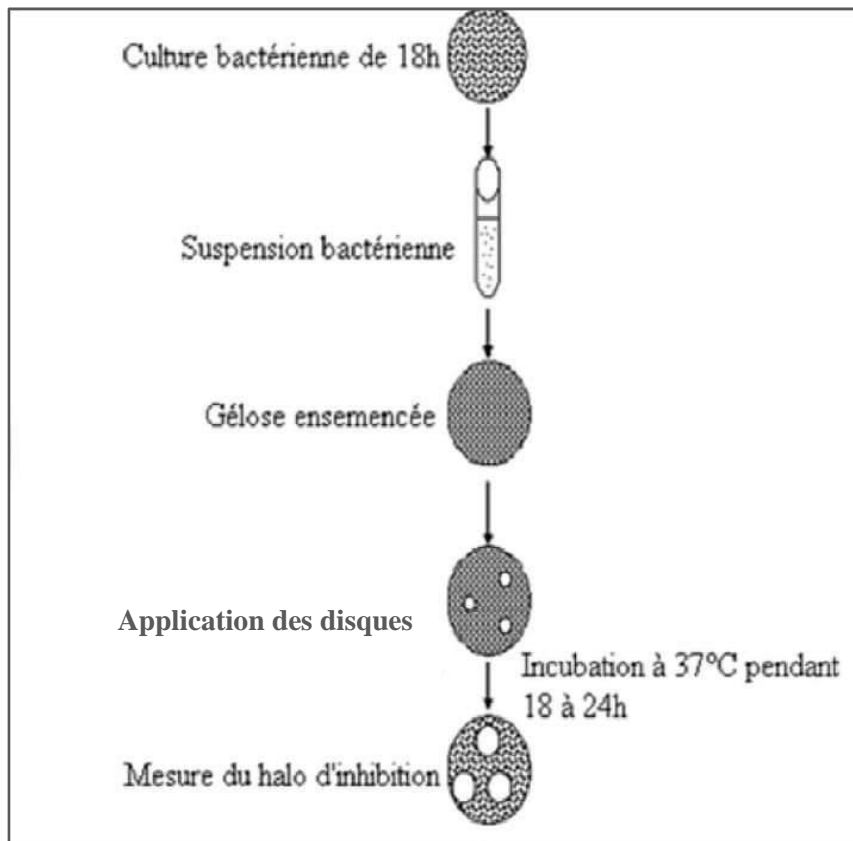


Figure 08: Méthode de diffusion en milieu gélosé

(Duraffourd *et al*, 1990).

B. Méthode de dilution en milieu liquide En milieu liquide

La croissance bactérienne se visualise par un trouble ou un culot bactérien. On réalise une gamme d'antibiotique de concentrations décroissantes par dilutions successives.

C. Méthode E-test

Une bandelette est imprégnée de quantités croissantes d'antibiotique. Elle est placée sur une gélose pour antibiogramme ensemencée classiquement. L'antibiotique diffuse en formant un gradient de concentration: la zone d'inhibition a la forme d'une ellipse et la lecture est alors directe sur la bandelette là où celle-ci rencontre la zone d'inhibition. Au point d'intersection entre la zone d'inhibition et la bandelette, la concentration en antibiotique correspond à la CMI de la souche étudiée.

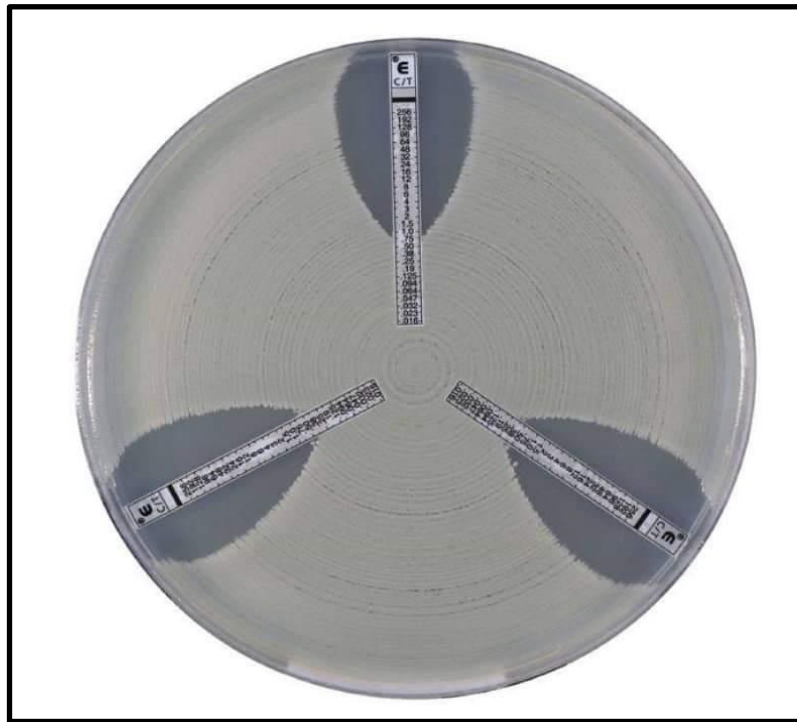


Figure 09: Méthode E-test. (Anonyme 03)

d. Effet bactéricide

L'effet bactéricide Consiste en la destruction d'une partie de la population d'une souche bactérienne, pour tester le pouvoir bactéricide d'un antibiotique sur la souche isolée il faut déterminer la concentration minimale bactéricide (CMB) (cette concentration est toujours supérieure à la CMI) (Caron, 2012).

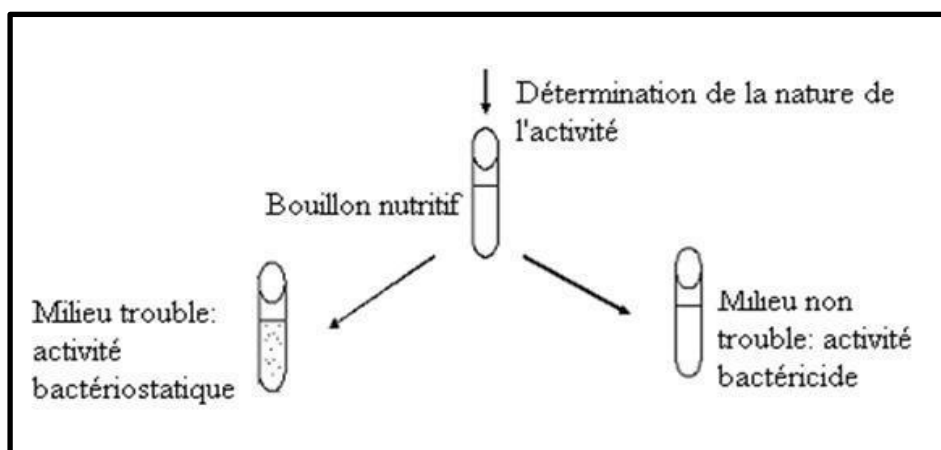


Figure 10: Détermination de l'activité bactériostatique et bactéricide

(Duraffourd et al, 1990).

III.2. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées

III.2.1. Les bactéries à Gram positif

A. *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif qui tendent à se regrouper en amas. L'espèce, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), aussi appelé le Staphylocoque doré, tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales (Nauciel et Vildé, 2005).

Staphylococcus aureus est l'espèce majeure, qui peut être d'origine humaine, animale (volaille, bovin, ovin, caprin...), environnementale ou non spécifique (Delarras, 2007).



Figure 11: Colonies de *S.aureus* après coloration de Gram sous microscope électronique (Yves and Michel 2009).

Habitat

Les staphylocoques sont des germes ubiquistes qui peuvent vivre :

- ❖ En bactéries saprophytes dans la nature (sols, air, eaux..).
- ❖ En bactéries commensales sur la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux (mammifères) (Delarras, 2007).

Chez l'homme, environ un tiers des sujets sont des porteurs sains qui hébergent la bactérie au niveau des muqueuses (principalement les fosses nasales) et des zones cutanées humides (périnée, aisselles) (Nauciel et Vildé, 2005).

- ❖ En bactéries pathogènes, agents responsables d'infections humaines ou animales qui peuvent être redoutables (Delarras, 2007).

Cette bactérie peut survivre longtemps dans l'environnement (Werckenthin et al, 2001).

✚ Pouvoir pathogène

S. aureus, une bactérie à coagulase positive, est fréquemment rencontrée chez l'homme. Elle peut être responsable d'infections cutanées (impétigo, furoncles...), infections de la sphère ORL (sinusites, otites...), infections septicémiques redoutables, d'infections nosocomiales, ainsi que les intoxications alimentaires individuelles ou collectives (Delarras, 2007).

B. *Streptococcus sp*

Les bactéries des genres *Streptococcus* et *Enterococcus* sont des cocci à Gram positif, catalase négative, à métabolisme anaérobie. Le genre *streptococcus* rassemble les streptocoques sensu stricto et le pneumocoque. Le genre *enterococcus* regroupe les streptocoques du groupe D, sauf *Streptococcus bovis* (Bactériologie, 2003).

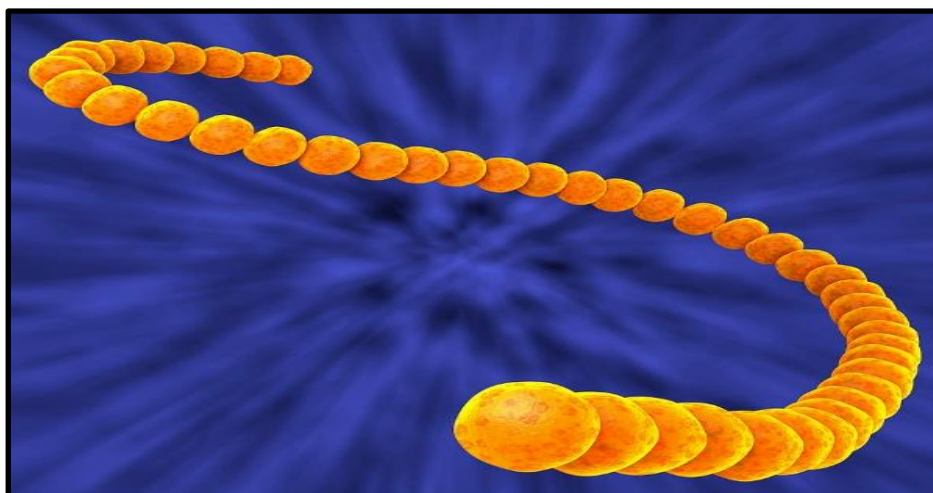


Figure 12: Bactéries *Streptococcus*. (Anonyme 04)

Habitat

Les streptocoques regroupent de nombreuses espèces. Certaines sont des parasites de l'espèce humaine (streptocoques des groupes A, C et G de LANCEFIELD), d'autres des commensaux de la muqueuse buccale (streptocoques du groupe B et streptocoques non groupables et non hémolytiques) ou de la muqueuse génitale (groupe B) ou de l'intestin (anciens streptocoques du groupe D ou entérocoques considérés maintenant comme faisant partie d'un genre à part, le genre enterococcus). D'autres encore sont des commensaux des animaux ou des saprophytes (**Bactériologie, 2003**).

Pouvoir pathogène

Les streptocoques sont, après les staphylocoques, les bactéries pyogènes n° 2. Le plus pathogène d'entre eux est le streptocoque bêta-hémolytique du groupe A de LANCEFIELD, appelé *Streptococcus pyogenes*, qui est responsable de la majorité des affections provoquées par les streptocoques. Les réactions immunologiques de l'hôte infecté par *S.pyogenes* sont beaucoup plus complexes que celles qui s'observent lorsqu'il est infecté par *S.aureus* et peuvent conduire à la formation d'anticorps spécifiques à un taux élevé et d'auto-anticorps (**Bactériologie, 2003**).

III.2.2. Les bactéries à Gram négatif

A. *Escherichia coli*

Le genre *Escherichia* ne comporte qu'une seule espèce *Escherichia coli* (*E. coli*) intéressante en bactériologie médicale, et qui est l'espèce la plus fréquemment isolée dans le laboratoire d'analyses médicales de bactériologie (**Ndiaye, 2005**).

E. coli (colibacille), est une entérobactérie mobile capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole (**Bactériologie, 2003**).

Ce colibacille est l'hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux à sang chaud; c'est un coliforme fécal, germe indicateur de contamination fécale dans les eaux et les aliments (**Delarras, 2007**).

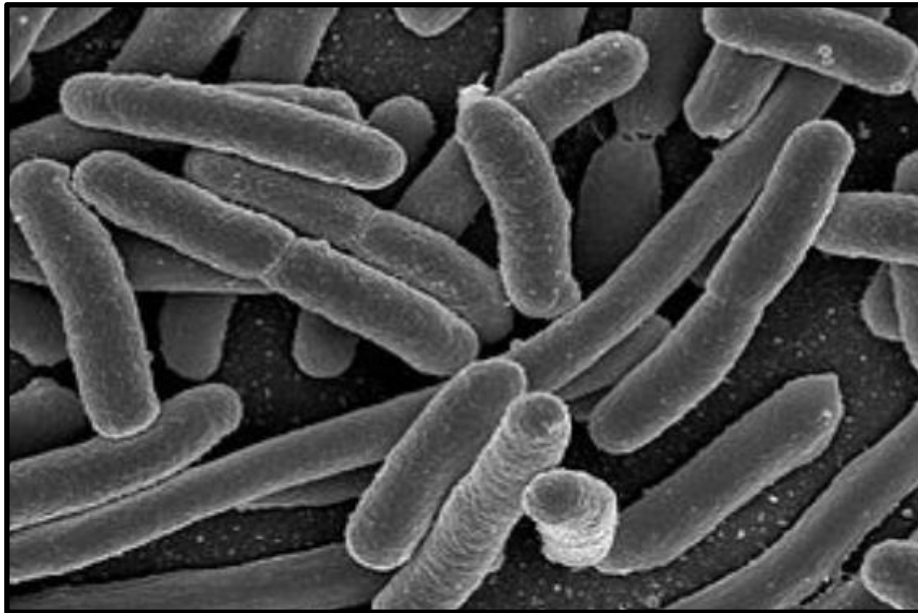


Figure 13: *Escherichia coli*. (Anonyme 05)

Habitat

Concernant l'habitat, on trouve *E. coli* en abondance dans la flore commensale, en particulier dans le tube digestif. Par ailleurs, elle est très répandue dans l'environnement : eau, sols, et aliments (**Baraduc et al, 2000**).

Pouvoir pathogène

Les colibacilles, hôtes normaux de l'intestin, ne provoquent normalement pas de maladie. Cependant ils possèdent un potentiel pathogène qu'ils expriment dans certaines circonstances (pathogènes opportunistes) (**Bactériologie, 2003**).

Chez l'homme, la colonisation par *E. coli* est précoce, et peut être responsable d'un nombre varié de pathologies. Toutefois, trois types de syndromes majeurs résultent de l'infection par des souches d'*E. Coli* pathogènes: les infections urinaires (impliqué dans 80 % des infections urinaires), les infections digestives (diarrhées, infections hépatobiliaires et autres), les méningites néonatales et les septicémies (**Jaureguy, 2009**).

B. *Proteus mirabilis*

Proteus mirabilis (*P. mirabilis*) est un bacille très polymorphe. Dans une culture jeune, il peut exister des formes courtes et des formes longues. Sont des souches très mobiles pourvues de longs flagelles (Avril et al, 1992).

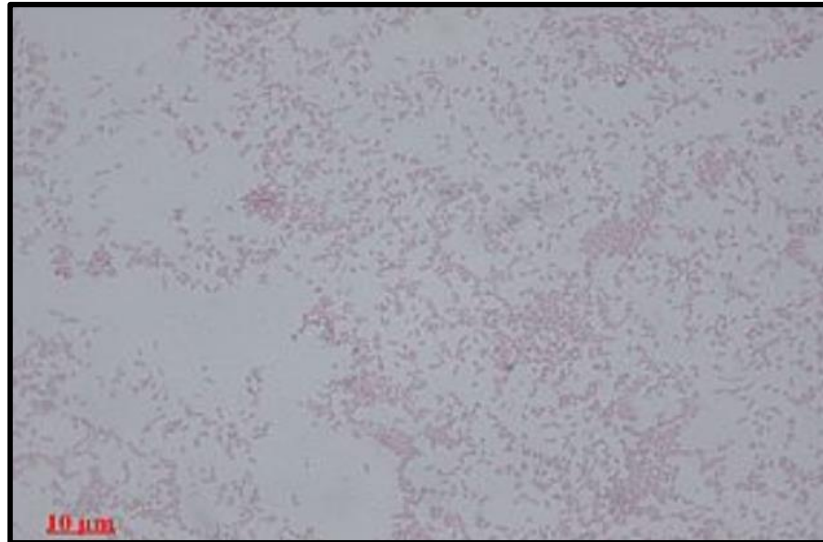


Figure 14: Colonie de *Proteus mirabilis* observée au microscope optique.

(Anonyme 06)

+ Habitat

Le genre *Proteus* fait partie des bactéries de la flore intestinale humaine normale, il est également rencontré partout dans l'environnement (le sol, les eaux de surface, les eaux d'égout), en milieu hospitalier, où il colonise à la fois la peau et la muqueuse buccale des patients et du personnel hospitalier. L'infection se produit principalement à partir de ces réservoirs. (Nauciel et Vildé, 2005; Frenod, 2006).

+ Pouvoir pathogène

Proteus mirabilis (*P. mirabilis*) est responsable de 90% des infections acquises dans la communauté. Ces bactéries sont avant tout responsables d'infections urinaires. Une anomalie de l'appareil urinaire ou un diabète sont des circonstances favorisant la survenue de ces infections qui peuvent être à l'origine de septicémies.

Ces bactéries sont aussi isolées de produits pathologiques variés: sécrétions trachéobronchiques, brûlures, pus divers. Des méningites à *Proteus* ont été décrites chez le nourrisson. Ces espèces sont souvent présentes en grande quantité dans les selles lors des diarrhées par dysmicrobisme intestinal (Avril et al, 2000; Frenod, 2006).

C. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) est une bactérie aérobie stricte, mobile, produisant souvent des pigments diffusibles et naturellement résistante à de très nombreux antibiotiques (Bactériologie, 2003). Il possède souvent des granulations plus fortement colorées (Hafiane et Ravaoarinoro, 2008).

P. aeruginosa, bacille pyocyanique, du grec *puon*= pus et du grec *kuanos*= bleu foncé, et du latin *aeruginosus* = couvert de rouille. Isolé en 1882 par Gessard. C'est l'espèce la plus connue et la plus répandue du genre *Pseudomonas*. Elle est également la plus pathogène, elle constitue l'espèce-type du genre (Avril et al, 1992).

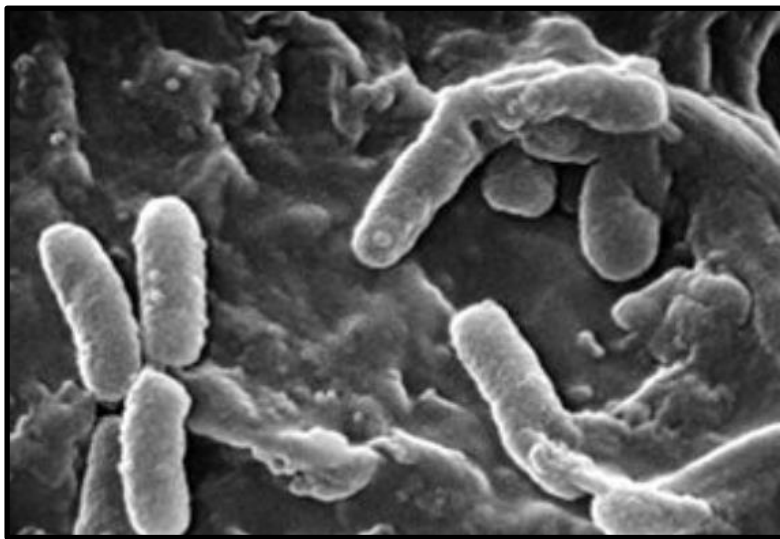


Figure 15: *Pseudomonas aeruginosa* au microscope électronique à balayage.

(Anonyme 07)

Habitat

C'est une bactérie ubiquiste qui vit normalement à l'état saprophyte dans l'eau et le sol humide ou sur les végétaux (**Delarras, 2007**).

Elle résiste mal à la dessiccation. Cette bactérie peut vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme et de divers animaux. Le bacille pyocyanique peut survivre et se multiplier dans une infinie variété de liquides et de milieux, de supports et de matériels, surtout s'ils sont humides (**Nauciel et Vildé, 2005**).

Par ailleurs, ces bactéries sont souvent présentes en milieu hospitalier dans des habitats liés à la présence humaine (malades, visiteurs, personnel), aux activités du personnel médical et aux produits liquides utilisés (**Delarras, 2007**).

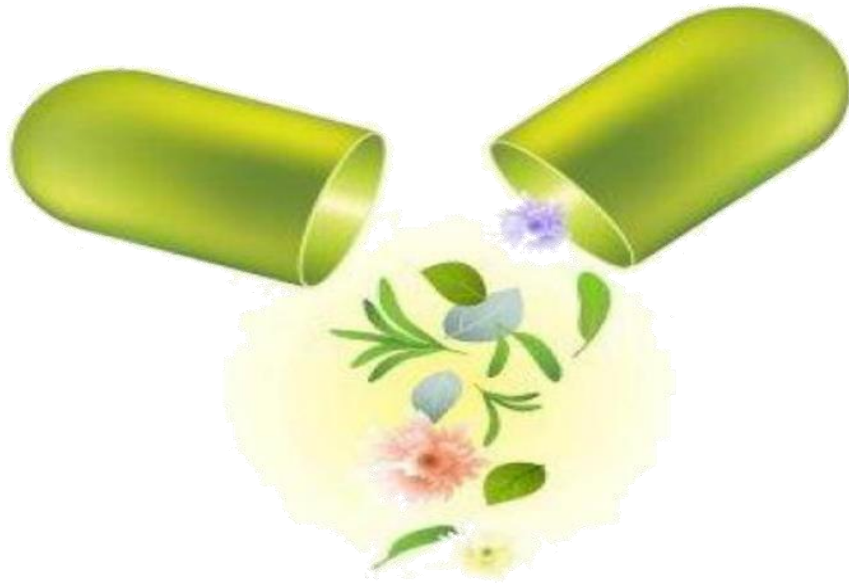
Pouvoir pathogène

Considéré comme une bactérie pathogène opportuniste c'est le germe type des infections hospitalières ou nosocomiales (**Nauciel et Vildé, 2005**).

La bactérie n'est pas pathogène pour le sujet normal, mais elle peut provoquer des infections parfois sévères chez les sujets dont les défenses sont amoindries.

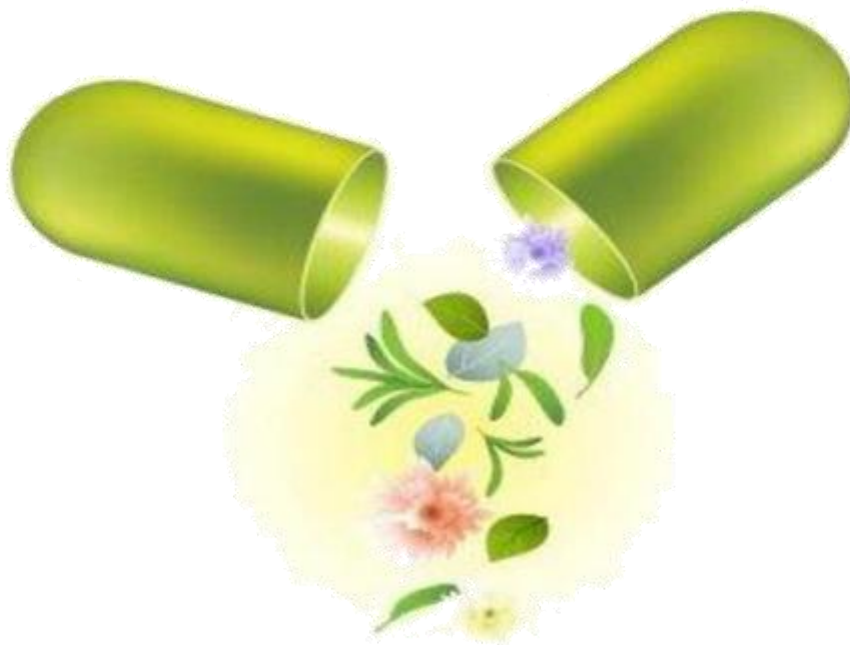
Elle peut provoquer des infections urinaires, bronchiques (en particulier chez les sujets atteints de mucoviscidose), pulmonaire (chez les immunodéprimés ou les malades ventilés), oculaires (kératite ou endophtalmie) et ostéo-articulaires.

Elle peut aussi surinfecter des lésions cutanées (brûlures), les plaies traumatiques ou postopératoires; provoquer des otites externes (pouvant évoluer de manière invasive chez les sujets âgés et diabétiques), des septicémies (en particulier chez les neutropéniques) ainsi que des endocardites (chez les toxicomanes) (**Nauciel et Vildé, 2005**).



Etude expérimentale

Chapitre I



Matériel et Méthodes

Ce travail a pour objectif l'évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne « *in vitro* » de l'extrait méthanolique de l'Aubépine *Crataegus monogyna* Jacq.

Les expériences rapportées dans ce mémoire sont réalisées comme suit :

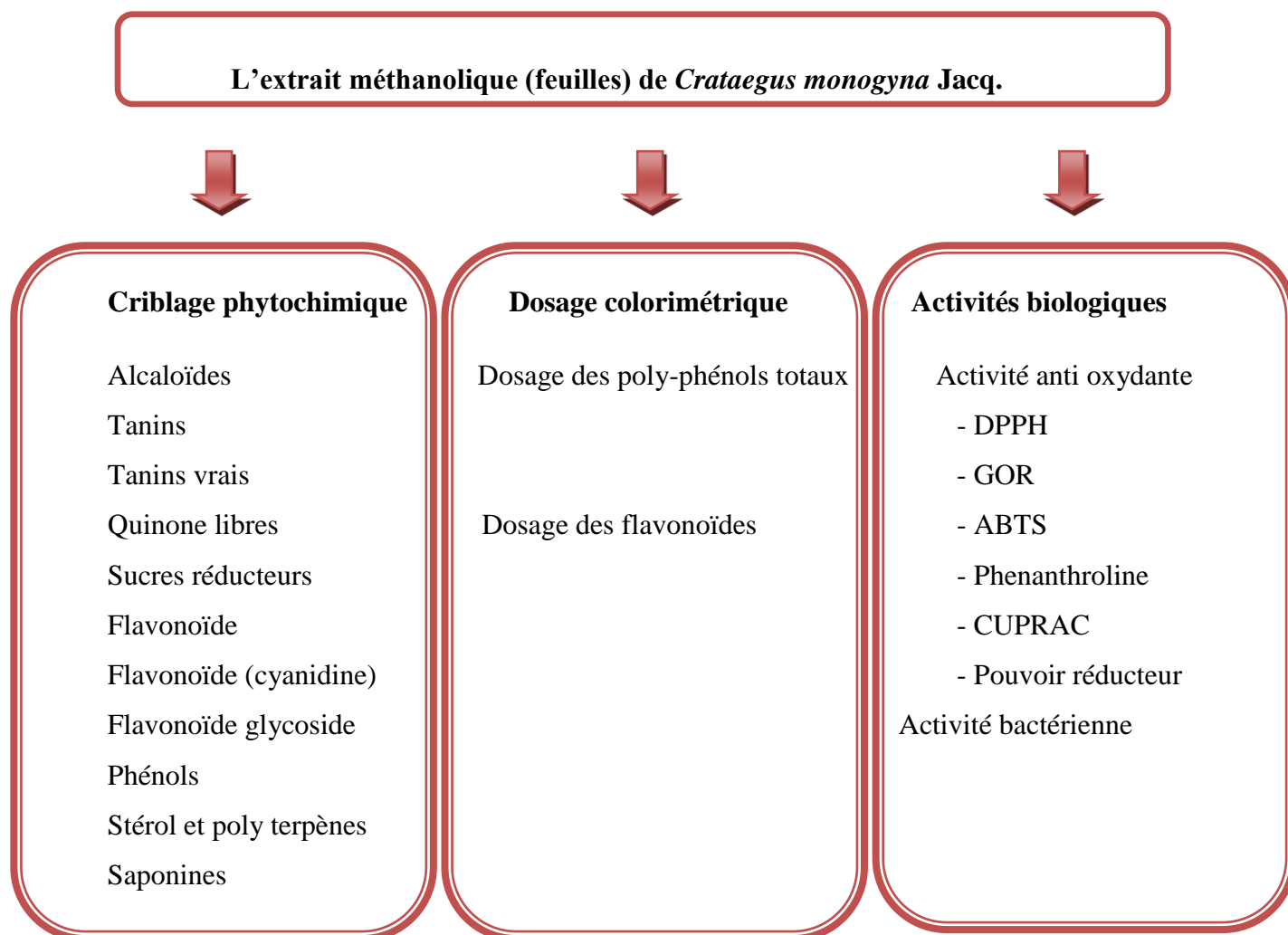


Figure 16 : Protocole de l'étude expérimentale.

I. Matériel et Méthodes

Notre travail a été réalisé au laboratoire de biochimie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri, Constantine1, au centre de recherche en biotechnologie (CRBT) Algérie et l'activité antibactérienne au laboratoire de référence de sante de la wilaya de Skikda.

I.1. Matériel

I.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de la partie aérienne (les feuilles) de la plante d'Aubépine *Crataegus monogyna* Jacq. (Rosaceae) récoltée à Skikda (Mahmoud Bouchatâta) en décembre 2018. Les feuilles ont été séchées à l'abri de la lumière, à température ambiante et stockées soigneusement dans un endroit sec en vue de leur utilisation.



Figure 17: Lieu de la récolte de l'Aubépine *Crataegus monogyna* Jacq.

(Anonyme 08)

I.1.2. Souches bactériennes testées

Pour réaliser l'activité antibactérienne, cinq souches bactériennes ont été utilisées dans ce travail, dont deux souches référenciées: *Escherichia coli* (ATCC235), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC75/2.5); et trois souches cliniques: *Proteus mirabilis*, *Streptococcus aureus* et *Staphylococcus Sp.* Elles sont isolées chez des patients du laboratoire microbiologie de l'hôpital Abderrezak Bouhara de wilaya de Skikda.

L'ensemble des souches a été isolé à partir de différents prélèvements biologiques urinaires et pus.

Tableau 04: Les souches bactériennes testées.

| | |
|--|-----------------|
| <i>Escherichia coli</i> (ATCC235) | GRAM(-) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC75/2.5) | GRAM (-) |
| <i>Proteus mirabilis</i> (SH) | GRAM (-) |
| <i>Streptococcus aureus</i> (SH) | GRAM (+) |
| <i>Staphylococcus Sp</i> (SH) | GRAM (+) |

SH : Souche Hospitalière

I.2. Méthodes

Les feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq, ont été séchées à l'ombre, découpées en petits morceaux, puis broyées à l'aide d'un mixeur jusqu'à l'obtention d'une poudre moins fine pour la préparation des extraits.

I.2.1. Préparation des extraits

L'extrait méthanolique (feuilles) en référant à la méthode de macération permet d'effectuer une extraction solide-liquide.

I.2.1.1. Préparation de l'extrait de l'éther de pétrole

L'extrait d'éther de pétrole a été obtenu par macération. Le broyat obtenu (100 g) pour la poudre des feuilles est mis en macération dans l'éther de pétrole pendant 24 heures à température ambiante. Le surnageant obtenu est filtré par pompe sous vide à l'aide d'un Büchner sur un papier filtre et on obtient le filtrat.



Figure 18 : Filtration de macérât sous vide (Photo originale).

Les extraits ainsi obtenus sont évaporés à sec à l'aide de rotavapeur (**Buchi.R-210**) dans une température de 40°C, l'extrait récupéré sous forme d'une pâte dans une boîte de pétri.



Figure 19: Évaporation du filtrat
(Photo originale).



Figure 20: Extrait brut d'éther de pétrole
(Photo originale).

Cette étape utilisée pour éliminer la chlorophylle et pré-préparative de l'extrait hydroalcoolique.

I.2.1.2. Préparation de l'extrait hydroalcoolique

La matière végétale (feuilles) a été mise à macérer dans le système solvant suivant: 7 volumes de méthanol + 3 volumes de l'eau distillée. Après une macération de 24 heures à température ambiante. Le mélange est filtré sous vide.

L'opération est répétée trois fois avec renouvellement de système solvant toute les 24 heures. Les trois fractions filtrées sont regroupées et évaporées à l'aide de rotavapeur dans une température de 40°C.



Figure 21: Macération dans solution hydroalcoolique
(Photo originale).

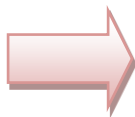


Figure 22: Filtration de macérât sous vide
(Photo originale).

L'extrait ainsi obtenu est évaporé à sec à l'aide de rotavapeur (**Buchi.R-210**) dans une température de 40°C, l'extrait récupéré sous forme d'une pate dans une boîte de pétri.



Figure 23: Évaporation du filtrat
(Photo originale).



Figure 24: Extrait méthanolique brut
(Photo originale).

I.2.2. Criblage « screening » phytochimique

Le criblage phytochimique est une analyse qualitative basée sur des réactions de précipitations et / ou de colorations.

Les métabolites secondaires sont mis en évidence par une étude phytochimique qui permet de détecter la présence ou l'absence des constituants chimiques essentiellement les composés phénoliques comme les tanins et les flavonoïdes, et les composés azotés en particulier les alcaloïdes.

✚ Les alcaloïdes

Test fondé sur la capacité qu'ont les alcaloïdes à se combiner avec les métaux lourds test de Mayer: L'extrait méthanolique est repris dans quelques ml d'HCl 50 %. La formation d'un précipité jaune, après ajout de quelques gouttes du réactif de Mayer, témoigne de la présence d'alcaloïdes (**Dohou et al, 2003**).

✚ Les tanins

1g de matériel végétal sec sont placés dans 10 ml de MeOH 80 %. Après 15 min d'agitation, les extraits sont filtrés et mis dans des tubes secs. L'ajout de FeCl₃ à 1 % permet de détecter la présence ou non des tanins. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques (**Dohou et al, 2003**).

✚ Les Tanins vrais

Un aliquote d'extrait repris dans 2ml d'eau distillée, ajouter quelques gouttes d'HCl concentré le tout est chauffé au bain marie bouillant, la formation d'un précipité rouge indique un test positif (**Yves-Alain et al, 2007**).

✚ Les Quinones libres

Un gramme de matériel végétal sec est broyé et placé dans un tube sec avec 15 à 30 ml d'éther de pétrole. Après agitation et un repos de 24 h, les extraits sont filtrés et concentrés au rotavapeur. La présence de quinones libres est confirmée par l'ajout de quelques gouttes de NaOH 1/10, lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet (**Dohou et al, 2003**).

+ Les saponines: Indice de mousse

Leur présence est déterminée quantitativement par le test de la mousse, dans des conditions déterminées, l'extrait repris dans 5ml d'eau distillée, puis introduit dans un tube à essai est agité vigoureusement, la formation d'une mousse (hauteur supérieur de 1cm) stable persistant pendant 15 min, indique la présence de saponines (Yves Alain et al, 2007).

+ Flavonoïdes

Dix gouttes d'acide chlorhydrique concentré et quelques milligrammes de tournures de magnésium sont ajoutés à 0.5 ml de l'extrait. La coloration rose-rouge ou jaune, après trois minutes d'incubation à température ambiante, indique la présence des flavonoïdes (Hadduchi et al, 2014).

+ Flavonoïdes (Cyanidine)

L'extrait méthanolique dissout dans 1ml HCl et quelques copeaux de magnésium, l'apparition d'une coloration allant de l'orangé au rouge pourpre indique une réaction positive (Najaa et al, 2011).

+ Flavonoïdes glycosides

1ml d'hydroxyde de potassium KOH à 1% est ajouté à 2ml de l'extrait dilué dans le méthanol. L'apparition d'une coloration jaune indique la présence des flavonoïdes glycosides (Iqbal et al, 2011).

+ Sucres réducteurs

Les sucres réducteurs ont été mis en évidence dans les extraits par le réactif de Fehling. 5 ml d'extrait brut sont additionnés 5 ml de liqueur de Fehling. La formation d'un précipité rouge brique après 2-3 min de chauffage au bain-marie à 70°C indique une réaction positive (Yves-Alain et al, 2007).

+ Stérols et les polyterpènes

Les stérols et les polyterpènes ont été recherchés par la réaction de Liebermann. Le résidu est dissout dans 1 ml d'anhydride acétique ; nous avons ajouté 0,5 ml d'acide sulfurique concentré au triturât. L'apparition, à l'interphase, d'un anneau violet, virant au bleu puis au vert, a indiqué une réaction positive (koffi et al, 2009).

✚ Phénols

2ml de l'extrait méthanolique ont été mélangés avec 2ml de l'éthanol à 96%.L'ajout de quelques gouttes de FeCl_3 permet l'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée qui indique la présence de phénols (Najjaa *et al*, 2011).

I.2.3. Dosage colorimétrique (spectrophotométrique)

I.2.3.1 Dosage des polyphénols totaux

A. Principe

La teneur en polyphénols totaux est déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu(FCR) (Singleton et Rossi, 1965) selon une méthode de dosage sur microplaque décrite par (Muller *et al*, 2010).

Le réactif FCR, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$), est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorbance maximum aux environs de 750 - 765nm.

B. Protocole

Cette méthode est déterminée selon la méthode de (Muller *et al*, 2010). Un volume de 20 μl d'extrait de plante est déposé sur une microplaque, en ajoutant 100 μl de FCR dilué (1/10) et 80 μl de carbonate de sodium (7,5%) plus mettre le mélange à l'obscurité pendant 2h après fait lecture à 765nm. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol).

I.2.3.2 Dosage des flavonoïdes

A. Principe

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre Al^{3+} et les flavonoïdes qui donnent une coloration jaunâtre. La méthode de (Topçu *et al*, 2007) est utilisée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque 96 puits.

B. Protocole

Cette méthode déterminée selon (Topçu et al, 2007). Un volume 50µl de chaque dilution sont transférés dans une microplaque 96 puits, en ajoutait 130µl (MeOH) et 10µl de acétate de potassium(CH₃COOK) + 10µl de nitrate d'aluminium (Al(NO₃)₂, 9H₂O), ensuite attendre 40min pour la lecture à 415nm. Un blanc est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol (50µl extrait + 150µl méthanol).

I.2.4. Evaluation de l'activité biologique *in vitro*

I.2.4.1. Evaluation de l'activité Antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité antioxydante, nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres, par exemple: DPPH⁺ (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), ou ABTS (2,2-azinobis 3-éthylbenzothiazoline 6-sulphonate) et CUPRAC (capacité antioxydante par réduction de cuivre).

Dans ce travail, les propriétés antioxydantes de l'extrait *Crataegus monogyna* Jacq. Ont été testées par les méthodes suivantes: DPPH radical libre, méthode CUPRAC, méthode de Pouvoir réducteur, l'activité de piégeage d'ABTS, l'activité de piégeage de Galvinoxyl radical (GOR) et l'activité phenanthroline.

✚ Préparation des échantillons

Les concentrations préparées sont utilisées pour toutes les méthodes. La concentration des solutions mères de chaque échantillon est exprimée en ppm.

Une quantité de 4 milligrammes d'extrait a été dissoute dans 1 ml du méthanol (Solution mère de 4000ppm) respectivement avec 7 concentrations différentes (une série de dilution de 1/2) de l'échantillon en ordre décroissant comme suit :

| | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------------------------|-----|-----|-----|------|------|------|
| | 4000 ppm =4 mg/ml | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 |
| Concentration µg/ml | 800 | 400 | 200 | 100 | 50 | 25 | 12.5 |

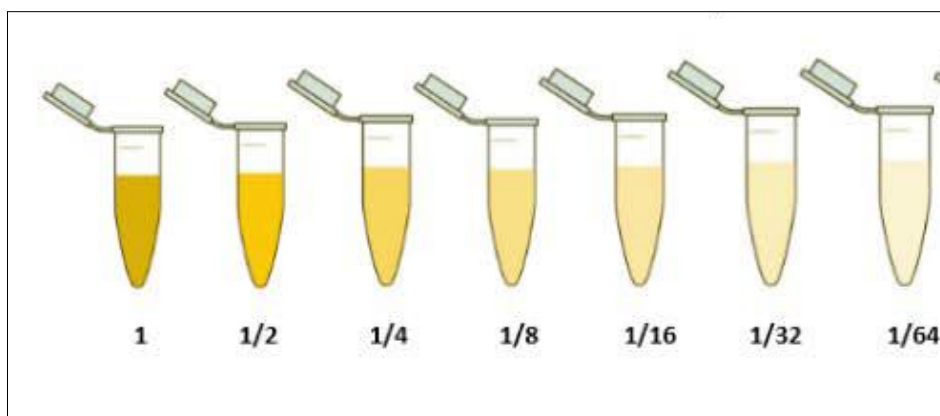


Figure 25: Représentation schématique de différentes dilutions de l'extrait.

A. Evaluation de l'activité antioxydante par le radical libre diphényle-picryl-hydrazyle (DPPH)

Le composé chimique 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle (DPPH) l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (**Blois, 1958**). Cette méthode est caractérisée par la rapidité, la facilité et faible consommation de réactifs (**Musa et al, 2016**).

A.1. Principe

La réduction du radical libre DPPH[°] (2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyle) est suivie par la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants (**Molyneux, 2004**). En présence des antioxydants, le DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyle) de couleur violette se réduit en 2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (**Maataoui et al, 2006**).

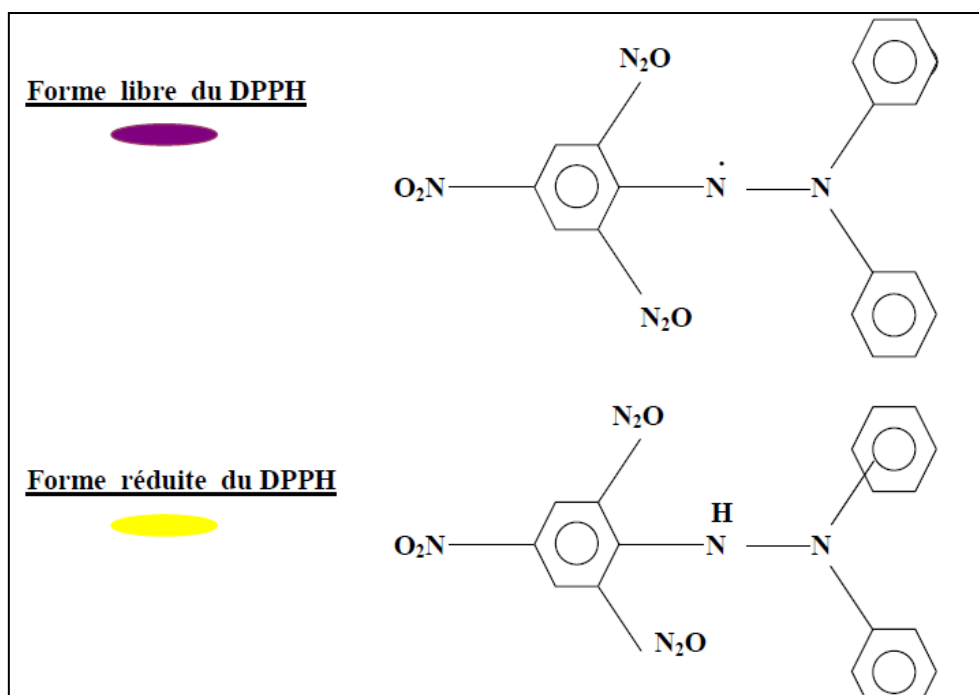


Figure 26: Forme réduite et libre du DPPH (Mohammedi, 2006).

A.1. Protocole

Cette activité est déterminée selon la méthode de (Blois, 1958). Un volume de 40 μ l de différentes concentrations d'échantillon est déposé en triplicata sur une microplaque à 96 puits, en ajoutant sur chaque puits un volume de 160 μ l d'une solution méthanolique de DPPH (0,4mM). Le blanc est préparé en parallèle, en mélangeant 40 μ l du méthanol avec 160 μ l d'une solution méthanolique de DPPH, Après incubation à température ambiante à l'obscurité pendant 30min, la microplaque est insérée dans le spectrophotomètre pour mesurer l'absorbance à 517nm. Le pourcentage d'inhibition le radical DPPH a été calculée selon l'équation suivante :

$$\%inhibition(DPPH) = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{Extrait}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

$A_{\text{Contrôle}}$ est l'absorbance de la réaction ne contenant que les réactifs.

A_{Extrait} est l'absorbance de la réaction contenant les réactifs et l'extrait.

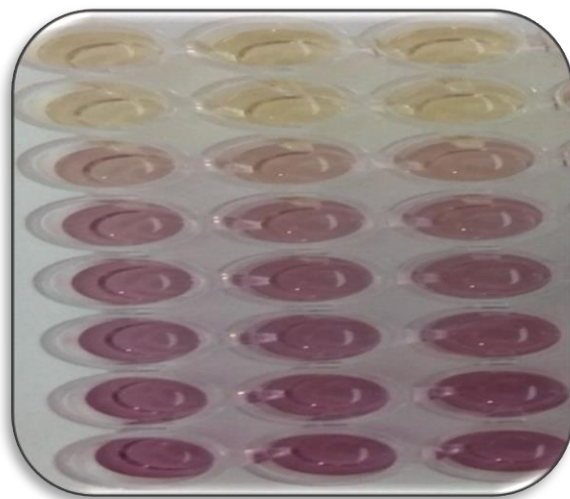


Figure 27: Test du DPPH (photo originale).

B. Pouvoir réducteur

B.1. Principe

Le pouvoir réducteur est un indicateur significatif du potentiel antioxydant d'une substance (Wang *et al*, 2008).

Cette méthode est basée sur l'aptitude d'un antioxydant donné à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe ferrocyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) en fer ferreux (Fe^{2+}) (Philips *et al*, 2010).

La réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique à la couleur bleu-vert du fer ferreux. L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotomètre à 700 nm (Karagözler *et al*, 2008).

B.2. Protocole

Cette activité est déterminée selon la méthode de (Oyaizu, 1986). Un volume de 10 μl de différentes concentrations d'échantillon est déposé en triplicata sur une microplaque à 96 puits, en ajoutant sur chaque puit un volume de 40 μl phosphate buffer (pH 6.6) puis 50 μl potassium ferricyanide (1%) $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, (1 g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ dans 100ml H_2O). Après incubation à 50°C à l'étuve pendant 20 minutes. Un volume de 50 μl acide tri-chloroacétique (TCA) (10%) (10g de TCA dans 100ml H_2O) et 40 μl H_2O et 10 μl ferricchloride FeCl_3 (0.1%) (0,1g de FeCl_3 dans 100ml H_2O) sont rajoutés, ensuite la microplaque est insérée dans le spectrophotomètre pour mesurer l'absorption à 700nm.



Figure 28: Test du pouvoir réducteur (photo originale).

C. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

C.1. Principe

C'est une méthode développée par (Apak *et al*, 2004). Le test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre CUPRAC (cuivrique Réduire Antioxydant Capacity) est basé sur le suivi de la diminution de l'absorbance accrue de complexe néocuproéne (Nc), cuivre (Cu^{2+}) (Nc-Cu^{2+}). En effet, la présence d'agent antioxydant, le complexe cuivre-neocuproéne est réduit et cette réaction est quantifiée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450nm.

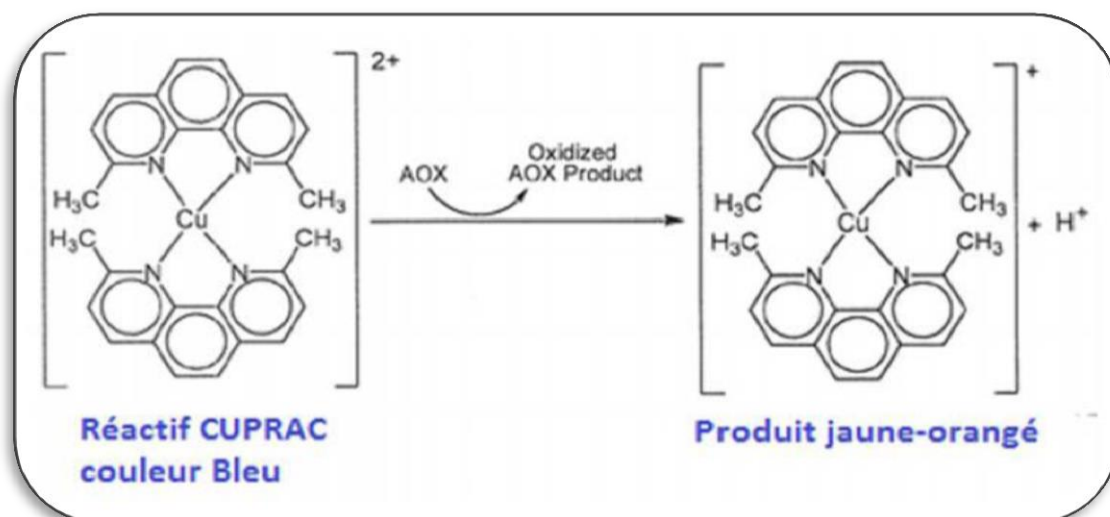


Figure 29: La réaction de test du CUPRAC (özyürek *et al*, 2011).

C.2. Protocole

Ce teste est déterminé par la méthode CUPRAC (Apak *et al*, 2004). Un volume 40 μ l de l'extrait est déposé sur une microplaque à 96 puits, dans chaque puits en ajoutant 60 μ l de la solution acétate d'ammonium (ACNH_4 et H_2O) puis ajouter 50 μ l de la solution (Neocupronin et EtOH) et 50 μ l de solution (Cu Cl_2 , $2\text{H}_2\text{O}$ et H_2O) après 1 h d'incubation ont été lire l'absorbance à 450nm.



Figure 30: Test du CUPRAC (photo originale).

D. Test du ABTS (acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique))

D.1. Principe

Le radical cation de l'acide 2,2'-azinobis (3-éthyl benzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) est stable sous sa forme libre. En la présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène, ce radicale subit une réduction et une diminution de l'absorbance à 734 nm de ce radical cation. Cette diminution dépend de l'activité antioxydante du composé testé (Cano *et al*, 2000).

D.2. Protocole

Cette activité ABTS est déterminée par la méthode de **(Re et al, 1999)**. Un volume de 160 μl de (ABTS^+) est déposé sur une microplaque à 96 puits, en ajoutant sur chaque puits un volume de 40 μl de (extrait), Après 10min la microplaque est insérée dans le spectrophotomètre pour mesurer l'absorbance à 734nm.

L'activité ABTS^+ a été exprimée en pourcentage et calculée par l'équation suivante :

$$(\%) \text{ Inhibition } \text{ABTS}^+ = (A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Extrait}} / A_{\text{Contrôle}}) \times 100$$



Figure 31: Test de l'ABTS (photo originale).

E. Test du phénanthroline

E.1. Principe

Le fer ferreux Fe^{2+} forme un complexe stable avec l'orthophénanthroline et donne une couleur orangée. On nomme ce complexe ferroïne et il se quantifie photométriquement à une longueur d'onde de 510 nm **(Zaidi, 2019)**.

E.2. Protocole

Cette activité est déterminée par la méthode de **(Szydłowska-Czerniaka, 2008)**. Un volume de 10 μl d'extrait est déposé sur une microplaque à 96 puits, en ajoutant sur chaque puits un volume de 50 μl FeCl_3 (0.2%) +30 μl Phénanthroline (0.5%), et 110 μl MeOH, après à

l'obscurité pendant 20 min à 30°C la microplaque est insérée dans le spectrophotomètre pour mesurer l'absorbance à 510 nm.

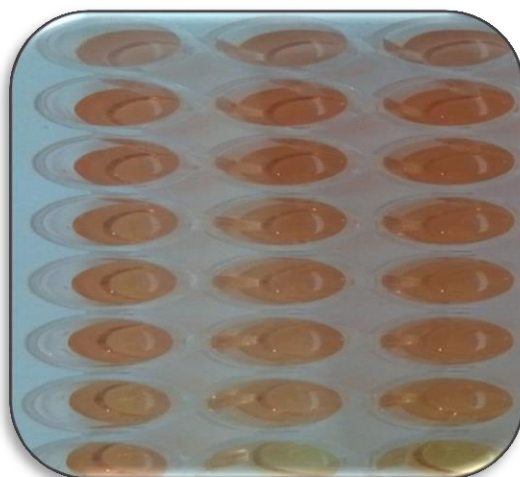


Figure 32: Test du phénanthroline (photo originale).

F. Activité du piégeage du radical galvinoxyl (GOR)

F.1. Principe

Le radical galvinoxyle est un radical phénolique relativement stable, il est largement utilisé pour évaluer l'activité antiradicalaire des composés phénoliques et déterminer leur capacité à transférer des protons H labiles aux radicaux libres. Il peut être réduit de manière irréversible, en raison de son électron impair, le radical galvinoxyle présente une bande d'absorbance puissante à 428 nm, dans son état radical et à une faible concentration, une solution de galvinoxyle apparaît en jaune. Sa couleur est dégradée du jaune foncé en jaune pâle en présence d'un antioxydant et son absorbance diminue (Shi *et al*, 2001).

F.2. Protocole

Cette activité galvinoxyl radical (GOR) est déterminée par la méthode de (Shi *et al*, 2001). Un volume 40 μ l (extrait) est déposé sur une microplaque à 96 puits, en ajoutant sur chaque puits un volume de 160 μ l (0,1mM galvinoxyl) (4 mg dans 100 ml MeOH). Après 120 min la microplaque est insérée dans le spectrophotomètre pour mesurer l'absorbance à 428 nm.



Figure 33: Test du GOR (photo originale).

I.2.4.2. Evaluation de l'activité antibactérienne

A. Méthode de diffusion (Antibiogramme)

L'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique est évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé, décrite par (**Bauer et al, 1966**).

A partir des colonies jeunes qui ont été obtenues par le repiquage dans la gélose nutritive de 18 à 24h dans l'étuve, une suspension bactérienne est réalisée dans l'eau physiologique pour chaque souche. L'inoculum est ensemencé par la tige sur des boîtes de pétri contenant la gélose Mueller-Hinton.

Les disques imprégnés de différentes concentrations d'extrait sont ensuite délicatement déposés à la surface de la gélose.

Les boîtes de pétri sont laissées pendant 1h à la température ambiante puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 24h (**Adesokan et al, 2007**). L'activité antibactérienne est déterminée en mesurant le diamètre de zone d'inhibition autour de chaque disque (**Doughari et al, 2007**).

B. Souches bactériennes testées

Pour évaluer l'activité antibactérienne, cinq souches ont été utilisées parmi les quelles deux sont Gram positif et trois Gram négatif.

Tableau 05: Les souches bactériennes testées.

| Souches | Gram |
|---|----------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> (SH) | Positif |
| <i>Streptococcus Sp</i> (SH) | |
| <i>Echerichia coli</i> (ATCC235) | Négatif |
| <i>Proteus mirabilis</i> (SH) | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC75/2.5) | |

SH : Souche Hospitalière

Les souches qui utilisent sont revivifiées à 37 °C par repiquage sur gélose nutritive (GN).

C. Milieu de culture

On a utilisé le milieu de culture approprié à cette étude est le Mueller-Hinton (gélose relativement riche pour la réalisation de l'antibiogramme standard), qui est le milieu de référence pour les tests de la sensibilité des souches bactériennes à différentes concentrations d'extrait méthanolique.

La gélose Mueller Hinton se dissout et refroidi à 45°C, coulé en boîte de pétri à une épaisseur de 0.4 mm et on le laisse solidifier entre 10 à 15 min.

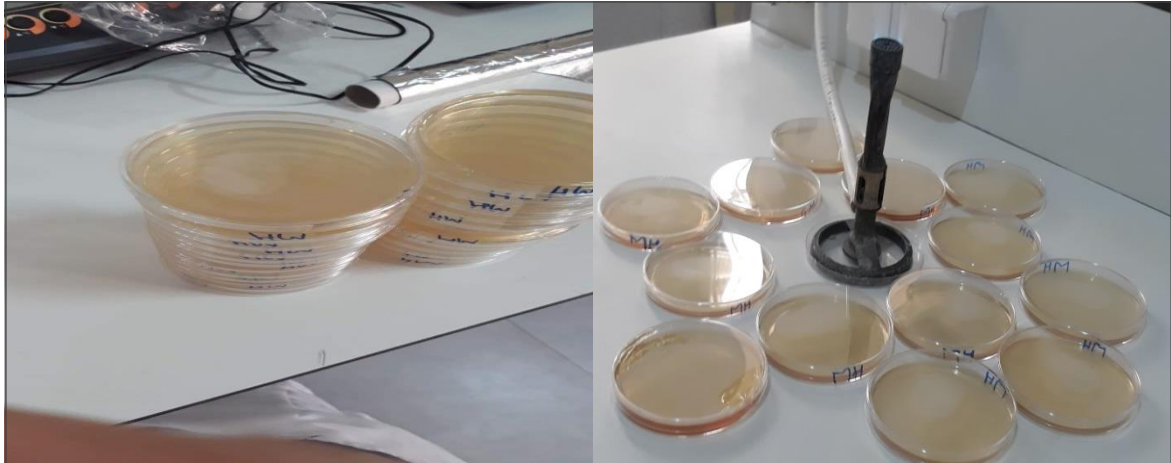


Figure 34: Préparation du milieu de culture M-H (Photos originales).

On a utilisé aussi la gélose nutritive ordinaire (GNO) est un milieu d'isolement non-sélectif. L'isolement est réalisé dans le but de contrôler la pureté d'une souche bactérienne ou de purifier la souche bactérienne, si elle est contaminée, et aussi pour but d'obtention des colonies jeunes par le repiquage à partir des souches origine.

Après la préparation des boîtes de pétri, ces dernières ont été incubées 24/48 heures à 37°C.



Figure 35: Préparation du milieu de culture GN (Photo originale).

D. Stérilisation du matériel

Les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) et aussi les embouts enrobés dans un flacon en verre ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

E. Préparation des dilutions d'extrait

L'extrait méthanolique de l'Aubépine *Crataegus monogyna* Jacq (Feuilles) est solubilisé dans le diméthylesulfoxyde (DMSO) pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives.

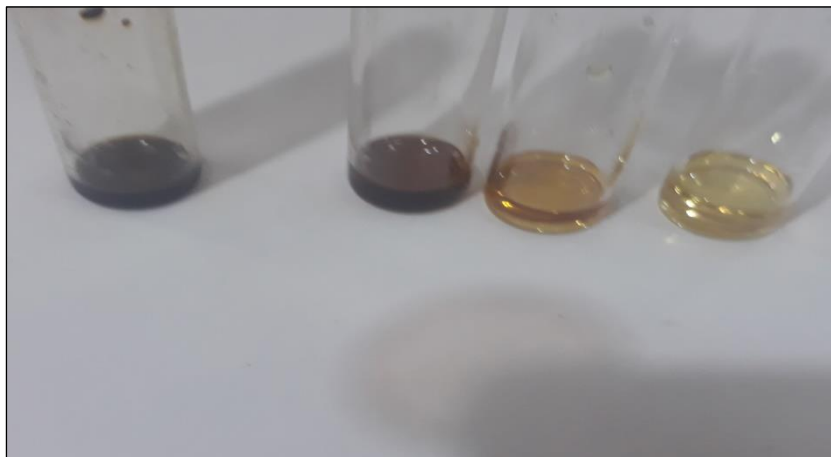


Figure 36: La dilution d'extrait méthanolique dans le DMSO (photo original).

F. Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes ont été mises en culture dans une gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24h.

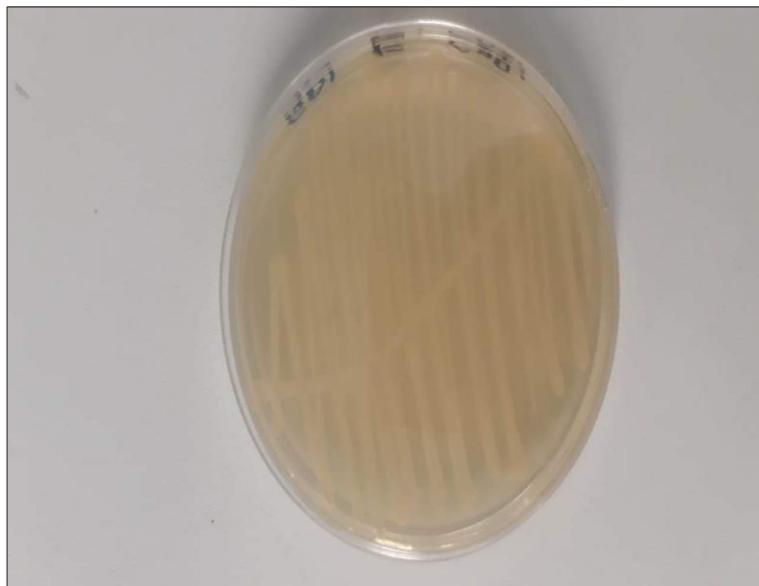


Figure 37: Exemple de repiquage de l'E. Coli (photo originale).

La récupération du l'inoculum jeune qui est incubé sur la gélose nutritive (GN), a été mis dans 10 ml de l'eau physiologique puis faire l'étalement sur la gélose Mueller-Hinton (MH) à l'aide d'une tige (l'inoculum ne doit pas dépasser plus de 15min dans l'eau physiologique).

G. Ensemencement et dépôt des disques

1ml de chaque suspension de culture bactérienne est étalé à la surface du milieu gélosé M.H à l'aide d'une tige.

Les disques imprégnés dans les différentes concentrations d'extrait méthanolique (feuilles) sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile. Les boîtes de pétri sont d'abord laissées pendant 1h à la température ambiante pour une pré-diffusion des substances, avant d'être incubé à l'étuve pendant 24h (Adesokan et al, 2007).

Afin de confirmer l'efficacité de notre extrait un antibiogramme est réalisé avec un témoin positif (Acide gallique) et un négatif (DMSO), qui ont aussi été déposés sur la surface de la gélose inoculée.

Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C dans l'étuve.

L'expérience est répétée deux fois pour chaque dilution et pour chaque espèce bactérienne.



Figure 38: Insertion des disques sur la gélose inoculée (photo originale).

H. Lecture des antibiogrammes

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions au tour des disques (mm). Les zones doivent être uniformément circulaires (Espinel-Ingroff, 2007).

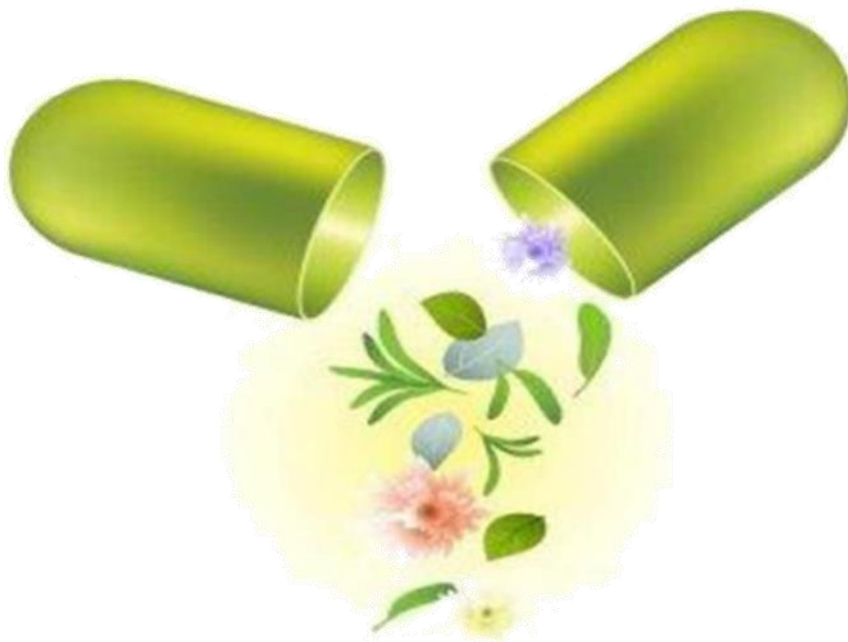
Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des extraits (Ponce *et al*, 2003).

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

I.2.5. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués «*in vitro*» sont exprimés en moyenne \pm SD d'analyses en trois essais. Les valeurs IC_{50} (concentration d'inhibition à 50%) et de $A_{0,5}$ (la concentration de l'absorbance 0,5) sont calculées par la méthode de la régression linéaire à partir des deux courbes: [% inhibition = f (concentrations)] pour la IC_{50} et [Absorbance = f (concentrations)] pour la $A_{0,5}$.

Chapitre II

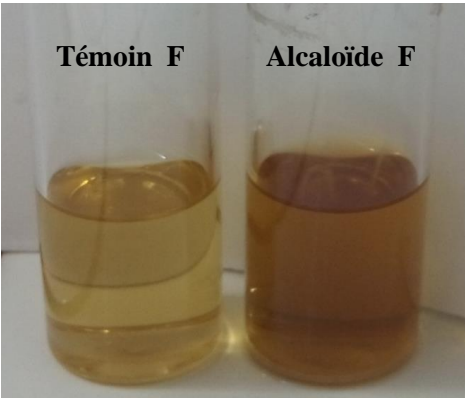
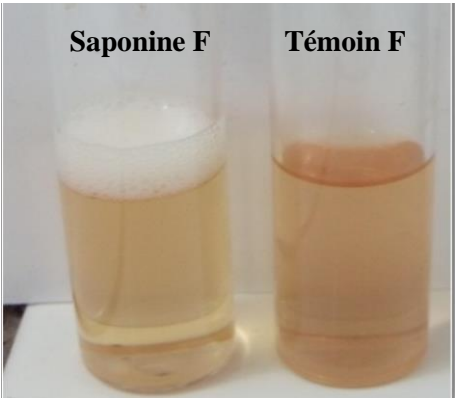


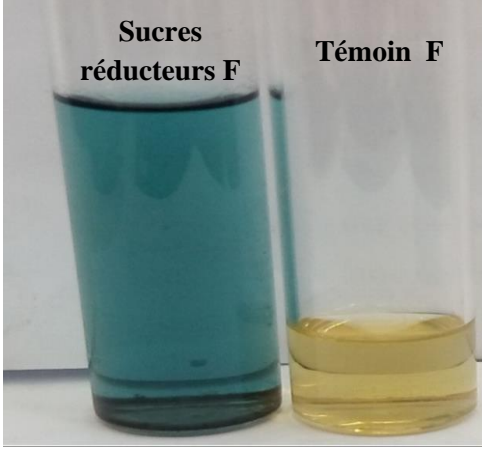
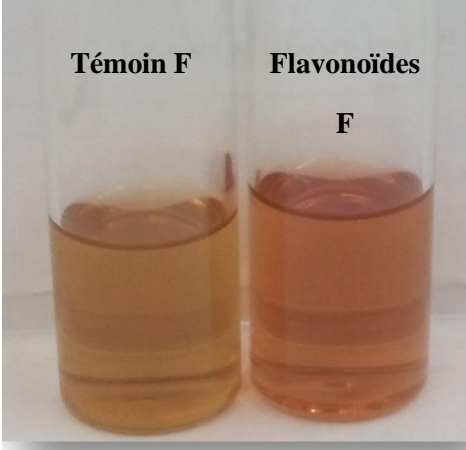
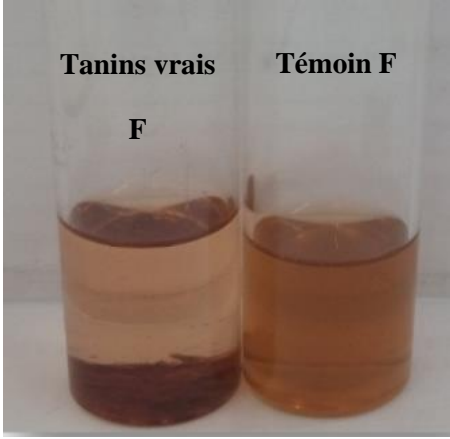
Résultats et discussion

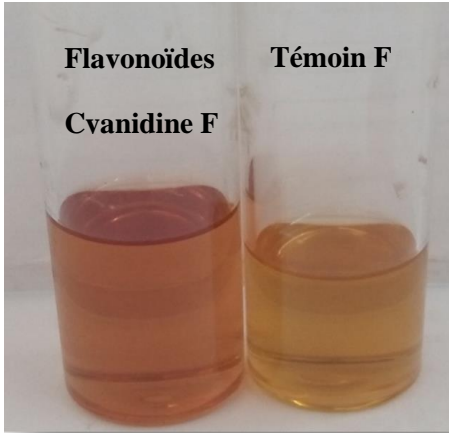
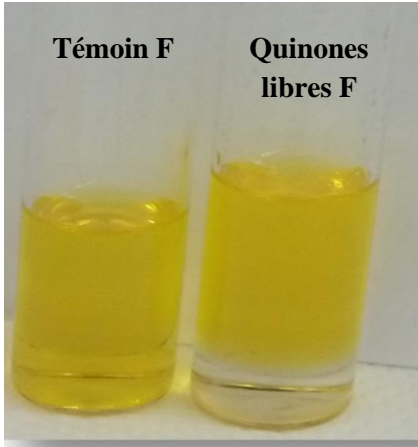
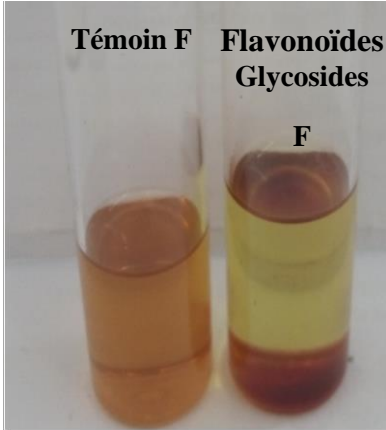
II.1.Criblage « Screening » phytochimique

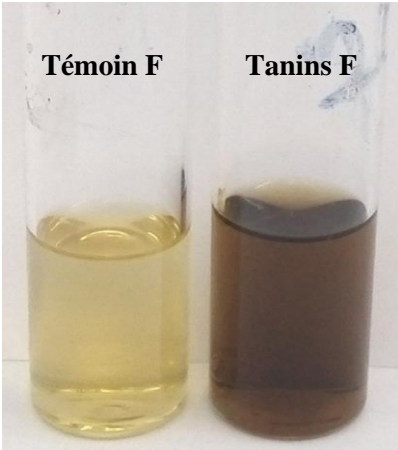
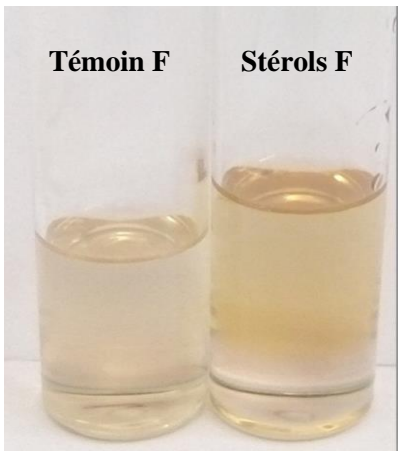
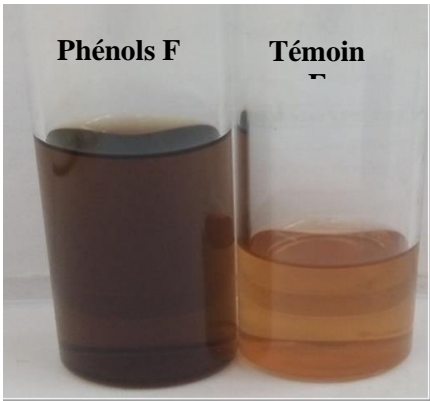
Les tests phytochimiques ont été réalisés sur l'extrait méthanolique *Crataegus monogyna* Jacq. La détection des composés chimiques existants dans les feuilles *Crataegus monogyna* Jacq est basée sur des réactions qualitatives de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le (**Tableau 06**) ci-dessous.

Tableau 06: Résultats du criblage phytochimique des feuilles *Crataegus monogyna* Jacq.

| Composés chimiques | Feuilles | |
|-----------------------------------|--|---------------------|
| | Photos | Présence ou Absence |
| Alcaloïdes (test de mayer) |  | + + |
| Saponines (teste de la mousse) |  | + + + |

| | | |
|---------------------------------|---|------------|
| <p>Sucres réducteurs</p> |  | <p>+</p> |
| <p>Flavonoïdes</p> |  | <p>+++</p> |
| <p>Tanins vrais</p> |  | <p>+++</p> |

| | | |
|---|---|--------------|
| <p>Flavonoïdes (Cyanidine)</p> |  | <p>+ + +</p> |
| <p>Quinones libres</p> |  | <p>+ + +</p> |
| <p>Flavonoïdes glycosides</p> |  | <p>+ + +</p> |

| | | |
|--|---|--------------|
| <p>Tanins (Catéchiques)</p> |  | <p>+ + +</p> |
| <p>Stérols</p> |  | <p>+ +</p> |
| <p>Phénols</p> |  | <p>+ + +</p> |

F : Feuilles.

- ❖ (+++) : Réaction fortement positive.
- ❖ (++) : Réaction moyennement positive.
- ❖ (+) : Réaction faiblement positive.
- ❖ (-) : Réaction négative.

D'après les résultats du screening phytochimique, nous constatons que notre extrait contient: Divers composés avec une grande abondance pour la plupart. Il s'agit notamment, des phénols, les flavonoïdes, les tanins, quinones et saponines. Tandis qu'une moyenne quantité pour les stérols et les alcaloïdes et faible pour les sucres réducteurs.

Ces résultats confirment que les substances chimiques détectées dans l'extrait hydroalcoolique des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq sont conformes aux travaux de (Bouزيد, 2009) qui a constaté la présence des flavonoïdes et des tanins, dans les fruits de cette plante.

D'autres travaux effectués sur les feuilles de *Crataegus monogyna*, ont confirmé la présence des acides phénoliques (Dinesh et al, 2012). (Saadoudi, 2008) a signalé la présence des sucres réducteurs et (Chang et al, 2002; Verma et al, 2007; Altinterim, 2012; Kumar et al, 2012) ont montré la présence des saponines dans l'aubépine monogyne.

II.2. Dosages spectrophotométrique

Dosages spectrophotométriques sont des analyses quantitatives des extraits, pour objectif la détermination de la teneur de quelques composés phénoliques (poly-phénols totaux, flavonoïdes). Pour chaque dosage, nous avons réalisé une courbe d'étalonnage à différentes concentrations d'étalon.

II.2.1. Dosage des polyphénols totaux

L'estimation quantitative des polyphénols totaux en équivalent d'acide gallique, d'extrait hydroalcoolique des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq a été réalisée par la méthode spectrophotométrique de Folin-ciocalteu (FCR) (Muller et al, 2010). L'acide gallique a été utilisé comme standard pour tracer une courbe d'étalonnage.

Les quantités des polyphénols correspondantes ont été exprimées en μg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait ($\mu\text{gEAG}/\text{mg}$ d'extrait). La formule de la régression linéaire de cette courbe est de $y = 0,0034x + 0,1044$ avec un coefficient de corrélation R^2 égal à 0,997 (Figure 39).

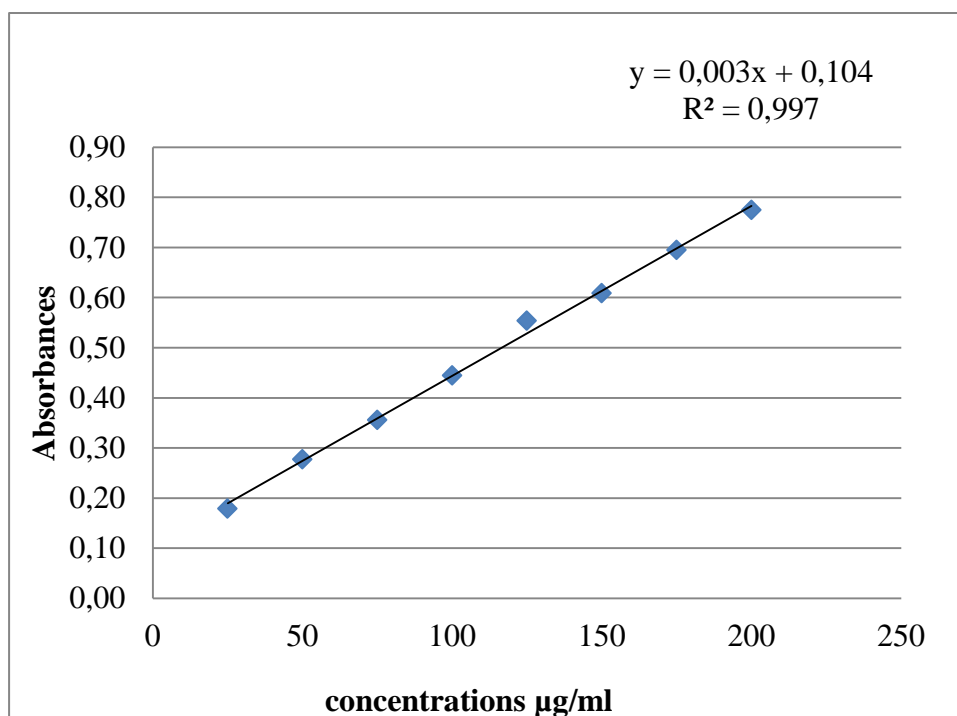


Figure 39: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

II.2.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode (Topçu et al, 2007). La quercétine a été utilisée comme standard pour tracer une courbe d'étalonnage. Les quantités des flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en µg d'équivalent de quercétine par mg d'extrait (µgEQ/mg). La formule de la régression linéaire de cette courbe est de $y = 0,0048x$ avec un coefficient de corrélation R^2 égal à 0,997 (Figure 40).

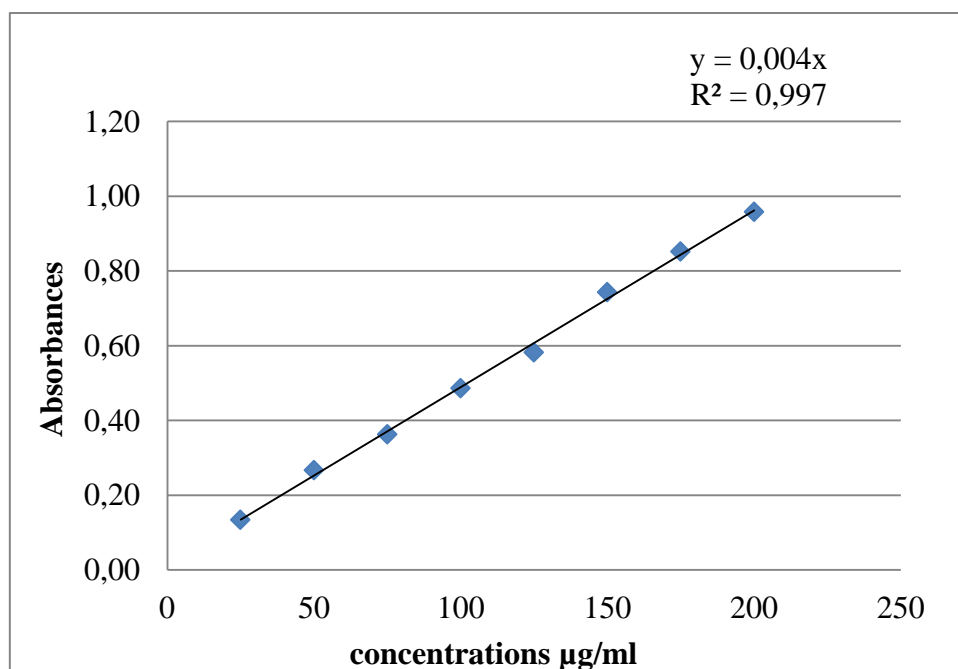


Figure 40: Courbe d'étalonnage de la Quercétine.

Les résultats de Teneur en composés phénoliques sont présentés dans le tableau ci-dessous:

Tableau 07: Taux de polyphénols totaux et des flavonoïdes contenus dans l'extrait méthanolique des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq.

| Extrait des feuilles de <i>Crataegus monogyna</i> | Teneur en polyphénols totaux(μg GAE/mg d'extrait) | Teneur en flavonoïdes(μg QE/mg d'extrait) |
|---|--|---|
| Méthanolique | 201,74 \pm 17,78 | 75,48 \pm 6,77 |

μg GAE/mg: μg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait.

μg QE/mg : μg d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait.

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais \pm SD.

Les résultats du dosage colorimétrique des composés phénolique totaux et des flavonoïdes sont illustrés dans la (Figure 41).

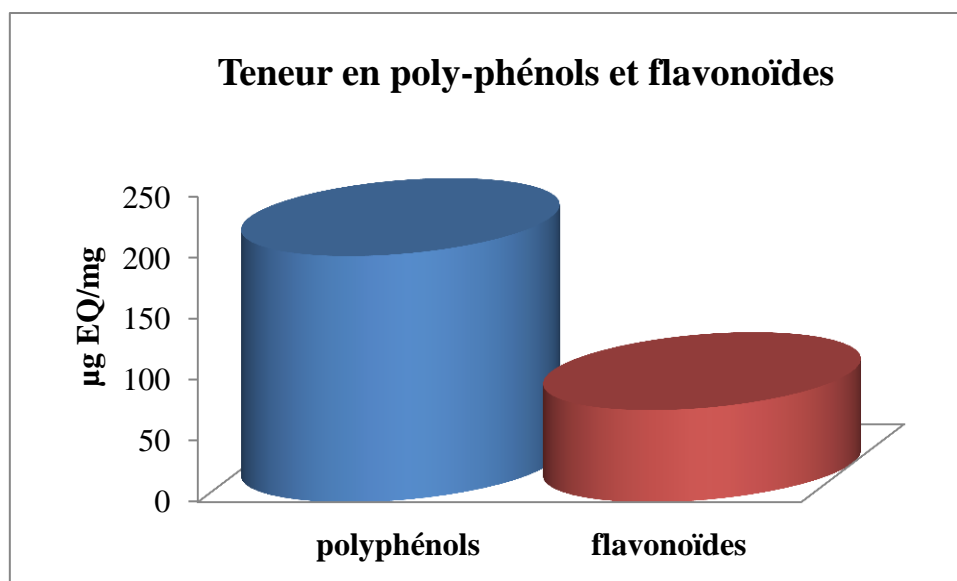


Figure 41: Comparaison des teneurs des polyphénols et des flavonoïdes.

Selon les résultats de (**Tableau 07** et **Figure 41**) on distingue que l'extrait hydroalcoolique des feuilles de *Crataegus monogyna* sont très riches en composés polyphénoliques dont les teneurs obtenues sont :

- ✓ 201, 74±17, 78µg GAE/mg d'extrait hydroalcoolique de *Crataegus monogyna*.

La teneur en flavonoïdes de l'extrait hydroalcoolique des feuilles de *Crataegus monogyna* en équivalent de Quercétine est :

- ✓ 75, 48±6, 77 µg QE/mg d'extrait hydroalcoolique de *Crataegus monogyna*.

Selon (**Hamdaoui et al, 2015**) montrent que les teneurs en phénols totaux et flavonoïdes dans l'extrait méthanolique des feuilles de *Crataegus monogyna*, contiennent respectivement 34.82 ± 0.63 , mg EAG/g de phénols totaux, 17.79 ± 0.55 mg EC /g de flavonoïdes. Mais ces teneurs apparaissent inférieure par rapport à nos résultats.

En effet, plusieurs facteurs peuvent influencer la teneur en composés phénoliques. Des études récentes ont montré que les facteurs extrinsèques (tels que les facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (**Aganga, 2001; Pedneault et al, 2001; Fiorucci, 2006**).

Des travaux antérieurs ont montré que dans les feuilles de *Crataegus monogyna* existent des substances polyphénoliques de plusieurs types : hétérosides du quercétol, rhamnosides, polymères flavanniques, oligomères procyanidines, acide chlorogénique et acide caféique (**Bruneton, 1993; Fong&bouman, 2002; Mohand, 2006**).

II.3. Activités Antioxydantes

Six méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante de l'extrait hydroalcoolique de *Crataegus monogyna* Jacq.

BHA et α -Tocophérol sont utilisés comme standard pour leurs propriétés antioxydantes.

II.3.1. Activité antiradicalaire DPPH

L'activité antioxydante de *Crataegus monogyna* Jacq vis-à-vis du radical libre DPPH a été évaluée spectrophotométriquement à 517 nm en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune. Le standard utilisé est le BHA.

Les résultats de l'activité antiradicalaire au DPPH sont représentés par les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration, ainsi que les valeurs de la concentration d'inhibition 50% sont illustrés dans le (**Tableau 08** et la **Figures 42**) ci-après :

Tableau 08: Pourcentage d'inhibition du antiradicalaire DPPH.

| Extrait | % Inhibition du DPPH | | | | | | | |
|---------|----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------------------|
| | 1.5625 μ g | 3.125 μ g | 6.25 μ g | 12.5 μ g | 25 μ g | 50 μ g | 100 μ g | IC ₅₀ μ g/ml |
| MeOH | 5,77 \pm 1,41 | 10,19 \pm 2,16 | 15,92 \pm 1,14 | 28,64 \pm 2,06 | 49,39 \pm 2,48 | 76,25 \pm 0,32 | Sat | 28,00 \pm 0,97 |
| BHA | 22.21 \pm 1.24 | 31.73 \pm 1.22 | 54.89 \pm 3.60 | 67.60 \pm 1.13 | 76.77 \pm 0.54 | 78.67 \pm 1.31 | 79.01 \pm 0.89 | 6.14 \pm 0.41 |

Sat : Saturation

Les valeurs de l'IC₅₀ de l'extrait ainsi que celle du BHA sont illustrés sous forme d'histogramme (**Figure 42**).

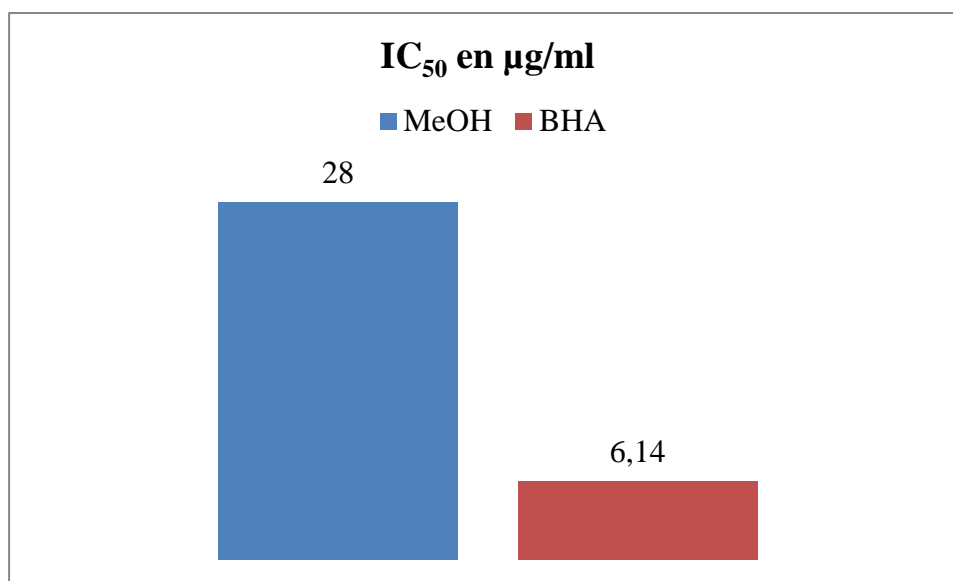


Figure 42: IC₅₀ de l'extrait méthanolique et BHA du test DPPH.

La valeur de l'IC₅₀ exprime la quantité d'antioxydant requise pour réduire de 50% la concentration du radical libre. Elle est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante d'un composé. En effet, plus la valeur de l'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante est grande. Sa détermination permet d'évaluer et de comparer le pouvoir antioxydant de nos échantillons.

Selon les valeurs obtenues de l'IC₅₀ (**Tableau 08** et **Figure 42**). Nous avons constaté que l'extrait méthanolique possède une bonne activité antiradicalaire IC₅₀ égale à 28,00±0,97µg/ml. Cette activité est quatre fois plus faible à celle du standard BHA (IC₅₀=6.14±0.41µg/ml).

Par comparaison aux travaux de (**Hamdaoui, 2018**) qui a montré que l'extrait méthanolique des feuilles de *Crataegus monogyna* possède une IC₅₀ (196.70 ±70 µg/ml), plus faible à celle du standard BHT (IC₅₀ de l'ordre de 4,47µg/ml). Donc notre extrait possède une meilleure activité avec une IC₅₀ égale à 28,00 µg/ml.

II.3.2. Pouvoir réducteur (FRAP: Ferric reducing antioxidant power)

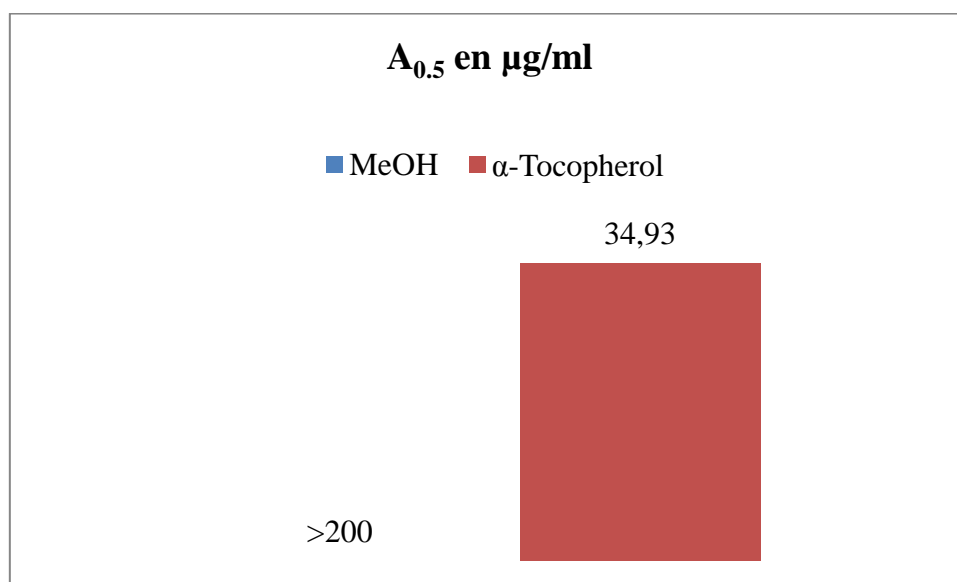
Les résultats du pouvoir réducteur de notre extrait sont représentés par les absorbances pour chaque concentration ainsi que les valeurs de la concentration à absorbance 0,5 pour l'extrait méthanolique des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq et du standard α-Tocophérol (**Tableau 09**).

Tableau 09: Activité du pouvoir réducteur par la méthode du FRAP.

| Extrait | Absorbance | | | | | | | |
|--------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------------|
| | 3.125 µg | 6.25 µg | 12.5 µg | 25 µg | 50 µg | 100 µg | 200 µg | A _{0.5} µg/ml |
| MeOH | 0,13±0,02 | 0,13±0,01 | 0,25±0,04 | 0,29±0,03 | 0,33±0,02 | 0,33±0,05 | 0,46±0,23 | >200 |
| α-Tocophérol | 0.11±0,00 | 0.16±0.00 | 0,21±0,03 | 0,35±0,03 | 0,73±0,03 | 1,37±0,08 | 1,81±0,09 | 34.93±2.38 |

A_{0.5}: la concentration à l'absorbance 0,5.

Les résultats obtenus sont représentés sous forme d'histogramme (**Figure 43**).

**Figure 43:** Valeurs A_{0.5} du test FRAP.

D'après les résultats du (**Tableau 09** et **Figure 43**), nous avons constaté que l'extrait a montré une faible activité (A_{0.5} = >200µg/ml) de la réduction de Fe³⁺ en Fe²⁺ par rapport au standard α-Tocophérol (A_{0.5}=34.93±2.38µg/ml).

Par comparaison aux travaux de (**Serhat et al, 2014**) sur l'extrait éthanolique des feuilles de *Crataegus monogyna* (A_{0.5}: la concentration à l'absorbance 0,5 égale à 0,076µg/ml). Cette activité a été plus active à celle du standard α-Tocophérol (A_{0.5}: la concentration à l'absorbance 0,5 égale à 0,450µg/ml). Ces résultats montrent que l'extrait éthanolique des feuilles *Crataegus monogyna* possède un pouvoir réducteur très intéressant par rapport à notre extrait méthanolique (A_{0.5} =>200µg/ml).

II.3.3. Réduction de cuivre (CUPRAC)

Les résultats de la capacité de réduire le cuivre de l'extrait hydroalcoolique *Crataegus monogyna* sont présentés dans le (Tableau 10).

Tableau 10: Activité de la réduction de cuivre par la méthode du CUPRAC.

| Extrait | Absorbance | | | | | | | |
|---------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------|
| | 1.5625 µg | 3.125 µg | 6.25 µg | 12.5 µg | 25 µg | 50 µg | 100 µg | $A_{0.50}$ µg/ml |
| MeOH | 0,20±0,04 | 0,22±0,02 | 0,26±0,02 | 0,33±0,01 | 0,47±0,07 | 0,65±0,08 | 1,19±0,02 | 28,79±2,10 |
| BHA | 0.23±0.07 | 0.46±0.00 | 0.78±0.01 | 1.34±0.08 | 2.36±0.17 | 3.45±0.02 | 3.76±0.03 | 3.64±0.19 |

Les résultats sont présentés dans l'histogramme illustré dans la (Figure44).

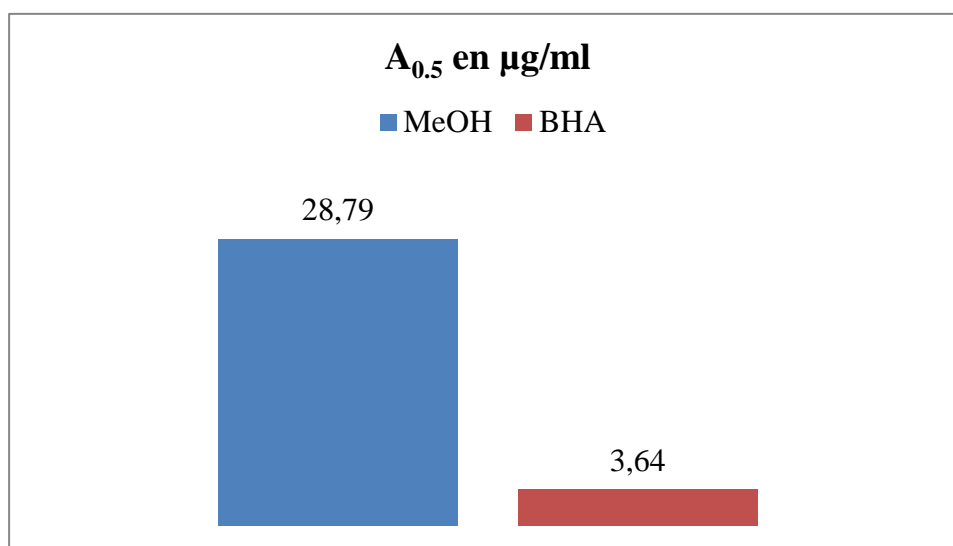


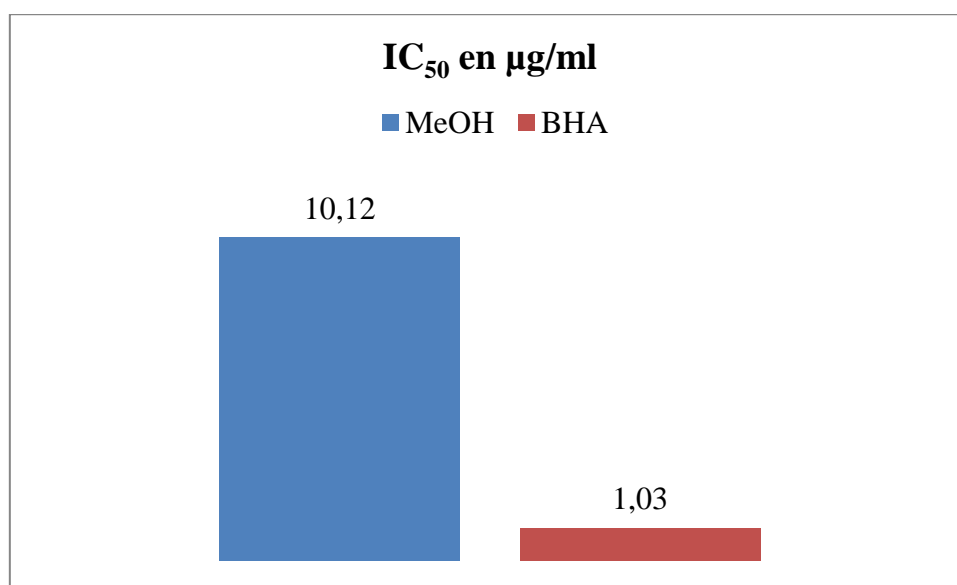
Figure 44: $A_{0.5}$ de l'extrait méthanolique et BHA du test CUPRAC.

A partir des résultats obtenus nous avons constaté que notre extrait a un bon pouvoir réducteur de cuivre ($A_{0.5}=28,79\pm 2,10\mu\text{g/ml}$). Cette activité est huit fois faible à celle du standard BHA ($A_{0.5}=3.64\pm 0.19\mu\text{g/ml}$).

II.3.4. Activité du piégeage du cation radical ABTS⁺

Tableau 11: Test de la capacité antioxydante de l'ABTS.

| Extrait | % Inhibition de l'ABTS | | | | | | | |
|---------|------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------------------|
| | 1.5625 µg | 3.125 µg | 6.25 µg | 12.5 µg | 25 µg | 50 µg | 100 µg | IC ₅₀ µg/ml |
| MeOH | 15,58±0,59 | 24,15±0,42 | 40,07±1,04 | 57,26±2,05 | 82,03±0,54 | 93,43±0,10 | Sat | 10,12±0.60 |
| BHA | 83.42±4.09 | 93.52±0.09 | 93.58±0.09 | 93.63±0.16 | 93.63±0.95 | 94.20±0.90 | 95.39±2.62 | 1.03±0.00 |

Figure 45: IC₅₀ de l'extrait méthanolique et BHA du test ABTS.

D'après les résultats du (Tableau 11 et Figure 45), nous avons constaté que l'extrait a montré une activité très intéressante (IC₅₀=10,12±0.60µg/ml). Cette activité est plus faible par rapport à celle du standard BHA (IC₅₀=1.03±0.00 µg/ml).

Dans une étude réalisée par (Serhat *et al*, 2014) sur l'extrait éthanolique des feuilles de *Crataegus monogyna* une IC₅₀ égale à 97,60±0,46µg/ml et celle du standard BHA (IC₅₀=98,70±0,05µg/ml). Ces résultats montrent que notre extrait méthanolique des feuilles *Crataegus monogyna* (IC₅₀=10,12±0.60µg/ml) possède une activité plus importante par rapport à l'extrait éthanolique.

II.3.5. Activité de phenanthroline

Les résultats de l'activité phenanthroline sont représentés par les absorbances pour chaque concentration ainsi que les valeurs de la concentration à l'absorbance 0,5 de l'extrait et du standard BHA (Tableau 12).

Tableau 12: Test de la réduction de fer par la méthode phenanthroline.

| Extrait | Absorbances | | | | | | | |
|---------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------------|
| | 3.125 µg | 6.25 µg | 12.5 µg | 25 µg | 50 µg | 100 µg | 200 µg | A _{0.5} µg/ml |
| MeOH | 0,24±0,01 | 0,25±0,00 | 0,29±0,01 | 0,38±0,01 | 0,63±0,04 | Sat | Sat | 36,84±1,85 |
| BHA | 0,49±0,01 | 0,59±0,01 | 0,73±0,02 | 0,93±0,01 | 1,25±0,04 | 2,10±0,05 | 4,89±0,06 | 0,93±0,07 |

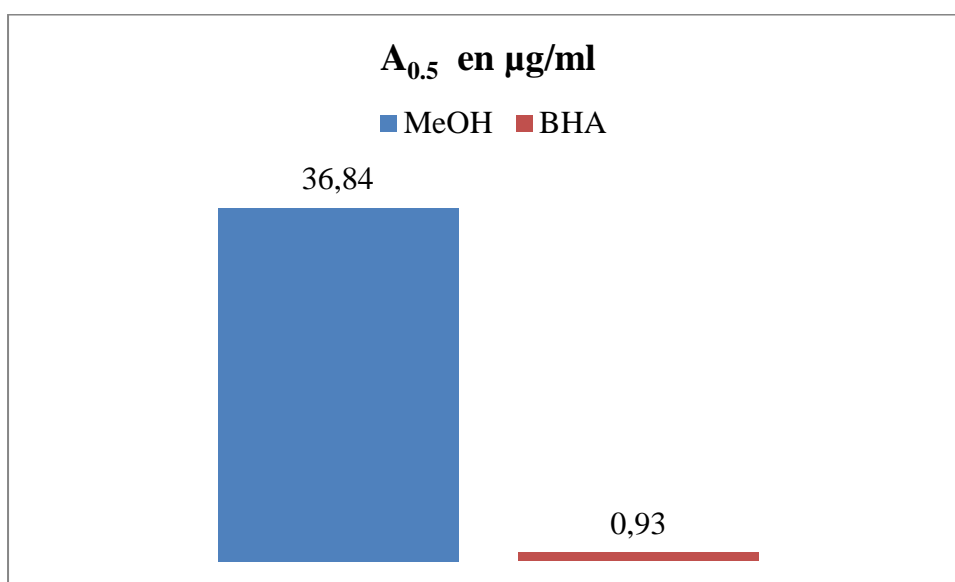


Figure 46: A_{0.5} de l'extrait méthanolique et BHA du test phenanthroline.

D'après les résultats du (Tableau 12 et Figure 46), nous avons constaté que notre extrait possède une bonne activité (A_{0.5}=36,84±1,85µg/ml). Cette activité est plus faible par rapport à celle du standard BHA (A_{0.5}= 0,93±0,07µg/ml).

II.3.6. Activité du radical galvinoxyl GOR

Les résultats de l'activité antioxydante par la méthode de galvinoxyl radical (GOR) sont représentés par les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration ainsi que les valeurs

d'IC₅₀ de l'extrait méthanolique des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq et du standard BHA (Tableau 13).

Tableau 13: La capacité antioxydante du radical galvinoxyl GOR.

| Extrait | % Inhibition du galvinoxyl radical (GOR) | | | | | | | |
|---------|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------------------|
| | 1.5625 | 3.125 µg | 6.25 µg | 12.5 µg | 25 µg | 50 µg | 100 µg | IC ₅₀ µg/ml |
| MeOH | NA | 1,49±1,87 | 7,64±1,45 | 28,02±1,76 | 61,26±0,90 | 72,50±0,44 | Sat | 20,76±0,40 |
| BHA | 25.99±2,56 | 39.15±0.88 | 54.16±0.27 | 65.02±1,26 | 70,19±0.51 | 70.32±0.65 | 70.60±0,10 | 5.38 ±0,06 |

NA : Non absorbance

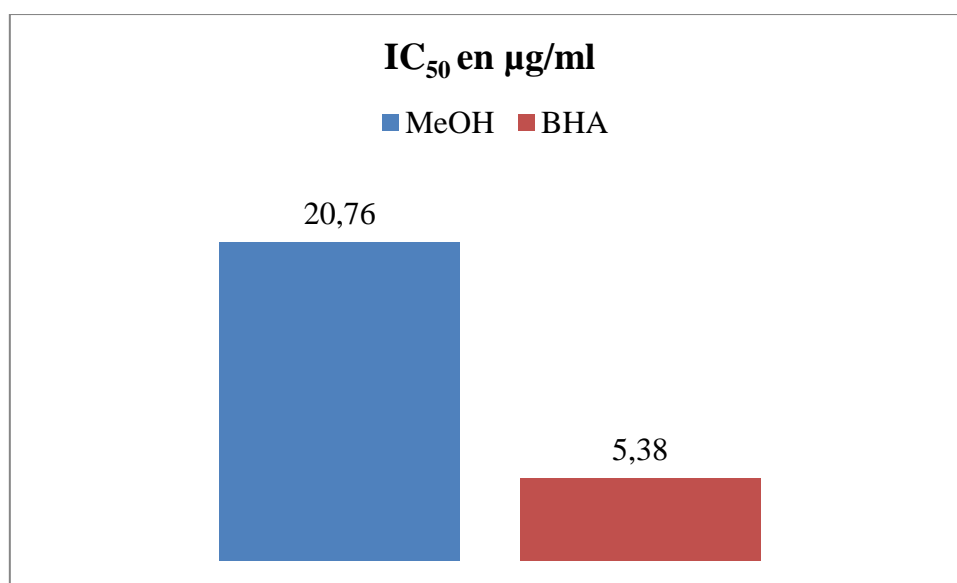


Figure 47: IC₅₀ de l'extrait méthanolique et BHA du test GOR.

A partir des valeurs obtenues du (Tableau 13 et Figure 47), nous avons constaté que l'extrait méthanolique possède une IC₅₀ égale à 20,76±0,40 µg/ml, cette activité est quatre fois plus faible à celle du standard le BHA (IC₅₀=5.38 ±0,06 µg/ml).

En conclusion, il convient de dire que l'extrait hydroalcoolique des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq a manifesté une activité antioxydante importante par sa richesse en flavonoïdes et en composés phénolique qui constituent un facteur de valorisation de la capacité antioxydante de l'extrait, ce qui est confirmé par (Bahourn, 1997) qui a obtenu au niveau des feuilles de *Crataegus monogyna* un taux plus important en polyphénols par rapport aux autres parties de la plante.

Toute fois les solvants, les protocoles, la durée de conservation des échantillons et la température pourraient expliquer les différences constatées entre nos résultats et ceux de la bibliographie (Klervi, 2005; Sokol, 2007).

II.4. Evaluation de l'activité antibactérienne

II.4.1. Résultats

L'activité antibactérienne d'extrait méthanolique préparé à partir des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq, sur la croissance des souches bactériennes testées vis-à-vis de cinq souches pathogène *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC75/2.5), *Escherichia.Coli* (ATCC235) ; et les autre sont des souches clinique : *Proteus mirabilis*, *Streptococcus Sp* et *Staphylococcus aureus*, via la méthode de diffusion en milieu gélosé (méthode de contact). Elle est estimée par le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques, exprimée en mm. Les diamètres des zones d'inhibition induits par les différentes concentrations d'extrait méthanolique sont consignés dans le (Tableau 14) et représentés par la (Figures 48).

Le DMSO sans extrait a été utilisé pour la solubilisation des extraits bruts, en tant que contrôle négatif et n'a montré aucun effet inhibiteur sur la croissance bactérienne et l'utilisation de l'acide gallique comme un témoin positif.

Tableau 14: Diamètres de la zone d'inhibition (en mm) induits par les différentes concentrations en extrait méthanolique testé sur les souches bactériennes.

| bactéries testés | Zone d'inhibition (mm) | | | |
|---|------------------------|---------|---------|---------|
| | 1/2,5 | 1/5 | 1/10 | 1/20 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (Souche clinique) | 14 S | 10 S | 10 S | 10 S |
| <i>Proteus mirabilis</i> (Souche clinique) | 13 S | 10 S | 9 S | 9 S |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC75/2.5) | 12 S | 10 S | 10 S | 10 S |
| <i>Escherichia. Coli</i> (ATCC235) | 11 S | 9 S | 8 S | 8 S |
| <i>Streptococcus Sp</i> (Souche clinique) | 10 S | 9 S | 9 S | 0 R |

R : Résistante.

S : Sensible.

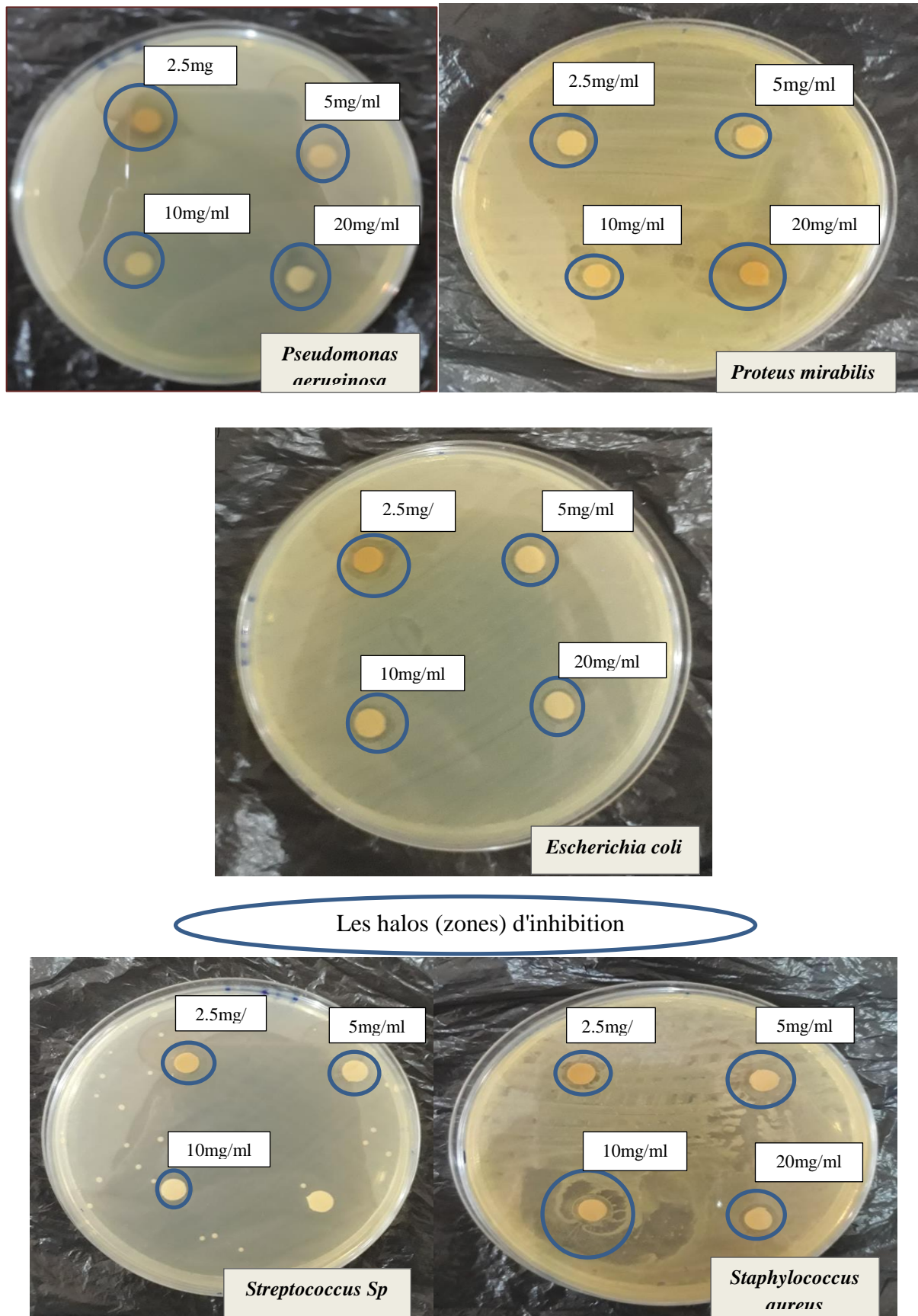


Figure 48: Test de diffusion en milieu gélosé de l'extrait méthanolique de feuilles *Crataegus monogyna* Jacq (Photos originales).

Pour mieux élucider le pouvoir antibactérien de l'extrait méthanolique de la plante, les diamètres de la zone d'inhibition sont représentés graphiquement sur des histogrammes dans les figures suivantes :

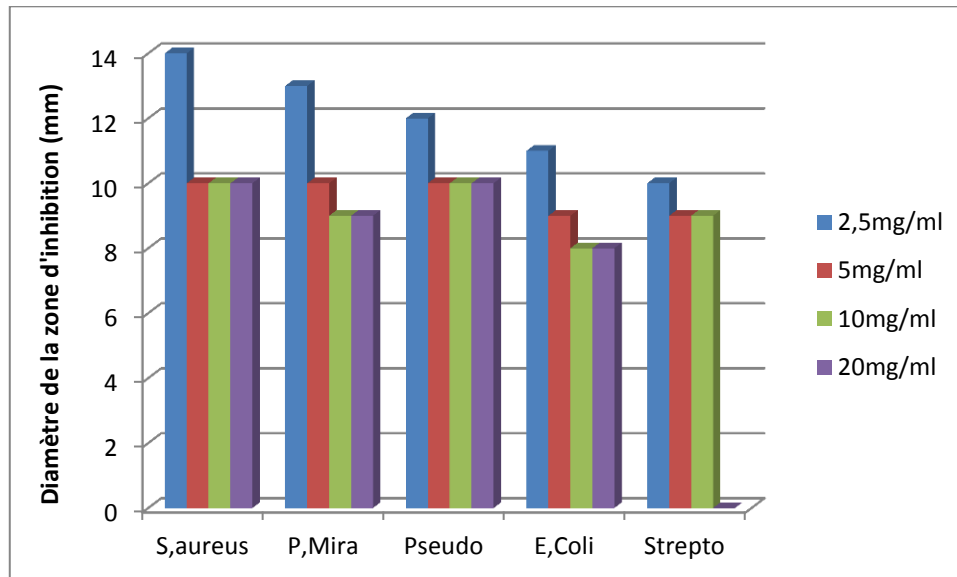


Figure 49: Halos d'inhibition (mm) des cinq souches bactériennes testées par des différentes concentrations d'extrait.

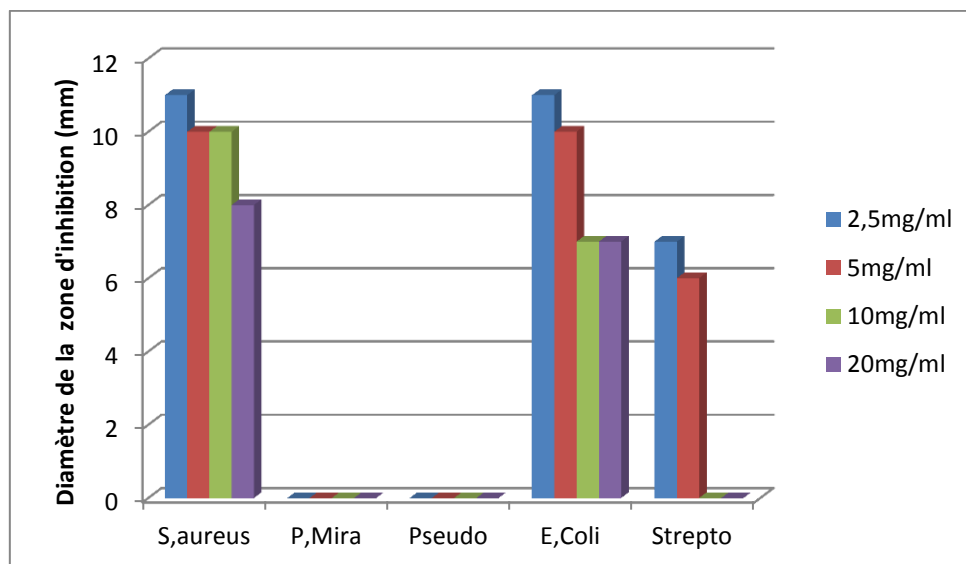


Figure 50: Zones d'inhibition des cinq souches bactériennes testées en fonction des différentes concentrations d'acide gallique.

II.4.2. Discussion

Nous avons étudié le pouvoir antibactérien de l'extrait méthanolique des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq, par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Mueller Hinton).

Les résultats montrent que l'extrait méthanolique du *Crataegus monogyna* Jacq agit de façon différente sur la croissance des souches bactériennes, en y induisant différents diamètres d'inhibition sur la zone de croissance.

Les résultats représentés sur le **Tableau 14**, montrent que l'extrait méthanolique des feuilles, exercent une capacité inhibitrice sur la croissance par un effet clair vis-à-vis les cinq souches bactériennes testées. Pour la souche clinique *Staphylococcus aureus*, est sensible à la concentration élevée de l'extrait méthanolique des feuilles *Crataegus monogyna* Jacq (2,5mg/ml), qui agit sur la croissance de cette souche bactérienne par la formation d'une zone d'inhibition de 14mm de diamètre. L'activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus* d'extrait méthanolique pourrait s'expliquer par la présence de différents constituants, notamment les flavonoïdes (Sato et al, 1995; Milane, 2004; Hatano et al, 2005), les tanins et les acides phénoliques (Scalbert, 1991; Bruneton, 1993; Elegami et al, 2002; Hatano et al, 2005; Sanogo, 2006; Shan et al, 2007; Surveswaran et al, 2007) sont des substances antibactériennes importantes.

La croissance des souches bactériennes par la formation de zones d'inhibition avec des diamètres de l'ordre 13 mm, 12 mm respectivement sur *Proteus mirabilis* (souche clinique), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC75/2.5) à 2.5mg/ml. Alors que celle-ci a révélé la sensibilité de deux souches à notre extrait méthanolique.

En ce qui concerne *Escherichia coli* (ATCC235), cette souche est moyennement sensible à l'extrait méthanolique des feuilles, engendré un diamètre d'inhibition de 11 mm à 2,5mg/ml.

Nous constatons aussi que l'extrait méthanolique donne une capacité inhibitrice variant entre 9mm et 10mm sur *Streptococcus Sp* (soucheclinique), et à 20 mg/ml devient résistant.

Le solvant diméthylesulfoxyde (DMSO) utilisé pour dissoudre l'extrait brut, n'a aucune activité inhibitrice sur les souches testées.

On peut conclure que l'extrait méthanolique des feuilles *Crataegus monogyna* Jacq, a une activité importante sur les germes testés (**GRAM+** et **GRAM-**), avec un halo d'inhibition

observe au tour des disques entre 8 à 14mm varie d'une souche a une autre. Cet effet demeure fort par rapport à celui du témoin positif (Acide gallique).

La confrontation des observations de **(Hamdaoui, 2018)** avec les nôtres, permet de faire ressortir que l'extrait méthanolique des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq a un pouvoir inhibiteur très important. Ce pouvoir inhibiteur pourrait s'expliquer par la présence dans l'extrait suscitée, selon leur polarité, de substances polyphénoliques bioactives **(Wang et al, 2008)**. Dans ce contexte, **(Hamdaoui et al, 2015)** ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq est très riche en polyphénols, en phénols totaux et en flavonoïdes.

L'efficacité d'un extrait dépend de sa concentration, de la plante de laquelle est issu et de la souche testée **(Klervi, 2005)**, ce qui explique que l'activité antibactérienne peut varier d'une plante à une autre et d'un germe à autre **(Yameogo, 2003)**. Selon **(Diallo, 2005)**, l'extraction des principes actifs par un solvant comme le dichlorométhane augmente l'activité antibactérienne. Même pour les solvants de solubilisation tels que le DMF ou le DMSO sont utilisés couramment dans les tests «*in vitro*» **(Elias et al, 1991)**.

Plusieurs travaux ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram (+) par rapport aux Gram (-) **(Turkmen et al, 2007; Falleh et al, 2008)**, Ceci peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram (-) et Gram (+). Les bactéries Gram (-), indépendamment de la membrane des cellules, possèdent une couche additionnelle la membrane externe, qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules. Néanmoins, la présence des porines dans cette couche permettra la diffusion libre des molécules avec une masse moléculaire en-dessous de 600 Da; et aussi rend la membrane imperméable à la plupart des agents biocides **(Fauchere, 2002; Bouhdid et al, 2006)**.

Nos résultats sont difficilement comparables avec ceux de la bibliographie étant donné que les méthodes utilisées sont différentes, le choix du protocole d'extraction et plus particulièrement celui du solvant est très important. En effet, selon la polarité du solvant, les composés d'extrait ne sont pas les mêmes.

D'après la recherche réalisée on a constaté que l'Aubépine *Crataegus monogyna* Jacq de la région de Skikda, a un pouvoir antibactérien important.



Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les substances naturelles occupent de plus en plus une place importante de choix en thérapeutique. En effet, les plantes médicinales constituent de véritables usines chimiques dont il faut tirer le maximum de profit.

L'investigation phytochimique et les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes ainsi que la valorisation par l'évaluation d'effet antioxydant et antibactérien de l'extrait méthanolique de la partie aérienne (feuilles) de *Crataegus monogyna* Jacq de la région de Bouchatâta – Skikda ont été évalués dans le présent travail.

Le criblage phytochimique indique la richesse des feuilles de *Crataegus monogyna* en métabolites secondaires caractérisé par des réactions colorées a montré la présence d'une grande abondance des phénols, flavonoïdes, tanins, quinones et saponines. Tandis qu'une quantité modérée pour les stérols et les alcaloïdes, mais faible pour les sucres réducteurs.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux de l'extrait hydroalcoolique (feuilles) *Crataegus monogyna* Jacq a été effectuée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique est caractérisé par une richesse en polyphénols (201,74µg GAE/mg) et en flavonoïdes (75,48 µ g QE/mg).

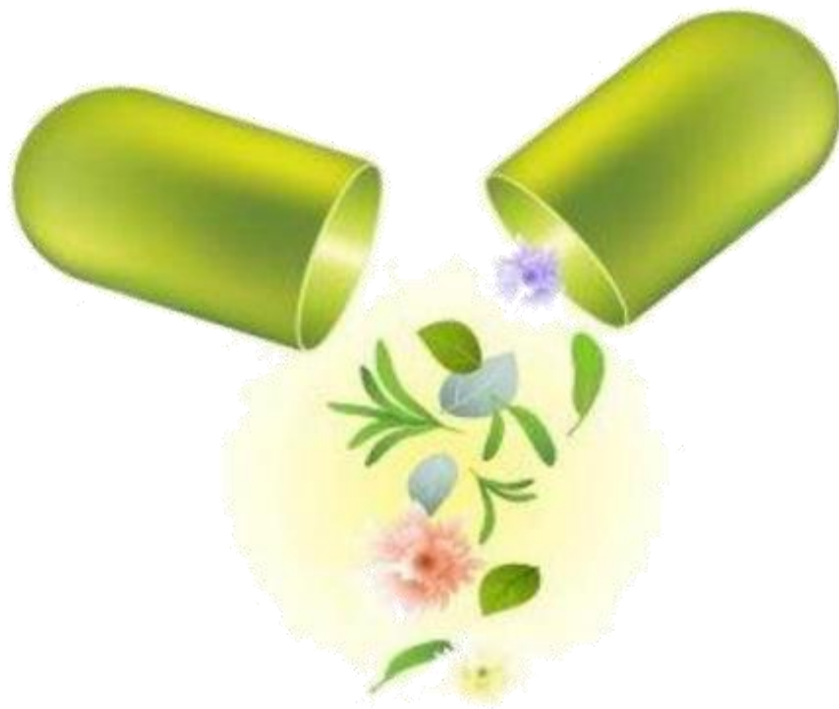
Les résultats sur l'ensemble des tests biologiques "in vitro" d'extrait méthanolique montre que l'extrait possède une activité antioxydante intéressante par sa richesse en flavonoïdes et en composés phénolique. Il a montré une activité importante vis-à-vis du radical DPPH, CUPRAC, ABTS, phenanthroline, GOR et un faible pouvoir réducteur.

L'évaluation du pouvoir antibactérien d'extrait méthanolique de *Crataegus monogyna* Jacq (des feuilles) par la méthode de diffusion en milieu solide gélose, a révélé que notre extrait possède un pouvoir antibactérien par une capacité inhibitrice important qui agit de façon différente sur la croissance des souches bactériennes, en y induisant différents diamètres d'inhibition sur la zone de croissance, par exemple la souche clinique *Staphylococcus aureus* à la plus forte activité a été obtenue avec une zone d'inhibition 14mm à la concentration de 2.5mg/ml.

Les résultats obtenus montrent la richesse de la plante médicinale *Crataegus monogyna* Jacq (Aubépine monogyne) en composés métabolique et possède une activité antioxydante et antibactérienne importante, ce qui confirme son utilisation traditionnelle et comme un remède dans différents domaines tels que le domaine pharmaceutique.

Ce travail peut être considéré comme un point de départ pour d'autres recherches sur les effets bénéfiques de *Crataegus monogyna* Jacq telle que :

- ✚ Testant d'autres méthodes d'extraction et leurs influences sur le rendement et la composition chimique de l'extrait.
- ✚ Utiliser d'autres méthodes d'analyse chimique de l'extrait (Chromatographie sur colonne, HPLC).
- ✚ Faire des études expérimentales " *in vivo*" sur des espèces animales.



Références bibliographiques

A

- Adesokan. A. A., Akanji. M. A., and Yakubu. M.T., 2007.** Antibacterial potentials of aqueous extract of *Enantia chlorantha* stem bark, African Journal of Biotechnology, 6 (22): 2502 - 2505.
- Aganga A.A., Mosase K.W., 2001.** Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capussa*, *Ziziphus mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. Animal Feed Science and Technology, 91:107-113.
- Ait Yahia L., Zemmoura H., 2014.** Etude de l'effet d'un stress oxydatif et système défensif enzymatique chez le blé dur (*Triticum durum desf.*). Mémoire de master. P 20.
- Al-Fatimi M., Wurster M., Schroder G., Lindequist U., 2007.** Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. Journal of Ethnopharmacology, 111:657–666.
- Altinterim Başa., 2012.** AlıçBitkisinin(*Crataegus Monogyna*) Kardiyovasküler Etkileri. KSU Doğa Bil. Derg. 15(3).
- Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S.E., 2004.** Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion re-ducting capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52, 7970–7981.
- Avimadj M., 2008.** Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. Mitochondrial medicine. Gvozdjakova A (Ed) PP 19-43.
- Avril J-L., Dabernat H., Dens F., Monteil H., 1992.** Bactériologie clinique. 2ème Edition ellipses. P 185, 189, 193.
- Aymonin G.G., 1993.** Guide des arbres et des arbustes. Sélection du Reader' s Digest (Ed). Paris, P 351.

B

- Bahorun T., 1997.** Substances naturelles actives, la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. AMAS. *Food and Agricultural Research*. Conseil Mauritus, 83-94.

- Bahorun T., Grinier B., Trotin F., Brunet G., Pin T., Luncky M., vasseur J., Cazin M., Cazin C et Pinkas M., 1996.** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations *.Arzneimittel-Forschung*, **46**(11):1086-1089.
- Baraduc, R., Darfeuille-Michaud, A., Forestier, C., Jallat, C., Joly, B., and Livrelly, D., 2000.** Précis de bactériologie clinique. Editions ESKA: 1115-1126.
- Barry. A.L; and Thornsberry. C., 1985.** Susceptibility test, diffusion test procedure, American Journal of Clinical Pathology, 19: 492 – 500.
- Bauer. A.W ; Kirby. W.M.M; Sherris. T.C ; and Truck. M., 1966.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method, American Journal of Clinical Pathology, 45:493 - 496.
- Beal M.F., 1995.** Aging, energy and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annals of Neurology*, **38**: 357–366.
- Beloued A., 1998.** Etymologie des noms de plantes de bassin méditerranéen. OPU(Ed). Alger, P 91.
- Benaissa O., 2011.** « Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *chrysanthemum* et *rhantherium* », Thèse Doctorat, université Mentouri Constantine.
- Benaissa.B., 2012.** Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose). Thèse de doctorat de l'université de Toulouse. P30.
- Bezanger-Beauquesne L., Pinkas M., Torck M. et Trotin F., 1990.** Plantes médicinales des régions tempérées. Ed. Maloine. 155-231.
- Blois M.S., 1958.** Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*. 181: 11 fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*, 7(1):3-8.
- Boudraa S., 2008.** Etude de la fraction minérale et vitaminique des fruits de *Celtis australis* L., *Crataegus azarolus* L., *Crataegus monogyna* Jacq., *Elaeagnus angustifolia* L. et *Ziziphus lotus* L. Mémoire de magister. Université el Hadj Lakhdar. Batna.

Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Skali N.S., Abrini J., 2006. Thymus essentialoils : Chemical composition and in vitro antioxydant and antibacterial activities. Congr  international de Biochimie, Agadir.

Bouzid W., 2009. Etude de l'activité Biologique des extraits du fruit de *Crataegus monogyna* jacq. Mémoire de Magister. Université Elhadj Lakhder -Batna.

Brosse J., 2000. Larousse des arbres et arbustes .Larousse (Ed).Canada, P P576.

Bruneton, J., 1993. "Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales". 2  me édition. Tec et Doc (  d). Paris.P 914.

Bruneton J., 1993. " Pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales". Lavoisier (  d). Paris. P 278-279.

Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales, 3eme édition, Tec et Doc (Ed). Paris P 658.

Bruneton J., 1999. Pharmacognosy : phytochemistry, medicinal plants. Ed. Tec et Doc.100-757.

(Bactériologie, 2003) : Web

Université PARIS-VI Pierre et Marie Curie, Faculté de Médecine Pitié-Salp  tri  re, *Bactériologie*, DCEM1, 2002-2003, service de bactériologie, Mise à jour le : 24 mars 2003. P 122. <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/bacterio.pdf>.

C

Cadenas E., Davies K.J., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, **29**(3-4): 222–230.

Cano A., Acosta, M., Arnaro, M.B., 2000. A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. *Redox Rep.*, 5: 365-370.

Caron F., 2012. Antimicrobial susceptibility testing: A four facets tool for the clinician. *Journal des Anti-infectieux*, 14, 168-174.

Chang Q, Zuo Z., Harrisson F., Chow M.S., 2002. Hawthorn. *J. Clin. Pharmacol*, **42**:605-612.

- Chang S., Tan C., Frankel E. N., Barrett D. M., 2000.** Low-Density Lipoprotein Antioxidant Activity of Phenolic Compounds and Polyphenol Oxidase Activity in Selected Clingstone Peach Cultivars. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48: 147-151.
- Chevalier L., Crouzet-Segara C., 2004.** Médicaments à base des plantes. Masson (Ed). Paris, P 354.
- Chugh S.N., Kakkar R., Kalra S. and Sharma A., 1999.** An evaluation of oxidative stress in diabetes mellitus during uncontrolled and controlled state and after vitamin E supplementation. *Journal of the Association of Physicians of India*, 47(4): 380–383.
- Cohen J H., Kristal A R., Stanford J L., 2000.** Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 61-68.
- Cowan M.M., 1999.** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4): 564-582.
- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C. Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G., 2000.** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88, 170–175.
- Crete P., 1965.** Précis de botanique. Tome II. Systématique des angiospermes. Masson (Ed). Paris, P 429.
- Cui, T., Li, J., Kayahara, H., Ma, L., Wu, L. et Nakamura, K., 2006.** "Quantification of the polyphenols and triterpene acids in chinese hawthorn fruit by high-performance liquid chromatography". *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13): 4574-4581.
- Curtin J F, Donovan M, Cotter TG., 2002.** Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J of Imm Methods*. 265, 49-72.

D

- Damianaki A., Bakogeorgou E., Kampa M., Notas G., Hatzoglou A., Panagiotou S., Gemetzi C., Kouroumalis E., Martin P. M. and Castanas E., 2000.** "Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells." *J Cell Biochem* 78(3): 429-441.
- Davies, J.R., 2000.** "Hawthorn". Element Books Limited (Éd). Boston. MA.

- Degenring F.H., Suter A., Weber M., Saller R., 2003.** A randomised double blind placebo controlled clinical trial of standardised extract of fresh *Crataegus* berries in the treatment of patients with congestive heart failure NYHA II. *Phytomedicine*, **10**: 363-369.
- Delarras, C., 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôles sanitaire. Editions : médicales internationales. Paris : Lavoisier, P 357, 248, 250, 339.
- Delattre, J., Beaudoux, J. L., & Bonnefont-Rousselot, D., 2005.** Radicaux libres et stress oxydant (aspects biologiques et pathologiques). Tac & doc.
- Diallo, A.M., 2005.** "Etude des plantes médicinales de niafunke (region Tombouctou) Phytochimie et pharmacologie de *Maerua crassifolia* Forsk. (Capparidacée)". Thèse de Doctorat. Université de Bamako. P 125.
- Dinesh K., Vikrant A., Zulfi qar A.B., Nisar A K., Deo N.P., 2012.** The genus *Crataegus*: chemical and pharmacological perspectives Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian *Journal of Pharmacognosy*. The genus *Crataegus*: chemical and Aop05712 .ISSN 0102-695X.
- Ding Y., Yao H., Yao Y., Fai L. Y., Zhang Z., 2013.** "Protection of dietary polyphenols against oral cancer." *Nutrients* 5(6): 2173-2191.
- Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N., 2006.** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97 (4): 654-660.
- Djerroumi A., Nacef M., 2004.** 100 plantes médicinales d'Algérie. Ed. Palais du livre. 51-108.
- Dohou, N., Yamni, K., Gmira, N., Idrissi Hassani, L.M., 2003.** Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine Thymelaealythroïdes, *Bull. Soc. Bordeaux*. P 142, 61-78.
- Domnez A., 2004.** The genus *Crataegus* L. (*Rosaceae*) with special reference to hybridation and biodiversity in Turkey. *Journal of Chromatography*, **28**: 23-29.
- Dorman H.J.D., Deans H.J.D., 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88 (2) 308–316.

Doughari. J.H; Pukuma. M.S ; and De. N., 2007. Antibacterialeffects of *Balanites aegyptiaca* L. Drel. And *Moringaoleifera* Lam. On *Salmonella typhi*. African Journal of biotechnology, **6** (19) :2212 – 2215.

Durackova Z, Djrolo F, Hougbe H, Avode G, Attoulou V, Addra B, Kodjoh N, Avimadj M., 2008. Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. Mitochondrial medicine. Gvozdjakova A (Ed) P 19-43.

Duraffourd C., D’Hervicourt L. et Lapraz J. C., 1990. Cahiers de phytothérapie clinique. 1. Examens de laboratoires galénique. Eléments thérapeutiques synergiques. 2ème éd. Masson, Paris.

E

Edin H., Nimmo M., 1999. Contrôle des denrées alimentaires. Laboratoire CANTONAL (Ed).Paris, P 66.

Espinel-Ingroff.A., 2007. Standardized Disk Diffusion Method for Yeast with the National committee for Clinical and Laboratory Standards institute (CLSI formerly NCCLS) M44-A reference method for testing *Candida spp.* Clin. MicrobioL New, 29(13): 97-100.

Elegami A.A., Elnino E.I., Eltohami M.S., MuddathistK., 2002. Antibacterial activity of somespecies of family Combreateaceae. *Phytotherapy research*, **16**:555-561.

F

Fabre.M.C., Genin A., Merigoux.J., Moget.É., 1992. Des recettes simples avec des plantes simples pour resoudre les problems simples.Herboristerie Familiale. P : 1-103.

Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C., 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. C. R. Biologies. P : 372-379.

Farhat, R., 2007. "Etude de la fraction lipidique et la composition en acides gras des huiles des fruits de :*Celtis australis* L., *Crataegus azarolus* L., *Crataegus monogyna* Jacq., *Elaeagnus angustifolia* L., et *Ziziphus lotus* L.". Mémoire de magister (Agronomie), Université El Hadj Lakhdar. Batna. P : 109.

Favier A., 2003. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'act Chim.* 108 - 115.

Ferreira de Lima M. R., de Souza Luna J., Feitosa dos Santos A., Cano de Andrade M. C., Goulart Sant' Ana A. E., Genet J.P., Marquez B., Neuville L., Moreau N., 2006. Antibacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethno pharmacology*, 105: 137-147

Fiorucci S., 2006. Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat. Nice, P 211.

Flamini G. Cioni P.L., Puleio R., Morelli I., Panizzi L., 1999. Antimicrobial activity of the essential oil of *Calaminthanepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi. *Phytother Res.*, 13(4): 349-351.

Fong H.s., Bauman J.L., 2002. Hawthorn. *Journal of Cardiovascular Nursing*, 16(4):1-8.

Frenod E., 2006. Existence result for a model of *Proteus mirabilis* swarm. *DifferIntergEquat*, 19(16): 697-720.

Faucher J.L., Avril, J.L., 2002. "Bactériologie générale et médicale". Tome I. Ellipses (Éd). Paris, P : 214.

G

Garcia M.D., Saenz M.T., Ahumadam.C., Cert A., 1997. Isolation of three triterpenes and several aliphatic alcohols from *Crataegus monogyna* Jacq. *Journal of Chromatography*.

Georgantelis D., Ambrosiadis I., Katikou P., Blekas G., Georgakis S.A., 2007. Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat Science*. P : 172-181.

Girre L., 2000. Les plantes médicinales. Ouest-France (Ed). Rennes, P : 30.

Gutteridge J., 1992. Invited review free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Rad Res Comm.* 19, 598-620.

H

Hadduchi.F ; Chaouche.TM ; Ksouri.R., 2014. Phytochemical screening and in vitro antioxidant activities of aqueous-extracts of *Helichrysumstoechas subsp. rupestre* and *Phagnalonsaxatile subsp. saxatile*. Chin J Nat Med 12:415–22.

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P., 2007. Le stress oxydant. *Revue Medicale de Liege*, 62(10), 628-38.

Halenge. J., 2007. Le stress oxydant: 628.

Halliwell B., 2006. reactive species and antioxidants.redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology* 141(2),312-322.

Hamdaoui, M., Mehdadi Z., et Chalane, F., 2015. "Evaluation quantitative de quelques polysaccharidespariétaux et polyphénols chez l'aubépine monogyne (*Crataegus monogyna* Jacq.) du Mont de Tessala (Algérie Occidentale)". *European Journal of Scientific Research*, 128: 233-244.

Hamdaoui M., 2018. Valorisation biochimique et comportement germinatif de *Crataegus monogyna* Jacq. Du mont de Tessala (Algérie occidentale). Thèse de doctorat en sciences. P 83.

Hatano T., Kusuda M., inada K., Ogawa T.O., Shiota S., Tsuchiya T., Yoshida T., 2005. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, **66**:2047-2055.

Herrera C.M., 1984. Seed dispersal and fitness determinants in Wild rose : combined effects of Hawthorn, birds , mice and browsing ungulates .Spain , **63**:386-393.

76(7):340-342.

I

Iqbal H., Moneeb.Ur Rehman Khattak., Riazullah., Zia Muhammad., Naeem Khan; Farhat Ali Khan; ZahoorUllah., SajjadHaider., 2011 : Phytochemicals screening and antimicrobial activities of selected medicinal plants of *Khyberpakhtunkhwa* Pakistan African Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol. 5(6), P : 746-750.

J

Jaureguy F., 2009. Host and bacterial determinants of *Escherichia coli* extra intestinal infections. *Med Sci- Paris*. 25(3): 221-223.

K

Kalish D., 2014. Expression phytochimique des plantes (cas Fabaceae) face aux stress écologiques..Thème de Licence. University d'Ouargla.

Karagözler A., Erdag B., Calmaz Emek Y., 2008, Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Food Chemistry*, 111(2), P : 400-407.

Karp, G., 2010. Biologie cellulaire et moléculaire : Concepts and experiments. *Edition De Boeck Supérieur*, P : 35.

Kashyap.CP., Arya.V., Thakur.N., 2012. Ethnomedicinal and phytopharmacological potential of *Crataegus oxyacantha* Linn. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*: 1194-1199.

Klervi L.L., 2005. "Connaissance chimio-taxonomique du genre *Turbinaria* et étude des composés de défense de différents espèces de Sargassacées des Iles Salmon (Pacific sud) ". 210p.

Koffi.N; Beugré.K ; Guédé.N.Z ; Dossahoua.T ; Laurent.A ., 2009. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire), *Sciences & Nature* Vol.6 N°1:1 – 15.

Koyuncu T., Pinar Y., Lule F., 2007. Convective drying characteristics of Azerol (*Crataegusmonogyna* Jacq.) and yellow (*Crataegus aronina*) fruit. *Journal of Food Engineering*, 78:1471-1475.

Kumar.D., Arya.V., Bhat .Z.q.A., Khan.A.N., Prasad.D.N., 2012. The genus *Crataegus*: chemical and pharmacological perspectives. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22(5): 1187-1200.

L

- Lakshmi P.B ., Mahesh M., Deepthi., 2012.** Development and Validation of Nabumetone by isocratic RP- HPLC method. *International Research Journal of Pharmaceutical.* 2 (2): 92-98.
- Lee J., Koo N., Min D.B., 2004.** Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3 (1), 21-33.
- Lemery.N,** (de l'Académie royale des sciences). *Traité universel des drogues simples.* 4^{ème} édition. Laurent D'houry, Paris. P : 621-622.
- Leon Leminor., 1989.** Michel Veron. *Bactériologie Médicale.* 2^{ème} Edition. Paris. P : 396-795.
- Liu.P., Kallio.H., Lü.D., Zhou.C., Yang B., 2011.** Quantitative analysis of phenolic compounds in Chinese hawthorn (*Crataegus* spp.) fruits by high performance liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. *Food Chemistry*, **127**:1370–1377.
- Ljubuneire P., portonaya I., Cognan U., Azaich H, and Bomzon A., 2005.** Antioxydant activity of *Crataegus aronia* aqueous extract used in traditional Arab medicine in Israel. *Journal of Ethnopharmacology*, **101**:153-161.

M

- Maataoui, B.S., Hmyene, A., Hilali, S., 2006.** Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*, 7(1):3-8.
- Mandell G., Bennett J. and Dolin R., 2009.** Enterobacteriaceae, Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. Churchill Livingstone, An Imprint of Elsevier. PP: 56.
- Maria A, Vera V ., Juan A., Monotoya S., Calva G., Emma G., Raminrez R., 2005.** Extraction, thermal stability and kinetic behavior of pectin methyl esterase from hawthorn (*Crataegus pubescens*) fruit. **5**:2-6.
- Mazzochi J., Dalioche G., Frenol U., 1999.** Glaner dans le midi. Tetrass (Ed). Paris, P : 169.
- Mességué M., 1975.** Mon herbier de santé. Ed. Robert Laffont. P : 52-232.
- Milane H., 2004.** La quercétine et ses dérivés : molécule à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, étude et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat .Paris, P : 155.
- Miller A.L.** Botanical influences on cardiovascular disease., **1998.** *Altern Med Rev.* (6): 422-431.

- Mitchetti A., 1992.** Tous les arbres de nos forêts. Bordas (Ed). Belgique, P : 414.
- Mohand A.Y., 2006.** "Plantes médicinales de Kabylie (préface du docteur Jean-Philippe Brette)." Ibis Press (Éd). Paris. P : 99-102.
- Mohammedi Z., 2006.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de magister. Université de Tlemcen.
- Molyneux, P., 2004.** "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity." Songklanakarin journal . Sci. Technol 26(2): 211-219.
- Müller L., Gnoyke S., Popken A.M., V. Böhm V., 2010.** Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. LWT - Food Science and Technology, 43: 992–999.
- Musa, K.H., Abdullah, A., Al-Haiqi, A., 2016.** Determination of DPPH free radical scavenging activity : Application of artificial neural networks. Food Chemistry, 194, 705-711.

N

- Najjaa.N; Zouari.S; Arnault.I; Auger.J ; Emna.A ; Neffati.M., 2011.** Différences et similitudes des métabolites secondaires chez deux espèces du genre *Allium* *Allium roseum* L. et *Allium ampeloprasum* L, Acta Bot. Gallica, 158(1), 111-123.
- Nascimento G. F., Locatelli J., Freitas P. C., Silva G.L., 2000.** Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Brazilian Journal of Microbiology, 31(4) : 247-256.
- Nauciel C., Vildé JL., 2005.** Bactériologie médicale. Ed. Masson. France. P : 77, 141.
- Ndiaye, Adjaoumou Kairy, épouse Loum., 2005.** Les entérobactéries sécrétrices de Beta-Lactamases à spectre élargi. Thèse de doctorat : Pharmacie. Dakar : Université Cheikh Anta Diop. P : 07.
- Nordmann P., Cuzon G., Naas T., 2009.** The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. Lancet Infect Dis, 9(4): 228-236.

Nostro A., Germano M.P., D'Angelo V., Marino A. and Cannatelli M.A., 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters en Microbiologie Appliquée* 30,379.

O

Orban, J. C., 2010. Oxygène, stress oxydant. Chapitre : Désordres métaboliques et réanimation, P : 427-437.

Osakabe, N., Baba, S., Yasuda, A., Iwamoto, T., Kamiyama, M., Takizawa, T., Itakura, H. and Kondo, K., 2001. "Daily cocoa intake reduces the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation as demonstrated in healthy human volunteers." *Free Radic Res* 34(1): 93-99.

Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307–315.

özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R., 2011. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *TrAC Trends in analytical chemistry*, 30(4), 652-664.

P

Packer L., Weber S U., 2001. The role of vitamin E in the emerging field of nutraceuticals. *In*: Kramer K, Hoppe P P and Packer L. *Nutraceuticals in health and disease prevention*. New York (Marcel Dekker), PP: 27-43.

Palmer H.J., Paulson K.E., 1997. Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutrient Reviews*, 55: 353-361.

Papadopoulou A., Frazier R. A., 2004. Characterization of protein-polyphenol interactions. *Trends in Food Science and Technology*, 15: 186-190.

Pastre J.O.C., 2005. Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de docteur vétérinaire., Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Paul, S.F., 2006. "Guide des plantes médicinales (Analyse description et utilisation de 400 plantes)" .Delachaux et Niestlé (Éd). Paris. P : 112-113.

Pedneault K., Leonharts., Angenol., Gosselin A., Ramputh A., Arnason J. T., 2001. Influence de la culture hydroponique de quelques plantes médicinales sur la croissance et la concentration en composés secondaires des organes végétaux. Texte de conférence. Canada, 1-5.

Percival G.C., Keary I.P., AL-Habsi S., 2006. An assessment of the drought tolerance of Fraxinus genotypes for urban landscape plantings. Urban Forestry and Urban Greening, 5:17-27.

Philips A; Philips. S; Arul. V; Padmakeerthiga. B; Renju. V; Santha. S; 2010. Free radical scavenging activity of leaf extracts of Indigofera aspalathoides – An in vitro analysis, Journale Pharm Sci Res, 2: 322-328.

Pierre L., 2004. "Le livre des arbres, arbustes & Arbrisseaux". Actes Sud (Éd).P : 212- 221.

Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO., 1999. L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. Vaiss Coeur Poumons. 4(5), 359-370.

Pittler M.H., Shmidt K., 2003. Hawthorn extract for treating chronic heart failure. Am. Journale .Med, 114(8):665-674.

Ponce A. G., Fritz R., Del Valle C. et Roura S.I., 2003- Antimicrobial activity of oils on the native microflora of organic Swiss chard. Society of Food Science and Technology (Elsevier).36: 679-684.

Q

Quezel P. et Santa S., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 1, Ed CNRS, Paris.

R

Rameau JC., Mansion D., 1989. Flore forestière française, G.DUM2, IDF.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Bio. Med. 26, 1231–1237.

Reichheld J. P., Meyer, E., Khafif M., Bonnard, G., Meyer, Y., 2005. At NTRB is the major mitochondrial thioredoxin reductase in Arabidopsisthaliana. FEBS Lett. 579(2): 337- 342.

Ros, J., et Treadway S., 1999. "Herbal Support for a healthy Cardiovascular system". *Adv.NutritionPub. Inc.*, 6 (16): 6.

S

Saadoudi M., 2008. Etude de la fraction glucidique des fruits de : *Celtis australis*L., *Crataegus azarolus* L., *Crataegus monogyna* Jacq., *Elaeagnus angustifolia* L. et *Ziziphuslotus* L. Mémoire de magister. Université de Batna.

Sana Driss., 2010. Effet d'un apport exogène en resvératrol sur le stress oxydatif induits par un exercice physique intense chez des cyclistes novembre. P : 11

Sanago, R., 2006. « Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle », *Univ.Bamako Mali*, vol. 53.

Sanogo R., Diallo D., Diarra S., Ekoumon C., Bougoudougou F., 2006. Activité antibactérienneet antalgique des deux recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaireset la cystite au Mali. *Mali Medical*, 1 :18-24.

Sato M., Tsuchiya H., Takase I., Kureshiro ., Tanigaki S., Iinuma M., 1995. Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics *Phytother. Res.* 9(7): 509-12.

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

Schroeter H., Boyd C., Spencer J. P., Williams R. J., Cadenas E., Rice-Evans C., 2002. "MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide." *Neurobiol Aging* 23(5): 861-880.

Schroder D., Weiser M., Klein P., 2003. "Efficacy of a homeopathic *Crataegus* preparation compared with usual therapy for mild (NYHA II) cardiac insufficiency: results of an observational cohort study". *Europn. Journal. Heart. Fail.*, 5: 319-26.

Selvaraj N., Bobby Z. and Sathiyapriya V., 2006. Effect of lipid peroxides and antioxidants on glycation of hemoglobin: an *in vitro* study on human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*, 366: 190–195.

- Serhat Keser , Sait Celik , Semra Turkoglu , Ökkes Yilmaz , et Ismail Turkoglu., 2014.** L'étude de certains composés bioactifs et des propriétés antioxydantes de l'aubépine (*Crataegus monogyna* subsp. *Monogyna* Jacq). *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*.3 (2): 51–55.
- Shi H, Noguchi N, Niki E., 2001.** Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. *Methods Enzymol* 2001;335:157-66.
- Silva da costa J.F., 2011.** *Crataegus* sp., uma planta com interesse terapêutico. Universidade Fernando Pessoa. Faculdade de Ciências da Saúde.
- Singh U., Devaraj S., Jialal I., 2005.** Vitamine E, Oxidative stress, and inflammation. *Ann Rev of Nut.* 25, 151-175.
- Singleton V.L., Rossi J.A.J., 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphor molybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* 16:144-58.
- Sokol L.A., J., Oszmiansk., wojdylo, A., 2007.** "Antioxydant activity of the phenolic compounds of Hawthorn, pine and skullcap." *Food chemistry*, 103: 853-859.
- Sparska T.H., Martin T., 1999.** Yields of hawthorn *Crataegus monogyna* berries under different hedgerow management. *Agricultur. Ecosystems and Environnement*, **72**: 107-110.
- Stomper M.J., Hennekens C.H., Manson J.E., Colditz G.A., Rosner B., Willett W.C., 1993.** A prospective study of vitamin E consumption and risk of coronary disease in women. *New England Journal of Medicine*, **328**: 1444–1449.
- Svedstrom U., Vuorela H., Kostianen R., Huovinen K., Laakso I., Hiltunen R., 2002.** High-performance liquid chromatographic determination of oligomeric procyanidines from dimers up to the hexamer in hawthorn. *Journal of chromatography A*, **968**: 53–60.
- Svedstroma U., Vuorela H., Kostianen R., Leak I., Hiltunen R., 2006.** Fractionation of polyphenols in hawthorn into polymeric procyanidins, phenolic acids and flavonoides prior to high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **11**(12):103-111.
- Surveswaran S., Cai Z.Y., Cark H., Sun M., 2007.** Systematic evaluation of natural phenolic antioxidant from 133 indian medicinal plants. *Food chemistry*, **102**: 938-953.

Szydłowska-Czerniaka A, Dianoczi C, Recseg K, Karlovits G, Szlyk E., 2008. Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*; 76:899-905.

T

Topçu G., Ay A., Bilici A., Sarıkürkcü C., Öztürk M., and Ulubelen A., 2007. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry* 103: 816–822.

Tsimikas S., Brilakis E.S., Miller E.R., McConnell J.P., Lennon R.J., Kornman K.S., Witztum J.L. and Berger P.B., 2005. Oxidized phospholipids, Lp (a) lipoprotein, and coronary artery disease. *New England Journal of Medicine*, 353(1): 46–57.

Turkmen N., Velioglu Y.S., Sari F., Polat G., 2007. Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*. P :484-496.

U

Urbonaviciute A., Jakstas V., Kornysova O., Janulis M., Maruska A., 2006. Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single styled hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq) ethanolic extracts. *Journal of Chromatography A*, 11(12): 339-344.

V

Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M. and Mazur M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1–40.

Vamecq J., Vallée L., Storme L., Gelé P., Bordet R., 2004. Les acteurs immédiats du stress oxydatif. *La lettre du pharmacologue*, 18(1), 16-23.

Veveris M., et al., 2004. "Crataegus special extract WS®, 1442 improves cardiac function and reduces infarct size in a rat model of prolonged coronary ischemia and reperfusion". *Life Science*, 74: 55-1945.

W

- Wang, J., Ho, L., Zhao, W., Ono, K., Rosensweig, C., Chen, L., 2008.** "Grape-derived polyphenolics prevent Abeta oligomerization and attenuate cognitive deterioration in a mouse model of Alzheimer's disease". *Journal of Neurosci.*, 28 : 6388-6392.
- Wardman P., Caneias Fenton L.p., 1996.** *Chemistry an introduction radiation Res.*, 145 : P/5326531.
- Werckenthin, Christiane, Marisa Cardoso, Jean-Louis Martel, Stefan Schwarz., 2001.** "Antimicrobial Resistance in Staphylococci from Animals with Particular Reference to Bovine *Staphylococcus aureus*, Porcine *Staphylococcus Hyicus*, and Canine *Staphylococcus Intermedius*." *Veterinary Research*, vol : 32, no :3-4. P : 341-362.
- Wichtl M., Anton R., 2003.** *Plantes thérapeutiques : Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique.* Ed. Tec et Doc.152- 624.
- Williams P .A., Buxton R.P., 1986.** Hawthorn (*Crataegus monogyna*) populations in midcanterbury. *New Zealand Journal of Ecology*, 9: 11-17.
- Wu C. H., Lin J. A., Hsieh W. C., Yen G. C. 2009.** "Low-density-lipoprotein (LDL)-bound flavonoids increase the resistance of LDL to oxidation and glycation under pathophysiological concentrations of glucose in vitro." *J Agric Food Chem* 57(11): 5058-5064.

Y

- Yameogo, N., 2003.** "Etude de la contribution de l'aviculture traditionnelle urbaine et périurbaine dans la lutte contre les pathologies aviaires au Burkina Faso". CRDI. Université d'Ouagadougou.
- Yanar M, Ercisli S, Yilmaz KU, Sahiner H, Taskin T, Zengin Y, Akgul I. and Celik F., 2011.** Morphological and chemical diversity among hawthorn (*Crataegus* spp.) genotypes from Turkey. *Scientific research and essays*, 6(1): 35-38.
- Yano Y., Satomi M., Oikawa H., 2006.** Antimicrobial effect of spices and herbs on vibrio parahaemolyticus. *International J. Food microbiology*, 111 :6-11.
- Yao M., Ritchie H.E., Woodman P.D.B., 2008.** A reproductive screening test of hawthorn. *Journal of ethnopharmacology* 118: 127-132.

Yoshihara D., Fujiwara N., Suzuki K. 2010. "Antioxidants: benefits and risks for longterm health." *Maturitas* 67(2): 103-107.

Yves, LE LOIR, GANTIER Michel., 2009. *Staphylococcus aureus*. Lavoisier.

Yves-Alain B., Janat A., Mamyrbekova B., Boua B; Fézan H. Trabi., Ehouan E., 2007. Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthiana* (Baill.) Herend. and Zarucchi (Caesalpinaceae), *Sciences & Nature* Vol. 4 N°2 : 217 – 225.

Z

Zapfe G., 2001. "Clinical efficacy of *Crataegus* extracts ws 1442 in congestive heart failure NYHA class II". *Phytomedicine*, 8(4): 262-6.

Zaidi B., 2019. Utilisation de plusieurs méthodes colorimétriques *in vitro* pour l'évaluation des activités biologiques de trois plantes médicinales. P 27.

Zelko IN, Marian TJ, Folz RJ., 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad Biol & Med.* 33. 337-349.

Zhang D.L., Zhang Y.T., Yin J.J., zhao B.L., 2004. Oral administration of *Crataegus* flavonoids protects against ischemia reperfusion brain damage in gerbils. *Journal of Neurochemistry*, 90: 211-219.

Zhang X., 2002. WHO monographs on selected medicinal plants volume 2. World Health Organization, 69-329.

Zhang Z., Hoa K.K., Huang Y., Cena zhen Y., 2006. Hypocholesterolemic activity of hawthorn fruit in mediated by regulation of cholesterol-7- hydroxylase and acyl coa: cholesterol acyltransferase. *Food Research* ,35:885-891.

Zhihua J., Iias S.J.A., Ying M., Linda J., Jinming S., Siqi Z., Shujun L., Ruiying W., Tianzhu Z., Ganglin Y., Junqiu L., Jiacong S., Guimin L., 2004. Expression of selenocysteine-containing glutathione S-transferase in *Escherichia coli*. *Biochem and Bioph Res Commun.* Vol 321:94–101

Zouhdi M., Bassima D., Lamnaouer Z., Hajjam M., Alaoui A., 1997. Activité antibactérienne de quelques plantes médicinales au maroc. *Biologie Infectiologie*, 3(2).

Site web consulté :

Anonyme 01 : <http://futureforests.ie> (Consulté le 22.04.2019).

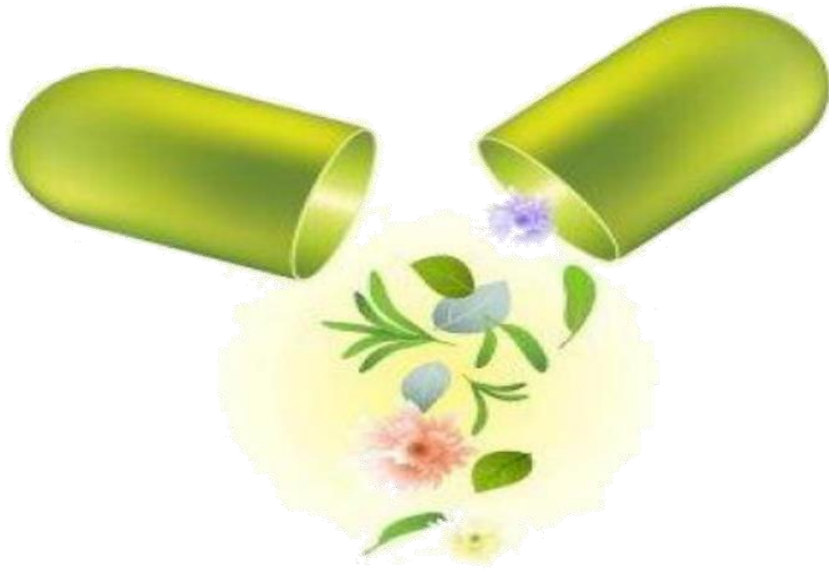
Anonyme 02 : jardinoscope.canalblog.com (Consulté le 22.04.2019).

Anonyme 03 : www.medicalexpo.fr (Consulté 05.06.2019).

Anonyme 04 : <http://pixels.com> (Consulté le 13.05.2019).

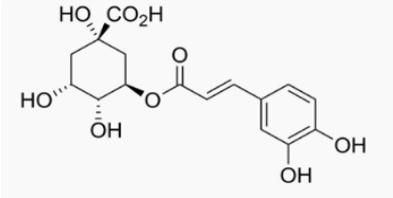
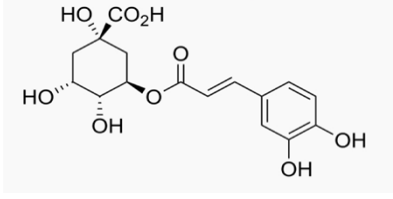
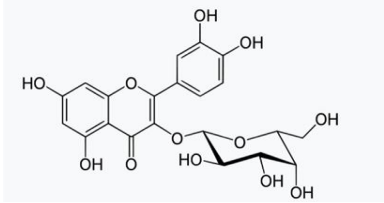
Anonyme 05, 06 et 07 : <https://fr.m.wikipedia.org> (Consulté le 13.05.2019).

Anonyme 08 : <https://www.google.com/maps/vt/data> (Consultée 15-06-2019).



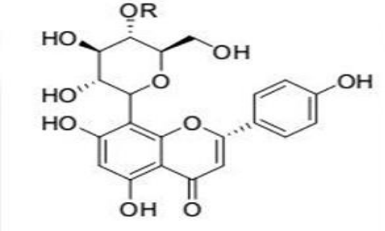
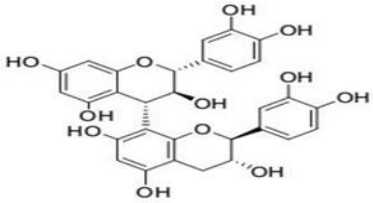
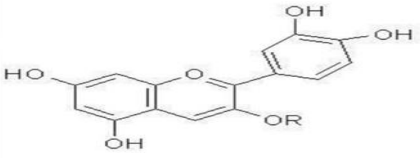
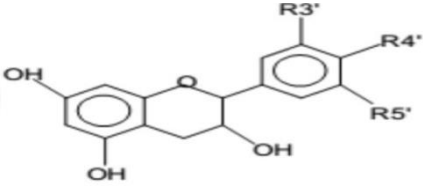
Annexes

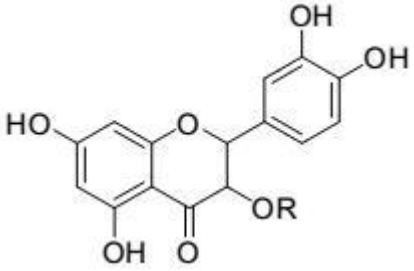
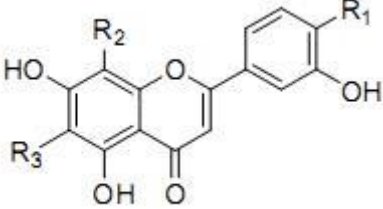
I. Composition en métabolites secondaires *Crataegus monogyna* Jacq**I.1. Les acides phénoliques****Tableau 01:** Les composés phénoliques du *Crataegus monogyna* Jacq (**Dinesh et al, 2012**).

| Le nom | Molécules | Caractéristiques |
|----------------------------|---|--|
| Acide chlorogénique |  | Acide phénolique |
| Acide caféique |  | Acide phénolique |
| Hyperoside |  | C'est un composé polyphénolique |

I.2. Les flavonoïdes

Tableau 02: Les flavonoïdes du *Crataegus monogyna* Jacq (Dinesh et al, 2012).

| Le nom | Molécules | Caractéristiques |
|------------------------------|--|---|
| Vitexine-2-rhamnoside |  | Classe : Flavonoïdes |
| Proanthocyanidine |  | Classe : Flavonoïdes |
| Anthocyanine |  | Classe : Flavonoïdes Sont des glycosides des anthocyanidines |
| Epicatchine |  <p data-bbox="703 1776 855 1805" style="text-align: center;">R4=R5=OH</p> | Classe : Flavonoïdes Sub classe : Flavones |

| | | |
|---|--|--|
| <p>Quercétine</p> |  | <p>Classe : Flavonoïdes Sub classe : Flavonols</p> |
| <p>A pigenin-6,8-di-C-glycosides</p> |  <p>R1= H</p> <p>R2=R3=gly</p> | <p>Classe : Flavonoides Sub-classe: flavones</p> |

II. Matériel utilisé dans la réalisation de l'activité antioxydante

II.1. Produits chimiques

Tableau 03: les réactifs utilisés dans l'activité antioxydante.

| | DPPH | ABTS | CUPRAC |
|-----------------|--|---|---|
| Produits | 1- Ethanol 2- DPPH 3- α -tocopherol 4- BHA 5- BHT 6- Quercetine 7- ou Catéchine 7- Extrait de plante | 1- $K_2S_2O_8$ 2- ABTS 3- Eau distillé 4- Ethanol 5- α -Tocophérol, BHA | 1- Eau distillé 2- Acetate d'ammonium 3- $(Cu Cl_2, 2H_2O)$ 4- 8+8Neocupronin 5- BHT, α -Tocophérol |

| | Pouvoir réducteur | GOR | Phenanthroline |
|--|--|---------------------------------------|--|
| | 1- TCA 2- $K_3Fe(CN)_6$ 3- $FeCl_3$ 4- phosphate buffer 5- Eau distillée | 1- Galvinoxyl, 2- free radical | 1-Phenanthroline 2-Ferricchloride $FeCl_3$ 3-MeOH, Eau distillée 4- BHT |

II.2. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC) Réactifs utilisés

✚ Préparation des solutions:

- $m = 1,927$ g Acetate d'ammonium ($ACNH_4$) + 25 ml (H_2O) → S1 transparent (PH=7.0)
- $m = 0,042625$ g ($Cu Cl_2, 2H_2O$) + 25 ml (H_2O) → S2 bleu
- $m = 0,039$ g (Neocupronin) + 25 ml (EtOH) → S3

1- ajouter la solution S1 au plat qui contient les extraits → pour lecture

2- mélanger la solution S2 et S3 → pour lecture

3- le CUPRAC prend une heure de temps pour lecture

$M(Cu Cl_2, 2H_2O) = 170,50$ g/mol

$M(ACNH_4) = 77$ g/mol

$M(Neocupronin) = 208,27$ g/mol

II.3. Test ABTS (acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique))

✚ Procédure : préparation de ($ABTS^+$) (solution)

A partir de l'ABTS et du persulfate de potassium $K_2S_2O_8$: les deux produits en solution aqueuse sont mélangés et mis à l'abri de la lumière pendant 12- 16H ; l'absorbance de la solution ainsi obtenue est ajustée par (Ethanol ou H_2O) à 0.700 ± 0.020 à 734 nm avant l'usage.

(ABTS⁺) → 19,2 mg (7 mM) ABTS + 5 ml H₂O + 3,3 mg (2.45 mM) (K₂S₂O₈) + 5 ml H₂O + attendre 16 heure à l'abri de la lumière

M (ABTS) = 548, 68 g/mol

M (K₂S₂O₈) = 270, 32 g/mol

La mesure de l'absorbance de l'ABTS avec le spectrophotomètre comme suit :

1 ml (ABTS) + 50 µl H₂O ----- 1.41 nm

1 ml (ABTS) + 75 µl H₂O ----- 0.98 nm

1 ml (ABTS) + 85 µl H₂O ----- 0.87 nm

1 ml (ABTS) + 90 µl H₂O ----- 0.83 nm

1 ml (ABTS) + 100 µl H₂O ----- 0.73nm

A = 0.70 - 0.75 nm de l'ABTS⁺

II.4. Activité de phenanthroline

✚ Préparation:

- **Phenanthroline (0.5%)**

0.05g de 1,10-Phenanthroline dans 10ml de MeOH

- **Ferricchloride FeCl₃ (0.2%)**

0.02g de FeCl₃ dans 10ml de H₂O

Préparation de réactif Mayer :

(10 g de KI + 2.70 g de Hgcl₂ + 20 ml de l'eau distillé)

KI: iodure de potassium.

Hgcl₂:chlorure de mercure

- **Préparation de NaoH :**

1N 40 g 1000 ml (eau distillée).

1N 2 g 50 ml.

0.1 N 0.2 g 50 ml.

• **Préparation de Feheling :**

Solution A :

-Dans un erlenmeyer de 250 ml :

Dissoudre 7 g de sulfate de cuivre penta hydraté dans 100 ml de l'eau distillé.

Solution B :

-Dans un erlenmeyer de 250 ml :

Dissoudre 34.6 g de tartrate double de sodium et de potassium et 10 g d'hydroxyde de sodium dans 100 ml de l'eau.

III. Matériel utilisé dans la réalisation de l'activité antibactérienne

III.1. Milieu de culture

On a utilisé comme milieu de culture la gélose Mueller-Hinton (MH) pour l'étude de la sensibilité des souches bactériennes à différentes concentrations d'extraits méthanolique.

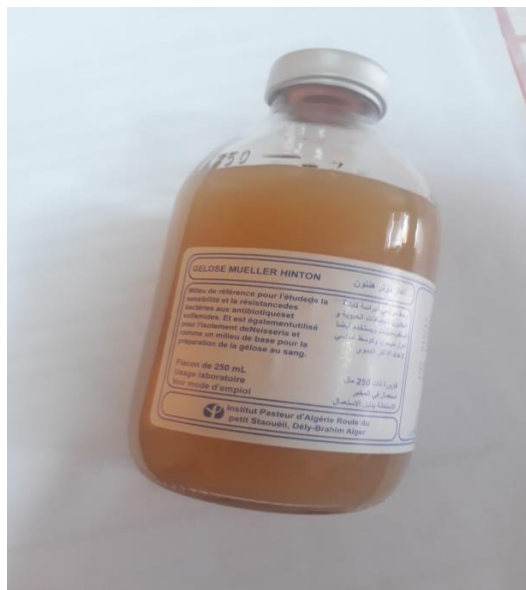


Figure 01: Milieu de culture gélose Mueller Hinton (MH) (Photo originale).

III.2. Appareillage a utilisé

Tubes à essai en verre (GM), tubes à essai avec tige stérile, boîtes de pétrie, micropipette, embouts stériles, Balance, Bec bunsen, étuve, pipette pasteur, anse de platine, papier Whatman découpé en disque entre 6 mm à 8 mm.



Figure 02:Montre le matérielles a utilisé (photo originale).

III.3. Solvants et produits utilisés

Extrait méthanolique des feuilles d'Aubépine *Crataegus monogyna* Jacq, Eau distillée stérile, Eau physiologique, Acide Gallique, Acide Ascorbique, DMSO.

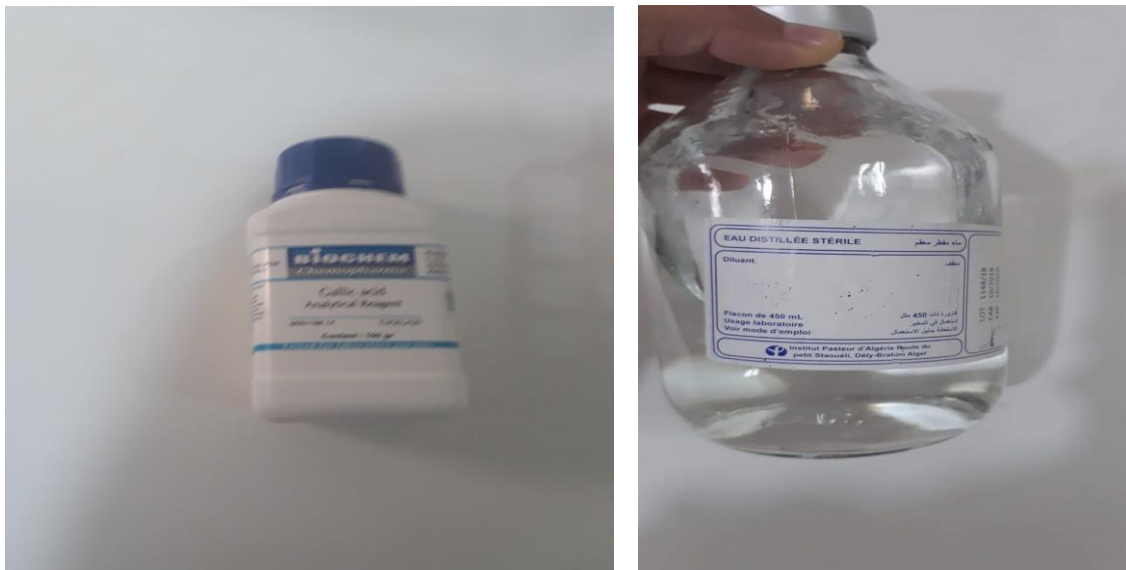


Figure 03: Représente l'Acide Gallique, Eau distillée stérile qu'on a utilisée

(Photos originales).

IV. Méthode de diffusion

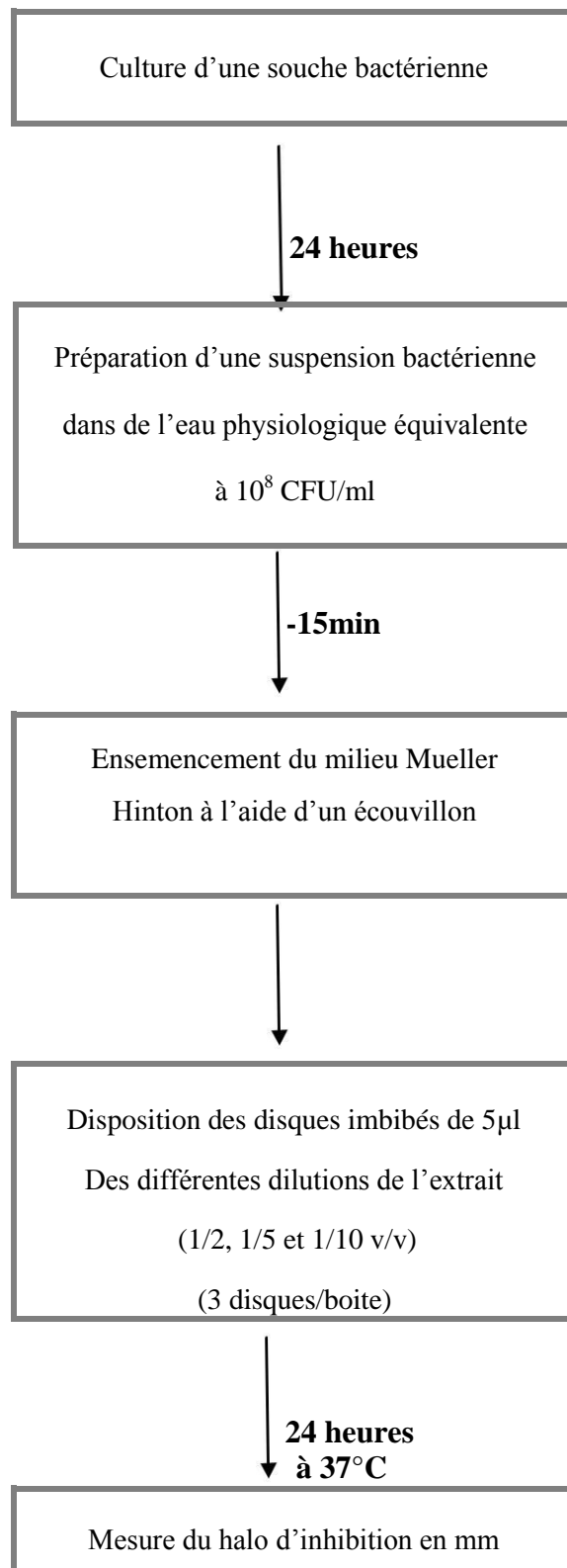


Figure 04: Etapes de réalisation du test de l'activité antibactérienne (Duraffourd et *al*, 1990).

VI. Dosage des flavonoïdes

VI.1. Préparation des solutions

Pour 1 M Potassium acétate (CH_3COOK) on dissout 9.80 gramme de (CH_3COOK) dans 100 ml d'eau distillé pour obtenir la solution (S1).

Pour 10% nitrate d'aluminium ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) on pèse 10g de ce produit dans 100ml d'eau distillée.

A- Préparation de l'extrait de plante

Une masse de 1 milligramme d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de méthanol pour obtenir la solution (S2).

B- Préparation de la gamme d'étalon de la Quercetin

On prend 1 mg de la Quercetin et on le dissout dans 5 ml de méthanol pour obtenir la solution 0,2mg/ml S_m .

Les dilutions sont préparées dans des eppendorfs comme la suite :

Quercetin(25) \longrightarrow 25 μl S_m + 175 μl MeOH

Quercetin(50) \longrightarrow 50 μl S_m + 150 μl MeOH

Quercetin (75) \longrightarrow 75 μl S_m + 125 μl MeOH

Quercetin(100) \longrightarrow 100 μl S_m + 100 μl MeOH

Quercetin (125) \longrightarrow 125 μl S_m + 75 μl MeOH

Quercetin(150) \longrightarrow 150 μl S_m + 50 μl MeOH

Quercétine (175) \longrightarrow 175 μl S_m + 25 μl MeOH

Quercetin(200) \longrightarrow 200 μl S_m + 0 MeOH

VI.2. Dosage des poly-phénols totaux

1- Préparation de Carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5% :

7,5 gramme de Na_2CO_3 sont dissouts dans 100 ml d'eau distillé.

2- Préparation de l'extrait de plante :

Une masse de 1 mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de l'eau distillée (ou Méthanol).

3- Préparation de Folin-Ciocalteu (FCR) dilué 10fois

1ml de la solution FCR concentré (2M) est complété à 10ml avec l'eau distillée (9ml).

VI.3.Gamme d'étalonnage :

Préparation de la gamme d'étalon de l'acide gallique :

On prend 0,5 mg de l'acide gallique et on le dissout dans 5 ml de Méthanol pour obtenir la solution S₁ (0,2mg/ml). Les dilutions sont préparées dans des eppendorfs comme la suite:

25µg/ml —————> 25µl de S1+ 175µl de MeOH

50 µg /ml —————> 50µl de S1+ 150µl de MeOH

75µg/ml —————> 75µl de S1+ 125µl de MeOH

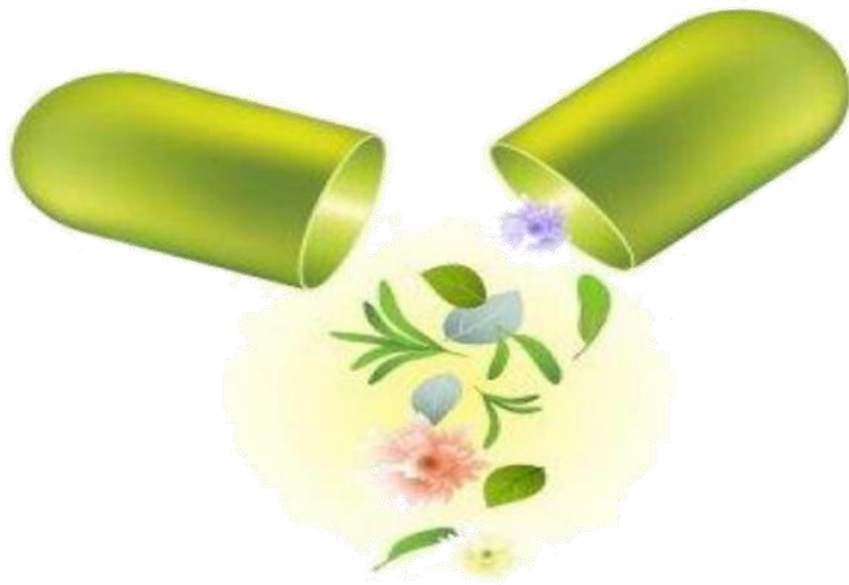
100µg/ml —————> 100µl de S1+ 100µ de MeOH

125µg /ml —————> 125µl de S1+ 75µl de MeOH

150µg /ml —————> 150µl de S1+ 50µl de MeOH

175 µg /ml —————> 175µl de S1+ 25µl de MeOH

200µg /ml —————> 200µl de S1



Résumé

Résumé

L'Aubépine monogyne ou *Crataegus monogyna* est une plante médicinale utilisée depuis l'antiquité en médecine traditionnelle, reconnue par ses vertus thérapeutiques.

L'objectif de cette étude porte sur une étude phytochimique des polyphénols et des flavonoïdes, l'évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne « *in vitro* » de l'extrait méthanolique de la partie aérienne (Feuilles) de *Crataegus monogyna* Jacq de la famille des *Rosaceae*.

Les tests phytochimiques ont révélé que cette plante est riche en flavonoïdes, tanins (Catéchiqes), Quinones, Saponines et Stérols.

Le dosage des composés phénoliques a montré que l'extrait est riche en phénols totaux avec une teneur de 201,74 μ g EAG/mg d'extrait, tandis que la quantité des flavonoïdes est estimée à 75,48 μ g EQ/mg d'extrait.

Six méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *Crataegus monogyna* Jacq. Ce dernier a manifesté une activité antioxydante importante par les méthodes de DPPH ($IC_{50}=28,00\pm 0,97\mu\text{g/ml}$), CUPRAC ($A_{0,5}=28,79\pm 2,10\mu\text{g/ml}$), ABTS ($IC_{50}=10,12\pm 0,60\mu\text{g/ml}$), phenanthroline ($A_{0,5}=36,84\pm 1,85\mu\text{g/ml}$), GOR ($IC_{50}=20,76\pm 0,40\mu\text{g/ml}$) et faible activité antioxydante par FRAP ($A_{0,5} > 200\mu\text{g/ml}$).

L'évaluation du pouvoir antibactérien d'extrait méthanolique des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq par la méthode de diffusion dans un milieu solide montre que *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia. Coli* et *Streptococcus Sp* sont sensibles à l'extrait préparés où les molécules bioactives ayant un pouvoir inhibiteur important.

Mots clés : *Crataegus monogyna* Jacq, Criblage phytochimique, Activité antioxydante, Activité antibactérienne.

الملخص

الزعرور البري او *Crataegus monogyna* هو نبات طبي يستخدم منذ العصور القديمة في الطب التقليدي, معترف به من خلال فضائله العلاجية.

الهدف من هذه الدراسة هو دراسة كيميائية نباتية للبوليفينول و الفلافونيد, وتقييم النشاط المضاد للأكسدة ومضاد للجراثيم "في المختبر" من المستخلص الميثانولي للجزء الجوي (أوراق) من *Crataegus monogyna* Jacq للعائلة رديات.

كشفت الاختبارات الكيميائية النباتية أن هذا النبات غني بالفلافونويدات و العفص (الكاتيكيك) والكينون و السابونين و الستيرول.

أظهر تقدير المركبات الفينولية أن المستخلص غني بالفينولات الكلية بمحتوى 201,74 ميكروغرام مكافئ لحمض قليك / ملغ من المستخلص, بينما تقدر كمية الفلافونويدات ب48,75 ميكروغرام مكافئ للكارسيتين / ملغ من المستخلص

استخدمت ستة طرق لتقييم نشاط مضادات للأكسدة في المستخلص الميثانولي ل *Crataegus monogyna*. أظهر الأخير نشاطا مضادا كبيرا للأكسدة عن طريق DPPH ($IC_{50}=28,00\pm 0,97$ ميكروغرام/مل), CUPRAC ($A_{0.5}=28,79\pm 2,10$ ميكروغرام/مل) ABTS ($IC_{50}=28,00\pm 0,97$ ميكروغرام/مل), فينانثرولين ($A_{0.5}=36,84\pm 1,85$ ميكروغرام/مل) GOR, ($IC=20,76\pm 0,40$ ميكروغرام/مل), ونشاط منخفض للأكسدة بواسطة FRAP ($A_{0.5}<200$ ميكروغرام/مل).

إن تقييم الفاعلية المضادة للبكتريا لمستخلص الميثانول لأوراق *Crataegus monogyna* Jacq من خلال طريقة الانتشار في وسط صلب يبين أن *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia. Coli* و *Streptococcus Sp* حساسة للمستخلص المحضر حيث تكون الجزيئات النشطة حيويًا ذات فاعلية مثبطة كبيرة.

الكلمات المفتاحية :

Crataegus monogyna Jacq, الفحص الكيميائي النباتي, نشاط مضادات الأكسدة, نشاط مضاد للجراثيم.

Abstract

hawthorn is a medicinale plant used since antiquity in traditional medicine, recognized by its therapeutic virtues.

The objective of this study is a phytochemical study of polyphenols and flavonoids, the evaluation of the antioxidant and antibacterial activity “*in vitro*” of the methanolic extract of the aerial part (leaves) of hawthorn of the family Rosaceae.

Phytochemical tests revealed that this plant is rich in flavonoids, tannins (catechins), quinones, saponins and sterols.

The determination of the phenolic compounds showed that the extract is rich in total phenols with a content of 201,47 µg EAG/mg of extract, while the amount of flavonoids is estimated at 75,48 µg EQ/mg of extract.

Six methods were used to evaluate the antioxidant activity of the methanolic extract of hawthorn. The latter showed significant antioxidant activity by the methods of DPPH (IC₅₀=28,00±0,97µg/ml), CUPRAC (A_{0,5}=28,79±2,10µg/ml), ABTS (IC₅₀=10,12±0.60µg/ml), phenanthroline (A_{0,5}=36,84±1,85µg/ml), GOR (IC₅₀= 20,76±0,40 µg/ml), and low antioxidant activity by FRAP (A_{0,5} = >200µg/ml).

The evaluation of the antibacterial potency of methanolic extract of hawthorn leaves by the diffusion method in a solid medium shows that *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Streptococcus Sp* are sensitive to prepared extract where bioactive molecules have significant inhibitory potency.

Key words :

Hawthorn, Phytochemical screening, Antioxidant activity, Antibacterial activity.

Présenté par :

Année universitaire : 2018/2019

Hamdane Imene et Rahamna Amina

Evaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne « *in vitro* » de l'extrait méthanolique (feuilles) de *Crataegus monogyna* Jacq.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie appliquée

Résumé :

L'Aubépine monogyne ou *Crataegus monogyna* est une plante médicinale utilisée depuis l'antiquité en médecine traditionnelle, reconnue par ses vertus thérapeutiques.

L'objectif de cette étude porte sur une étude phytochimique des polyphénols et des flavonoïdes, l'évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne « *in vitro* » de l'extrait méthanolique de la partie aérienne (Feuilles) de *Crataegus monogyna* Jacq de la famille des *Rosaceae*.

Les tests phytochimiques ont révélé que cette plante est riche en flavonoïdes, tanins (Catéchiqes), Quinones, Saponines et Stérols.

Le dosage des composés phénoliques a montré que l'extrait est riche en phénols totaux avec une teneur de 201,74µg EAG/mg d'extrait, tandis que la quantité des flavonoïdes est estimée à 75,48 µg EQ/mg d'extrait.

Six méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *Crataegus monogyna* Jacq. Ce dernier a manifesté une activité antioxydante importante par les méthodes de DPPH ($IC_{50}=28,00\pm 0,97\mu\text{g/ml}$), CUPRAC ($A_{0,5}=28,79\pm 2,10\mu\text{g/ml}$), ABTS ($IC_{50}=10,12\pm 0,60\mu\text{g/ml}$), phenanthroline ($A_{0,5}=36,84\pm 1,85\mu\text{g/ml}$), GOR ($IC_{50}= 20,76\pm 0,40 \mu\text{g/ml}$) et faible activité antioxydante par FRAP ($A_{0,5} = >200\mu\text{g/ml}$).

L'évaluation du pouvoir antibactérien d'extrait méthanolique des feuilles de *Crataegus monogyna* Jac par la méthode de diffusion dans un milieu solide montre que *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia. Coli* et *Streptococcus Sp* sont sensibles à l'extrait préparés où les molécules bioactives ayant un pouvoir inhibiteur important.

Mots clés : *Crataegus monogyna* Jacq, Criblage phytochimique, Activité antioxydante, Activité antibactérienne.

Laboratoire de recherche : Centre de recherche en biotechnologie Constantine / Laboratoire de biochimie Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Université des Frères Mentouri Constantine 1/ laboratoire de référence de sante de la wilaya de Skikda.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Madi Aicha (Maitre de conférences B-UFM Constantine).

Rapporteur : Maameri-Habibatni Zineb (Maitre de conférences A-UFM Constantine).

Examineur : Bensouici Chawki (Maitre de recherche B-CRBT).

Date de soutenance : 16/07/2019.