



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

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques / Biotechnologies / Écologie et Environnement

Spécialité : Mycologie et biotechnologie fongique

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Évaluation des activités biologiques des extraits organiques d'une plante Algérienne appartenant au genre *Vinca*

Présenté par : Sebti Nahla

Le : 10/06/2024

Télaidji Loudjeina Isra

Baziz Doria

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : M^{me} Bicha Sabrina (Professeur - UFM Constantine 1).

Rapporteur : M^{me} Aliouche Lamia (M.C.A - UFM Constantine 1).

Examinatrice : M^{me} Almi Hiba (M.C.B - UFM Constantine 1).

Année universitaire
2023 – 2024

Remerciement

En premier lieu nous tenons à dire « El-Hamdouli" Allah », merci à Dieu de nous avoir donné la santé, le courage, la force et la volonté de terminer ce travail.

*Au terme de ce travail, nous tenons à remercier infiniment et avec gratitude notre encadreur, Madame **Aliouche Lamia**, docteur au département de chimie à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, pour nous avoir guidées et ses précieux conseils, sa patience, son professionnalisme et sa disponibilité à chaque fois qu'on exprime notre besoins. Elle était d'une aide précieuse, et son encouragement dans la réalisation de nos missions et dans notre développement personnel. Grâce à ses précieux conseils et son soutien tout au long de la réalisation de notre étude, on a pu finaliser notre mémoire .Nous sommes fiers d'avoir pu travailler sous sa supervision. Elle restera à jamais dans nos mémoires et elle présente toujours l'espoir pour les futures générations. Un grand Merci pour elle (Madame **Aliouche Lamia**)*

Nous remercions également les membres du jury : Pr. Bicha Sabrina et Dr. Almi Hiba d'avoir accepté de juger ce modeste travail.

*Nous tenons également à exprimer notre sincère gratitude envers le **Pr. Ramdane Seghiri**, qui nous a accueillis au sein de leur unité **VARENBIOMOL** durant la réalisation de ce travail.*

*Nos remerciements vont également à tous les techniciens et les responsables des Centre de Recherche en Biotechnologie (**CRBT**) de Constantine Grâce à leur aide durant notre stage pratique, leur accueil chaleureux et leurs précieux conseils, nous ont était d'un grand support pour effectuer nos activités biologiques.*

.Nous tenons également à remercier tous les étudiants de notre promotion (2023-2024). Un grand remerciement à tous nos enseignants de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, et particulièrement nos enseignants de la spécialité, Mycologie et Biotechnologie Fongique

Enfin, nos remerciements vont à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace



*A ma chère mère **Maman** Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'ont pas cessé de m'encourager. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. A mon très cher père **Nadjib***

Sebti

Tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à honorer l'homme que tu es. Grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension... Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

*Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployés pour mon éducation et ma formation. Je t'aime papa et j'implore le tout-puissant pour qu'il t'accorde une bonne santé et une vie longue et heureuse. **A TOUTE MA FAMILLE***

*Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et encouragements. Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement et votre bonté exceptionnelle. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur. **A mon fiancé** qui n'a pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. A tous les cousins, **les voisins et les amis** que j'ai connu jusqu'à maintenant. En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble. Merci pour leurs amours et leurs encouragements. Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce travail possible, particulièrement mon encadreur **Aliouche Lamia** je vous dis merci.*

Nahla





Dédicace

Dieu merci

Je dédie ce travail

A ma chère mère tu as été ma source d'inspiration et de force. Merci pour ton amour infini et ton soutien inconditionnel. Que Dieu te protège et t'accorde-le bonheur, la santé et la longue vie

A mon cher Père

en cette étape finale de mes études, je veux te remercier du fond du cœur pour ta guidance constante, ton amour inconditionnel et ta présence rassurante.

A mon cher frère « Adem », et ma sœur « bouchra».

A mon marie

Merci pour les encouragements, tu as toujours trouvé les mots qui convient pour me remonter le moral dans le moment pénibles, grâce à toi j'ai surmonté toute les difficultés.

A ma belle-mère et mon beau père

votre présence et votre soutien ont été inestimables. Merci du fond du cœur.

*À mon encadreur **Aliouche Lamia** merci pour votre soutien et vos conseils.*

A mes collègues D'étude et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce travail soit possible.

Loudjeina Isra



Dédicace

Je dédie ce modeste travail en signe de respect, de reconnaissance et de gratitude.

A dieu

*le tout puissant de m'avoir donné le courage, la santé, et m'a accordé son soutien
durant les périodes les plus difficiles.*

A mes très chers parents

*Que j'admire beaucoup, qui m'ont toujours aidés dans ma vie et qui n'ont cessés de
m'encourager et de me soutenir tout au long de mes études, que dieu les garde en
bonne santé.*

A mon frère et ma sœur

pour leur tendresse et leur permanente présence à mes côtés.

*je le dédie aussi à tous **les enseignants** de notre faculté qui m'ont toujours guidé tout
au long de mon parcours éducatif et surtout a notre chère encadrante **Aliouche
Lamia** qui nous a aider et sotenu a complir au mieux notre mémoire de fin d'étude.*

A mes amis

*ceux qui ont cru en moi, qui m'ont toujours encouragé, et avec qui j'ai passé des
années inoubliables.*

DORJA



SOMMAIRE

| | |
|---|----|
| Introduction | 1 |
| 1Chapitre : I Aperçu bibliographique | |
| 1. Etude de la plante..... | 4 |
| 1.1. Les plantes médicinales | 4 |
| 1.2 Famille des Apocynacées..... | 4 |
| 1.2.1 Présentation de la famille Apocynacées | 4 |
| 1.2.2. Historique et Position systématique de la famille Apocynacées..... | 4 |
| 1.2.3. Les caractères botaniques de la famille Apocynacées..... | 5 |
| 1.2.4. Intérêt nutritionnel, économique et pharmacologique de la famille Apocynacée | 5 |
| 1.3. Le genre <i>Vinca</i> | 6 |
| 1.3.1. Présentation du genre | 6 |
| 1.3.2. Classification taxonomique | 7 |
| 1.3.3. Description morphologique..... | 8 |
| 1.3.4. Localisation et répartition géographique | 8 |
| 2. Les Métabolites Secondaires | 10 |
| 2.1. Généralités..... | 10 |
| 2.2. Classification des métabolites secondaires | 10 |
| 2.2.1. Les composés phénoliques | 10 |
| 2.2.2. Les terpènes..... | 11 |
| 2.2.3. Les alcaloïdes | 12 |
| 3. Les activités biologiques | 13 |
| 3.1. Activité antioxydante | 13 |
| 3.2. Activité antibactérienne..... | 13 |
| 3.3. Activité antifongique..... | 13 |
| Chapitre II : partie expérimentale | |
| 1-Travaux antérieurs | 15 |
| 1.1. Préparation du matériel végétal | 15 |

| | |
|--|----|
| 1.2. Extraction | 15 |
| 2- Analyse quantitative | 17 |
| 2.1. Dosage des polyphénols totaux | 17 |
| 2.1.1 Principe de la réaction | 17 |
| 2.1.2. Le protocole..... | 17 |
| 2.2. Dosage des flavonoïdes totaux | 18 |
| 2.2.1. Principe de la réaction | 18 |
| 2.2.2. Protocole | 18 |
| 3 .Tests de l'activité antioxydante..... | 19 |
| 3.1. La méthode du test DPPH | 19 |
| 3.1.1. Principe de la réaction | 19 |
| 3.1.2. Protocol | 19 |
| 3.2. La méthode de test ABTS | 20 |
| 3.2.1. Principe de la réaction | 20 |
| 3.2.2. Protocol | 21 |
| 3.3. La méthode du test phénanthroline | 21 |
| 3.3.1. Principe de la réaction | 21 |
| 3.3.2. Protocol | 22 |
| 4. L'activité antimicrobienne | 23 |
| 4.1. L'activité antibactérienne..... | 23 |
| 4.1.1. Principe de la réaction | 23 |
| 4.1.2. Protocol | 23 |
| 4.2. L'activité antifongique..... | 25 |
| 4.2.1. Principe de la réaction | 25 |
| 4.2.2. Protocol | 26 |

Chapitre : Résultats et discussions

| | |
|---|----|
| 1. Résultats des analyses quantitatives | 29 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| 1.1. Résultat de dosage des polyphénols | 29 |
| 1.2. Résultat de dosage des flavonoïdes | 30 |
| 2. Résultat de l'activité antioxydante | 32 |
| 2.1. Résultat du test DPPH | 32 |
| 2.2. Résultat du test ABTS | 33 |
| 2.3. Résultat du test phénanthroline..... | 35 |
| 3. Résultat de l'activité antimicrobienne..... | 36 |
| 3.1. Résultat de l'activité antibactérienne | 36 |
| 3.2. Résultat de l'activité antifongique | 38 |
| Conclusion..... | 44 |
| Références bibliographiques | 47 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1: Exemples de deux plante de la famille Apocynacées | 5 |
| Figure 2: Trois plantes du genre <i>Vinca</i> | 7 |
| Figure 3: La forme des fleurs et des feuilles de la plante <i>Catharanthus roseus (Vinca rosea)</i> ... | 8 |
| Figure 4: Distribution mondiale de <i>Catharanthus roseus</i> | 9 |
| Figure 5: Distribution mondiale de <i>Vinca major</i> | 9 |
| Figure 6: Distribution mondiale de <i>Vinca minor</i> | 10 |
| Figure 7: Exemples des composés phénoliques..... | 11 |
| Figure 8: La structure chimique de certains terpènes | 12 |
| Figure 9: Exemples d'alcaloïdes indoles ayant une activité anticancéreuse..... | 12 |
| Figure 10: Protocole d'extraction de la plante..... | 16 |
| Figure 11: Principe de la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu..... | 17 |
| Figure 12: Réaction de formation du complexe flavonoïde-chlorure d'aluminium | 18 |
| Figure 13: Réaction de réduction du DPPH' | 19 |
| Figure 14: Réaction chimique ABTS lors du test d'activité antioxydant | 21 |
| Figure 15: La formation de complexe stable entre la phénanthroline et les ions ferreux | 22 |
| Figure 16: Préparation de l'inoculum..... | 24 |
| Figure 17: Ensemencement des souches..... | 24 |
| Figure 18: Préparation des dilutions..... | 25 |
| Figure 19: Le dépôt des disques..... | 25 |
| Figure 20: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique..... | 29 |
| Figure 21: Histogramme représente la quantité en (μg) des polyphénols dans les trois extraits..... | 30 |
| Figure 22: Courbe d'étalonnage de la quercétine..... | 30 |
| Figure 23: Histogramme représente la quantité en (μg) des flavonoïdes | |

| | |
|---|----|
| dans les trois extraits..... | 31 |
| Figure 24: Courbe représentative du pouvoir d'inhibition des trois extraits par le test DPPH..... | 33 |
| Figure 25: Courbe représentative du pouvoir d'inhibition des trois extraits par le test ABTS..... | 34 |
| Figure 26 : Courbe représentative les absorbances des différents standards et extraits (phénanthroline)..... | 35 |
| Figure 27: L'effet des trois extraits (CHCl ₃ , AcOEt, <i>n</i> -BuOH) sur la souche bactérienne <i>Staphylococcus aureus</i> | 37 |
| Figure 28: L'effet des trois extraits (CHCl ₃ , AcOEt, <i>n</i> -BuOH) sur la souche bactérienne <i>Escherichia coli</i> | 37 |
| Figure 29: L'effet de l'amoxicilline sur les deux souches testées (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>)..... | 37 |
| Figure 30: L'évolution du <i>Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici (FOL)</i> avec l'extrait chloroformique..... | 40 |
| Figure 31: L'évolution du <i>Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici (FOL)</i> avec l'extrait acétate d'éthyle..... | 40 |
| Figure 32 : L'évolution du <i>Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici (FOL)</i> avec l'extrait butanolique..... | 40 |
| Figure 33 : L'évolution du <i>Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici (FOL)</i> avec les deux témoins..... | 40 |
| Figure 34: L'évolution d' <i>Alternaria sp</i> avec l'extrait chloroformique..... | 41 |
| Figure 35: L'évolution d' <i>Alternaria sp</i> avec l'extrait acétate d'éthyle | 41 |
| Figure 36: L'évolution d' <i>Alternaria sp</i> avec l'extrait butanolique..... | 41 |
| Figure 37 : L'évolution d' <i>Alternaria sp</i> avec les deux témoins..... | 41 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1: Les classifications taxonomiques de genre <i>Vinca</i> | 7 |
| Tableau 2: Résultats du dosage des polyphénols..... | 29 |
| Tableau 3: Résultats du dosage des flavonoïdes..... | 31 |
| Tableau 4: Inhibition du radical DPPH par les extraits CHCl ₃ , AcOEt, <i>n</i> -BuOH..... | 32 |
| Tableau 5: Inhibition du cation ABTS ^{•+} par les extraits CHCl ₃ , AcOEt, <i>n</i> -BuOH. | 34 |
| Tableau 6: Absorbance du complexe Fe ²⁺ -phénanthroline des trois extraits. | 35 |
| Tableau 7: Zone d'inhibition de l'activité antibactérienne des trois extraits sur les <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Escherichia coli</i> | 36 |
| Tableau 8: Diamètres des zones de développement des champignons en présence des extraits en (mm) | 39 |
| Tableau 9: Taux d'inhibition de la croissance mycélienne..... | 39 |

Liste d'abréviation

VFE : Extrait de fleur de *vinca major*.

VLE : Extrait de feuille de *vinca major*.

ABR : La résistance aux agents antibactériens.

PAM : Les plantes aromatiques et médicinales.

Pb(OAc)₄: Tétra acétate de plomb.

CHCl₃: Extrait de chloroforme.

AcOEt: Extrait d'acétate d'éthyle.

n-BuOH : Extrait de butanol.

FCR : Folin Ciocalteu.

Na₂CO₃ : Le carbonate de sodium

NaNO₂ : Le nitrite de sodium.

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

DPPH : 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl.

ABTS : L'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

K₂S₂O₈ : Persulfate de potassium.

FeCl₃ : Chlorure de fer.

Fe²⁺: Les ions ferreux

E.coli : *Escherichia coli*.

S.aureus : *Staphylococcus aureus*.

DMSO: le dimethylsulfoxyde.

PDA : La gélose dextrosée à la pomme de terre.

FOL : *Fusarium oxysporum.f.sp.Lycopersici*.

IC₅₀: Concentration inhibitrice médiane.

BHA: Butyl Hydroxy Anisole.

BHT: Butyl Hydroxy Toluène

Introduction

Introduction

Depuis l'antiquité, de grandes civilisations comme la Chine, l'Égypte, Babylone, la Grèce, Rome et d'autres ont utilisé les plantes pour se soigner. Au fil du temps, l'utilisation de ces plantes médicinales s'est accrue, à mesure que les sociétés industrialisées ont commencé à les extraire et à les transformer en médicaments et produits thérapeutiques, mais cela n'a pas empêché leur continuation et leur utilisation accrue dans les zones rurales, où les remèdes à base de plantes sont largement utilisés pour traiter les maladies simples, en raison des coûts élevés du traitement [1,2].

Le principal critère de sélection des plantes de la flore médicinale repose sur la présence et l'abondance d'alcaloïdes dans l'espèce sélectionnée [3], ce critère étant crucial pour obtenir un rendement significatif. Cependant, de manière générale, le rendement en alcaloïdes reste souvent très faible. De plus, la répartition des alcaloïdes au sein des familles botaniques est très inégale, certaines étant riches en alcaloïdes, telles que les *Apocynacées* [3]. Cette famille de plantes dicotylédones, parmi les dix plus grandes familles de plantes présente dans le monde entier, représente une composante essentielle de la flore mondiale, étant vaste et diversifiée. Comptant parmi les familles les plus importantes des angiospermes, elle se distingue par la richesse de ses espèces et leur répartition géographique étendue. Les Apocynacées sont connues pour leur valeur médicinale, de nombreux membres de la famille ayant été utilisés depuis des siècles dans la médecine traditionnelle pour traiter une variété des maladies, et ce en raison de sa capacité à produire des métabolites secondaires importants [4,5].

Le genre végétal *Vinca*, communément appelé pervenche, appartient à cette famille (Apocynacées). Ces espèces sont des herbacées ou des sous-arbustes qui poussent dans les climats tempérés et tropicaux [6]. Elles sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter les troubles de la circulation et soutenir le métabolisme cérébral. Elles sont également utilisées pour traiter la perte de mémoire, l'hypertension artérielle et la cystite, ainsi que pour soulager les maux de gorge, les saignements de nez, les contusions, les abcès et l'eczéma [6,7].

En effet, Les alcaloïdes extraits de *Vinca* ont suscité un intérêt considérable et sont largement utilisés de nos jours. Depuis leur découverte dans les années 1950, ces

composés, produits dans les feuilles, ont révolutionné le domaine médical notamment en tant qu'agents anticancéreux [8].

Dans ce contexte, une plante Algérienne du genre « *Vinca* » de la famille des Apocynacées a été choisie. Cette recherche fait partie d'un programme lancée par L'unité de recherche VARENBIOMOL pour étudier les plantes médicinales Algériennes. L'objectif de notre travail vise à démontrer la richesse de cette plante en principes actifs et à déterminer leurs propriétés biologiques. Pour cela notre étude englobera deux aspects : le premier d'ordre phytochimique sera basé principalement sur la teneur de composés polyphénoliques présente dans les trois extraits (CHCl₃, EtOAc, *n*-BuOH) de cette plante et le second sera consacré à une évaluation des activités biologiques : activité antioxydante, antifongique et antibactérienne dans le but d'élargir les perspectives de valorisation des trois extraits.

Notre mémoire se répartit donc en trois chapitres :

Le premier chapitre est consacré à l'étude bibliographique sur les généralités de la famille des Apocynacées suivie d'un aperçu bibliographique de métabolites secondaires et de l'activité antioxydante, antifongique et antibactérienne. Le deuxième chapitre est consacré aux travaux expérimentaux, il renferme les travaux relatifs à l'extraction de la matière végétale, le dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux des trois extraits chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique, de plus leurs activités biologiques. Le troisième chapitre comporte l'interprétation des résultats obtenus et en dernier une conclusion générale.

Aperçu bibliographique

Chapitre I Aperçu bibliographique

1. Etude de la plante

1.1. Les plantes médicinales :

Les plantes médicinales sont des sources de substances bénéfiques pour la santé dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses qui représentent une précieuse source de produits naturels exploités par les êtres humains depuis l'Antiquité [9]. Cette utilisation a conduit à la mise en valeur d'un grand nombre de plantes aux propriétés curatives contre diverses maladies dans de nombreuses régions du monde [10, 11]. Les coûts et les effets secondaires associés aux médicaments conventionnels sont les principaux facteurs qui contribuent à la résurgence de l'intérêt pour les plantes médicinales [12]. De nombreuses plantes médicinales ont été étudiées pour leurs propriétés : antifongiques, cardioprotectrices, anticancéreuses, antioxydantes, antimicrobiennes, anti-insectes, antibactériennes, herbicides et autres propriétés bioactives [13, 14].

1.2 Famille des Apocynacées :

1.2.1 Présentation de la famille Apocynacées :

La famille des Apocynacées parmi les familles les plus vastes et significatives des angiospermes. C'est une famille de plantes eudicotylédones appartenant à l'ordre des « Gentianales », connue sous le nom de famille des apaniers ou famille des lauriers-roses, elle est généralement constituées d'arbres, d'arbustes, des vignes [15]. Elle produit une variété d'alcaloïdes et possède de nombreuses propriétés médicinales [16].

1.2.2. Historique et Position systématique de la famille Apocynacées :

La famille des Apocynacées anciennement appelée Asclepiadaceae maintenant incluse dans les Apocynacées par Angiosperm Phylogeny Group en 2009 au niveau du système de classification. La dernière division de la famille des Apocynacées a été publiée par Anderson et ses collègues comprend 5 sous-familles (Apocynoideae-Asclepiadoideae-Periplocoideae-Rauvolfioideae-Secamonoideae), elle rassemble près de 155 genres dont les plus importants sont : *Asclepias*, *Nerium*, *Pachypodium*, *Plumeria* et *Vinca* [17] et 2000 espèces [18]. Cette famille cosmopolite se retrouve principalement dans les régions tropicales et subtropicales, avec une répartition plus limitée dans les régions tempérées [19].

1.2.3. Les caractères botaniques de la famille Apocynacées

La famille des apocynacées constituée des arbres, des arbustes, des vignes et parfois des espèces ressemblant à des cactus (figure1) [20,21] ou des herbes vivaces comme la pervenche, facilement identifiables par une combinaison distinctive de latex, de lobes corollaires torsadés en bouton [22]. Les membres de cette famille végétale présentent des feuilles simples qui peuvent être opposées, verticillées ou alternées, et dont le bord peut être entier, ondulé ou révoluté, ces feuilles peuvent adopter diverses formes telle que, l'ovale, l'elliptique, la lancéolée, la linéaire, l'obovale, l'elliptique-ovale, la linéaire-lancéolée ou la cordée. Le sommet des feuilles peut être pointu, obtus, arrondi, mucroné ou aigu [23]. Les traits caractéristiques de cette famille sont presque toutes les espèces qui produisent une sève laiteuse. Une autre caractéristique des fleurs des Apocynacées réside dans leur association étroite tant sur le plan structurel que fonctionnel entre les étamines et les carpelles [20- 24].



Figure 1 : Exemples de deux plante de la famille Apocynacées.

1.2.4. Intérêt nutritionnel, économique et pharmacologique de la famille Apocynacée

✓ Intérêts pharmacologiques

La famille des Apocynacées est l'une des familles médicinales les plus diversifiées du règne végétal est constituée d'une riche source des médicaments utilisés à la fois en médecine traditionnelle et conventionnelle. Les membres de la famille des Apocynacées sont abondants en alcaloïdes, terpénoïdes , stéroïdes, flavonoïdes, glycosides, phénols simples, lactones et hydrocarbures. L'activité médicinale de ces plantes était due à la présence d'alcaloïdes qui étaient soit des alcaloïdes indolines, ou des alcaloïdes stéroïdiens [15,25]. En médecine traditionnelle, les espèces d'Apocynacées sont utilisées pour traiter les affections gastro-

intestinales, la fièvre, le paludisme, la douleur et le diabète, notamment les maladies cutanées et ectoparasitaires, il a été aussi rapporté qu'il y a des espèces des Apocynacées qui possèdent des propriétés anticancéreuses et antipaludiques [26].

✓ Intérêts nutritionnels

La plupart sont utilisées comme source de nourriture par les populations tribales, en particulier les fruits tels que *Carpotroche surinamensis* (*sachainchi*), et les graines de certaines espèces, telles que *Landolphia owariensis*, sont également consommées comme aliment, mais quelques-unes sont utilisées comme poisons contre les prédateurs [27].

✓ Intérêts économiques

La famille des Apocynacées est une famille de plantes d'une grande importance économique. Elle fournit des médicaments, des fibres, des plantes ornementales, du latex, des aliments, des colorants, des parfums et d'autres produits importants. Plusieurs composés d'origine végétale extraits des membres de cette famille ont également révélé des propriétés remarquables, dans le monde entier cette famille pourrait présenter un intérêt significatif dans le développement de médicaments antimicrobiens plus efficaces et moins toxiques [18].

1.3. Le genre *Vinca* :

1.3.1. Présentation du genre :

Le genre *Vinca*, faisant partie de la famille des Apocynacées établi par Linné en 1735. Il est défini par la présence de fleurs à cinq pétales, suscite un vif intérêt pour ces propriétés médicinales, attribué à sa forte concentration en alcaloïdes, flavonoïdes et composés phénoliques. Ces composés naturels, synthétisés et stockés dans les parties aériennes des plantes *Vinca*, agissent comme une barrière défensive contre les herbivores et les pathogènes. Le genre comprend environ 12 espèces, dont les plus connues sont : *Vinca major* L, *Catharanthus roseus* (L.G. Don.) et *Vinca minor* L [28,29].

• Exemples de plantes médicinales du genre *Vinca*

- *Vinca major* L (Grande Pervenche) : elle a été récoltée pour la première fois en Yougoslavie où cette plante a subi un examen chimique qui a révélé sa richesse en alcaloïdes, saponines, stérols insaturés, acides organiques et phénols. Cette plante est utilisée comme remède populaire pour traiter le diabète et la ménorragie [30].
- *Catharanthus roseus* (*Vinca rosea*): elle est d'une grande importance en tant que plante médicinale qui fournit des alcaloïdes antitumoraux et des alcaloïdes anticancéreux [31].

Les feuilles de *Vinca rosea* ont été utilisées historiquement en médecine traditionnelle pour leurs propriétés hypoglycémiantes orales. L'étude de ces propriétés a abouti à la découverte fortuite des alcaloïdes indoliques et terpénoïdes, la vinblastine et la vincristine, qui ont marqué les débuts des agents anticancéreux naturels en clinique [32].

- *Vinca minor L* (Pervenche cultivée): une plante horticole aux fleurs bleu-violet qui fleurissent du printemps à l'été. *Minor* est l'une des plantes médicinales les plus importantes et la seule source naturelle de vincamine. C'est l'un des rares alcaloïdes crucial principalement présent dans ses feuilles ayant des effets bénéfiques sur les cellules, il agit comme un visodilatateur. Cette plante offre une source naturelle potentielle à des fins pharmaceutiques grâce à la vincamine qui est l'alcaloïde principal de la petite pervenche cultivée [33,34].



Figure 2 : Trois plantes du genre *Vinca*.

1.3.2. Classification taxonomique

Tableau 1 : Les classifications taxonomiques de genre *Vinca* [21].

| | |
|-----------------------|----------------|
| Règne | Plantae |
| Sous-règne | Tracheobionta |
| Super-division | Angiospermae |
| Division | Magnoliophyta |
| Classe | Magnoliopsida |
| Sous-classe | Asteridae |
| Ordre | Gentianales |
| Famille | Apocynaceae |
| Sous-famille | Apocynoideae |
| Tribu | Vincae |
| Genre | <i>Vinca L</i> |

1.3.3. Description morphologique du genre *Vinca*

À tous les stades de croissance, aucune disparité significative n'est observée en termes de hauteur des plantes de genre *Vinca*. Elles mesurent de 25 à 50 cm de longueur avec des pousses traînantes, des tiges horizontales non ramifiées et tomenteuses qui peuvent mourir complètement jusqu'au porte-greffe (*V. minor* à tiges couchées et feuilles lancéolées, et *V. major* à tiges dressées et feuilles ovales) [35]. Les feuilles, d'un vert foncé, persistent sur la plante et sont opposées avec de courts pétioles. Le limbe brillant présente une nervure pennée mesurant environ 50 mm à l'aisselle des feuilles, apparaissent des fleurs solitaires et à cinq pétales. La corolle en forme de tube à la base mesurant de 20 à 38 mm de diamètre et composée de cinq lobes de couleur bleue ou bleu-violet ou rose est doublée fréquemment par des appendices corollins formant une couronne à l'intérieur de la corolle. Le fruit se compose de deux follicules (Figure3) [36,37].



Figure 3 : La forme des fleurs et des feuilles de la plante *Catharanthus roseus* (*Vinca rosea*)

Les feuilles des espèces de *Vinca* sont fréquemment utilisées pour la préparation d'extraits en raison de leur capacité à libérer rapidement une concentration élevée d'alcaloïdes. L'épiderme des feuilles de *Vinca* est constitué d'une seule couche de cellules comprenant des cellules de la cuticule, des complexes stomatiques et des trichomes, qui agissent comme une barrière protectrice contre les facteurs environnementaux [38].

1.3.4. Localisation et répartition géographique du genre *Vinca*

Le genre *Vinca* originaire des régions tempérées, il est répandu en Europe (France, Italie, Espagne, Portugal, Grèce, Turquie, Russie, Ukraine, Allemagne, Belgique, Pays-Bas, Royaume-Uni, Irlande, Scandinavie), dans le nord-ouest de l'Afrique (Maroc, Algérie, Tunisie, Libye, Égypte, Afrique du Sud, Madagascar) ainsi que dans le sud-ouest et en Asie centrale (Palestine, Syrie, Jordanie, Irak, Iran, Afghanistan, Pakistan, Inde, Chine, Japon,

Corée du Sud, Taïwan, Vietnam) [35,39]. La distribution de ce genre en Algérie est centrée dans les forêts et les zones humides [40].

- ✓ Répartition des plantes répandues du genre *Vinca*
- *Catharanthus roseus* : est une plante vivace que l'on trouve fréquemment dans les pays tropicaux. Elle est originaire de Madagascar, c'est pourquoi on l'appelle pervenche de Madagascar [41].



Figure 4 : Distribution mondiale de *Catharanthus roseus*

- ✓ *Vinca major* L : Prenant racine naturellement dans les zones vallonnées de diverses régions comme le Pakistan, l'Algérie, le Maroc, l'Arménie, la République de Géorgie, l'Iran, l'Irak, le Liban, la Syrie, la Turquie, le Portugal (y compris les Açores et Madère), l'Espagne (notamment les îles Canaries) [42].

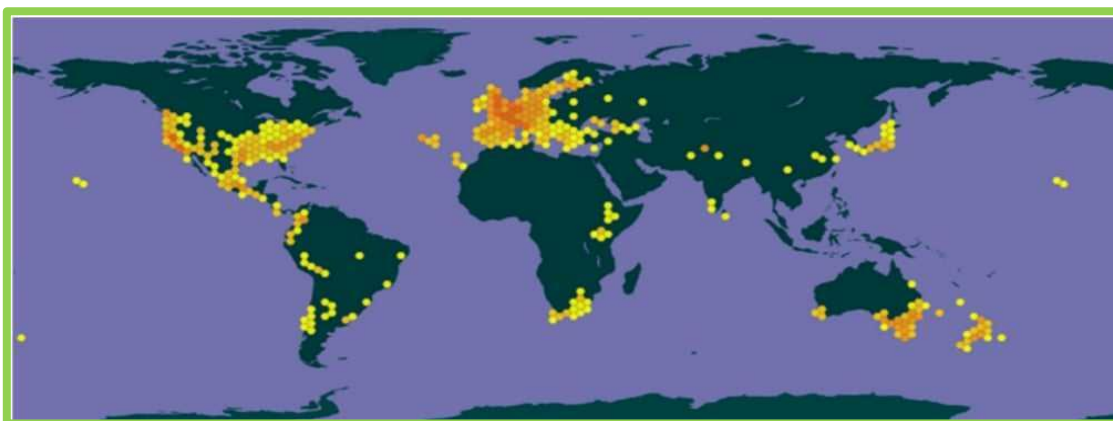


Figure 5 : Distribution mondiale de *Vinca major*

- *Vinca minor* L : est originaire du nord de l'Espagne et de l'ouest de la France, ainsi que de l'Europe centrale et méridionale, et se trouve également en abondance dans la région du Caucase [34].

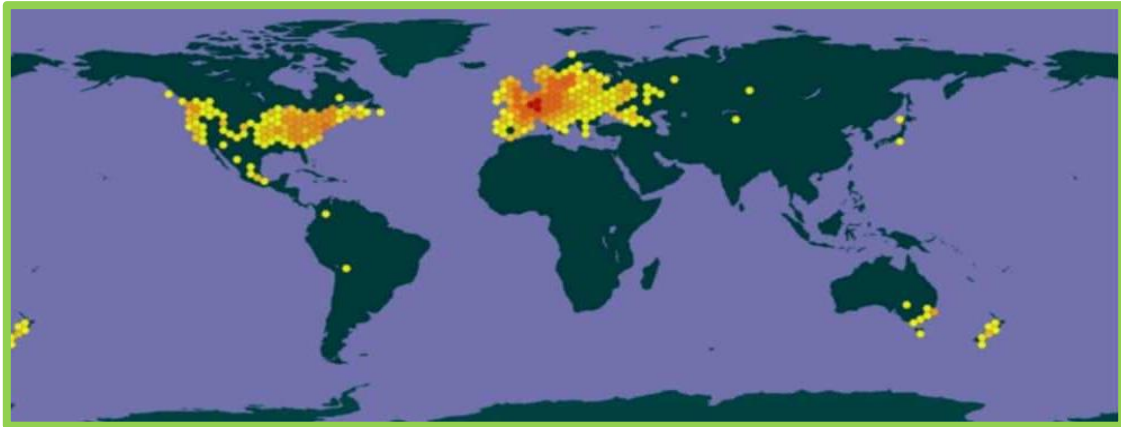


Figure 6 : Distribution mondiale de *Vinca minor*

2. Les Métabolites Secondaires

2.1. Généralités

Les métabolites secondaires des plantes constituent des réservoirs uniques de produits pharmaceutiques, d'additifs alimentaires, d'arômes et d'autres matériaux industriels. Leurs accumulations sont souvent favorisées dans les plantes soumises à divers stress biotiques ou abiotiques pouvant augmenter l'efficacité de la reproduction. Ces éléments ne sont pas directement issus de la photosynthèse, mais plutôt du résultat de réactions chimiques ultérieures induites par des éliciteurs ou des molécules signal. La compréhension des voies de transduction du signal responsables de la production de métabolites secondaires en réponse à ces éliciteurs revêt une importance cruciale pour optimiser leur production commerciale [43]. Le nombre total de métabolites secondaires dans le règne végétal est estimé entre 200 000 et plus de 500 000 [44,45].

2.2. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires des plantes sont classés en fonction de leurs caractéristiques chimiques. Ils sont regroupés en trois catégories de molécules : les composés phénoliques, les terpénoïdes et les alcaloïdes [46].

2.2.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques se trouvent dans les fruits et les légumes, les boissons et de nombreux autres produits alimentaires. Ils constituent l'une des familles les plus importantes de métabolites secondaires jouant un rôle essentiel dans leur interaction avec l'environnement [47]. Les composés phénoliques simples sont souvent produits par les végétaux en décomposition, tels que les acides méthoxy et hydroxy benzoïques et l'acide cinnamique [48].

La Structure des composés phénoliques est caractérisée par un noyau benzénique constitué d'un groupement hydroxyle pouvant être libre ou engagé dans une liaison ester ou éther. Ce noyau est la cause de la forte rigidité et réactivité chimique en raison de déplacement d'électrons en résonance dans le plan du cycle formé par les six atomes de carbone [49,50]. (Figure 7).

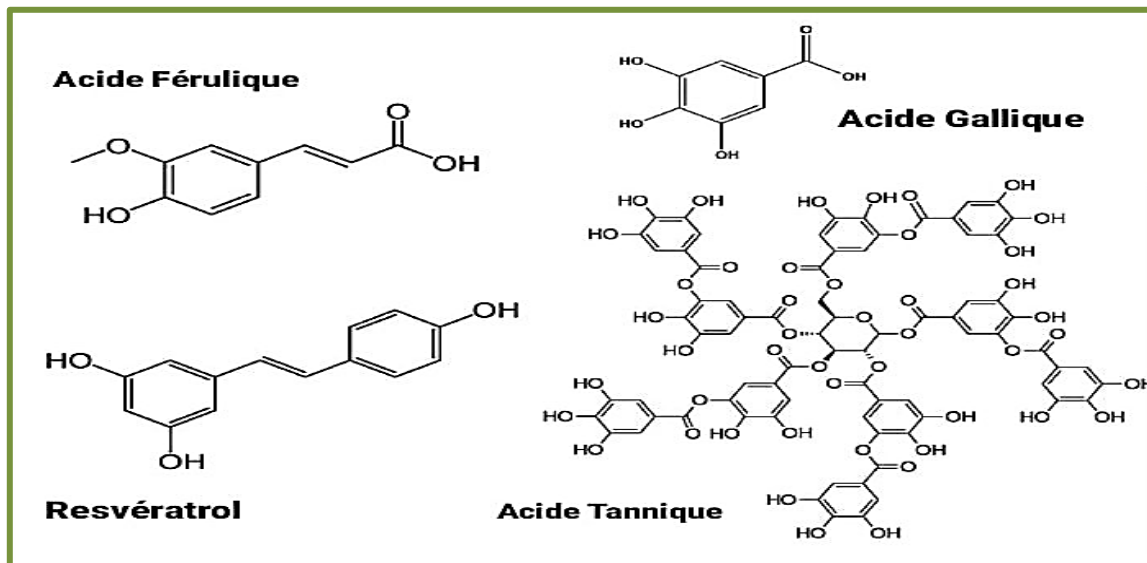


Figure 7: Exemples des composés phénoliques.

2.2.2. Les terpènes

Les terpènes représentent la classe la plus vaste et la plus diversifiée de composés organiques végétaux, comptant près de 15 000 structures moléculaires connues. Les terpénoïdes sont la plupart du temps des agents de défense contre les herbivores. Leur grande diversité découle du nombre d'unités de base les constituants et des différents modes d'assemblage [51]. On distingue notamment :

- ✓ Les monoterpènes, composés de 10 atomes de carbone.
- ✓ Les sesquiterpènes, composés de 15 atomes de carbone.
- ✓ Les diterpènes, composés de 20 atomes de carbone. Les triterpènes , composés de 30 atomes de carbone, et les tétraterpènes, composés de 40 atomes de carbone (Figure 8) [51].

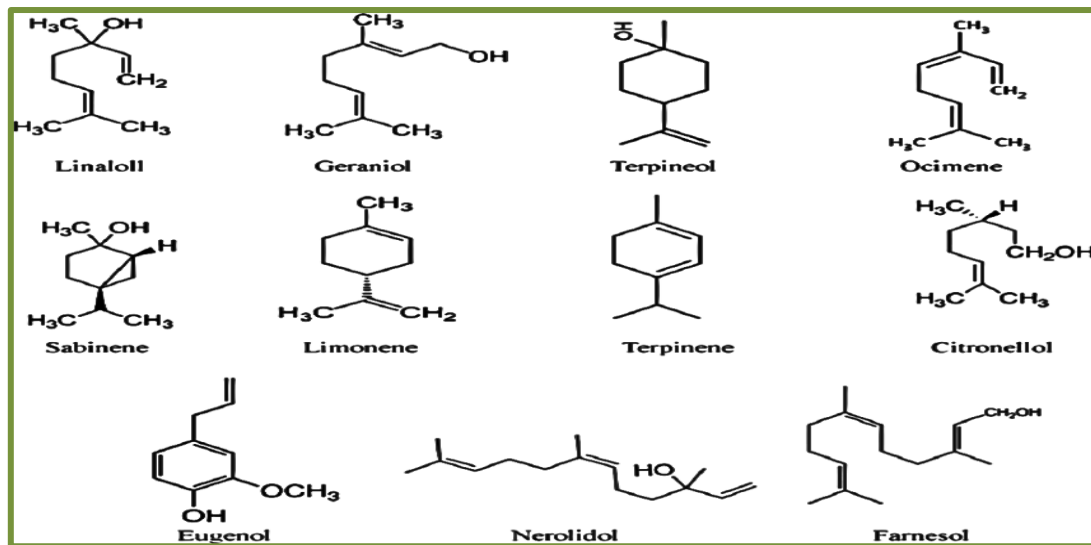


Figure 8: La structure chimique de certains terpènes

2.2.3. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes, des composés chimiques significatifs, offrent une riche source pour la recherche de médicaments. De nombreux alcaloïdes issus de plantes et d'herbes médicinales ont démontré des effets antiprolifératifs et anticancéreux sur divers types de cancers. Parmi eux, la vinblastine, la vinorelbine, la vincristine et la vindésine ont déjà été développées avec succès en tant que médicaments anticancéreux [52]. Les alcaloïdes sont rarement libres dans la plante mais plutôt sous formes de Glycosides ou de sels d'acide malique, tartrique ou citrique et sont généralement constitués d'un hétérocyclique avec un atome d'azote (Figure. 9) [53,54].

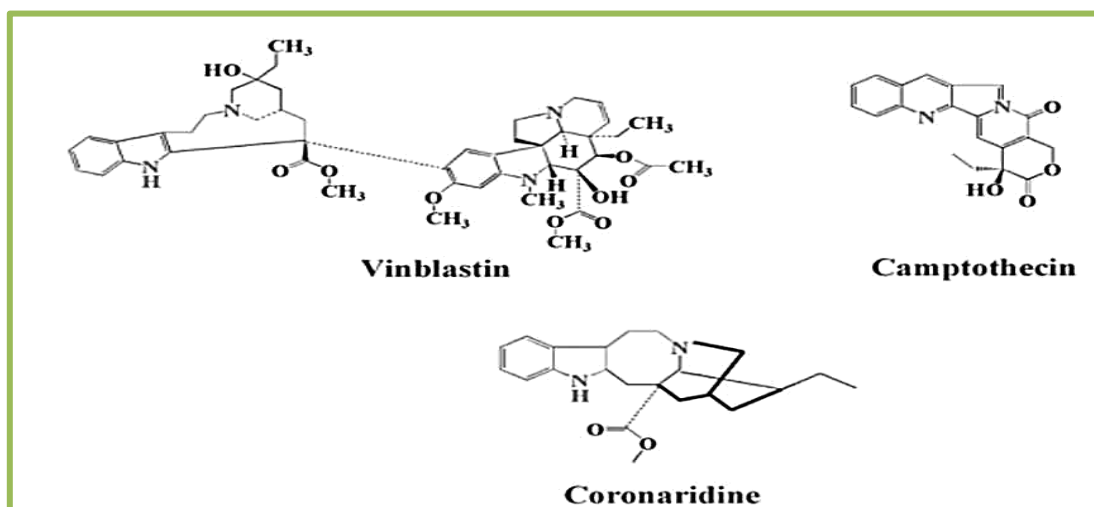


Figure 9: Exemples d'alcaloïdes indoles ayant une activité anticancéreuse

3. Les activités biologiques

3.1. Activité antioxydante

L'activité antioxydante mesure la capacité d'un organisme à se défendre contre les effets néfastes des radicaux libres. Évaluer cette activité est une des façons d'apprécier la valeur biologique et nutritive d'un aliment [55]. Plusieurs espèces du genre *Vinca* ont été étudiées pour leur activité antioxydante, comme *Vinca major* [56] et *Vinca minor* [57], et les résultats ont montré une forte capacité de leurs extraits à neutraliser les radicaux DPPH. C'est l'une des raisons qui nous a encouragés à choisir une plante Algérienne de ce genre pour l'étudier.

3.2. Activité antibactérienne

Une substance ou un extrait possédant une activité antibactérienne est un extrait capable d'inhiber la reproduction de micro-organismes (champignons et bactéries) ou de les détruire [58]. Les études ont montré les propriétés antibactériennes de différentes espèces (plantes) du genre *Vinca*, telles que *Vinca major*, *Vinca minor* et *Vinca rosea*. Parmi elles, *Vinca major* a été la plus étudiée, montrant une activité contre diverses souches bactériennes pathogènes, suivie de *Vinca minor* et *Vinca rosea* [59,60].

3.3. Activité antifongique

Les champignons microscopiques sont à l'origine de nombreuses maladies chez l'homme. Ces dernières années, les cas de mycoses ont augmenté de manière significative et elles sont maintenant la quatrième cause d'infections nosocomiales [61]. Les plantes médicinales offrent une source inépuisable de composés naturels qui peuvent être utilisés pour développer de nouveaux agents antifongiques [61]. Une étude collective a été menée pour évaluer l'activité antifongique de 500 extraits de différentes plantes. Les résultats ont révélé que parmi les 500 extraits testés, 42 ont montré une activité antifongique significative. Parmi eux, l'extrait de l'espèce *Vinca rosea* a montré une forte activité antifongique contre *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans* [62,63] et l'extrait de la plante *Vinca minor* a montré aussi une activité antifongique élevée contre *Fusarium oxysporum, f.s.p. lycopersici* [63].

Partie expérimentale

Chapitre II Partie expérimentale

Nos études photochimiques et biologiques ont été réalisées au niveau de l'unité de recherche VARENBIOMOL et le Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBT).

1-Travaux antérieurs :

La récolte et le séchage de la plante ont été réalisés antérieurement par Dr. Aliouche Lamia.

1-1 Préparation du matériel végétal :

La plante étudiée a été récoltée de la région Saïda en Mai 2023. Les parties aériennes (feuilles, fleurs et tiges) de cette plante ont été séchées dans un endroit sec et aéré à l'abri de l'humidité puis bien broyées, pulvérisées et pesées (850,24g).

1-2 Extraction :

Les parties aériennes (850,24g) ont été mises à macérer dans un mélange éthanol /eau (7:3) pendant trois jours, cette opération est répétée trois fois avec renouvellement de solvant. Après concentration à une température n'excédant pas 38°C, nous avons obtenu un extrait brut qui est dilué avec l'eau distillée. La solution ainsi obtenue est laissée au repos à froid pendant une nuit pour décantation après l'ajout du tétra acétate de plomb $Pb(OAc)_4$, cette décantation permet le dépôt de la chlorophylle. Après filtration, la phase aqueuse obtenue est épuisée successivement par une extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter en utilisant des solvants non miscibles à l'eau et de polarité croissante en commençant par L'éther de pétrole, Chloroforme, puis L'acétate d'éthyle, et en dernier le *N*-butanol. Les quatre extraits organiques récupérées sont séchées, concentrées sous pression réduite à sec et pesées. Le protocole d'extraction utilisé est résumé dans la figure 10.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux trois extraits obtenus. Ces derniers ont été soumis à un dosage spectrophotométrique en vue d'évaluer leur taux de polyphénols et de flavonoïdes totaux et d'examiner leur pouvoir antioxydant, antibactérien et antifongique.

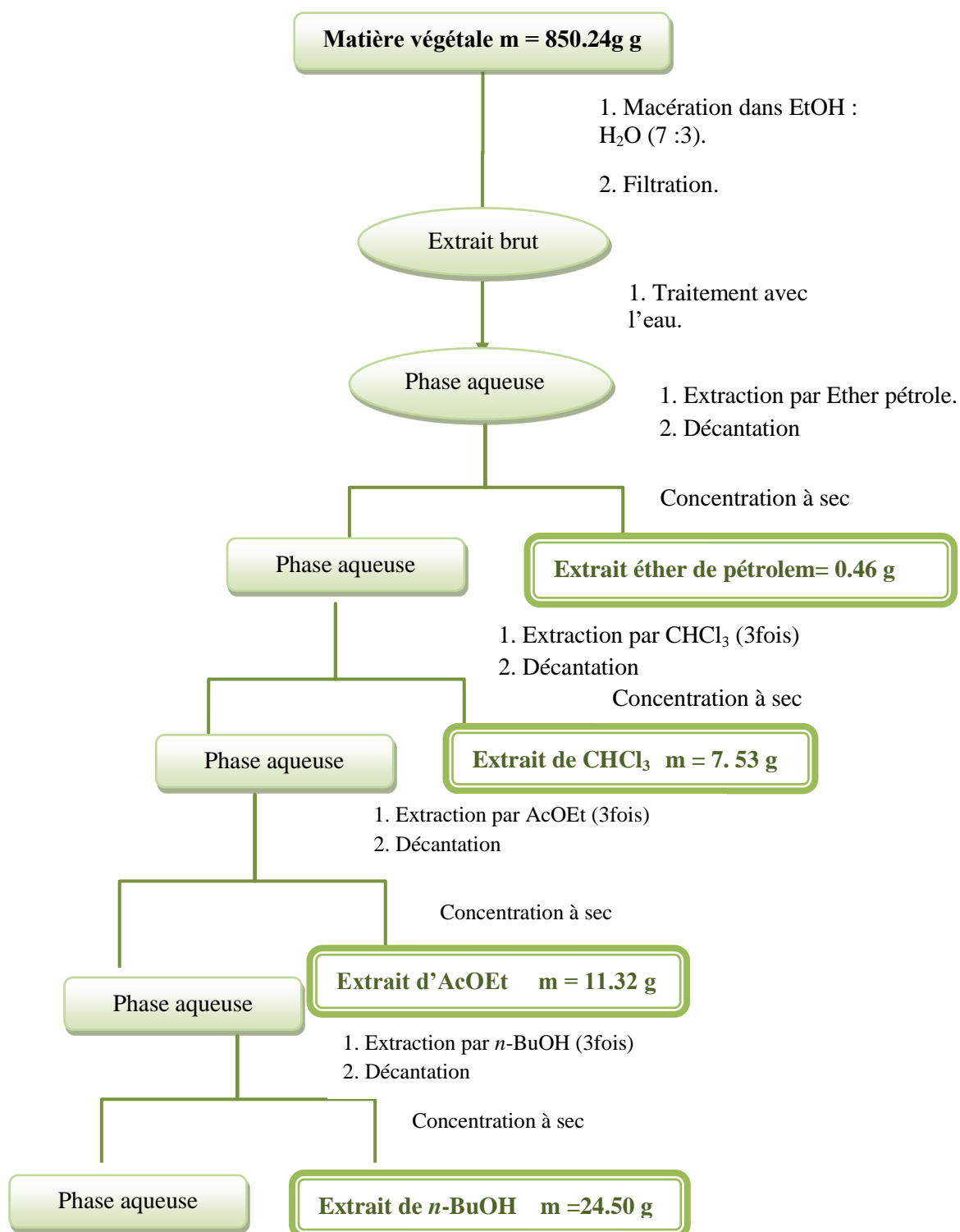


Figure 10: Protocole d'extraction de la plante

2- Analyse quantitative :

2.1. Dosage des polyphénols totaux :

2.1.1 Principe de la réaction :

Le principe de la réaction des composés phénoliques totaux, également appelée réaction de détermination des polyphénols repose sur l'utilisation du réactif de Folin-Ciocalteu [64]. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Une fois le phénol présent dans l'échantillon oxydé, le réactif est réduit en un mélange d'oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La réaction produit une couleur dont le maximum d'absorption se situe généralement entre 725-765 nm, proportionnel à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. Selon une méthode de dosage sur microplaque décrite par Muller [65].

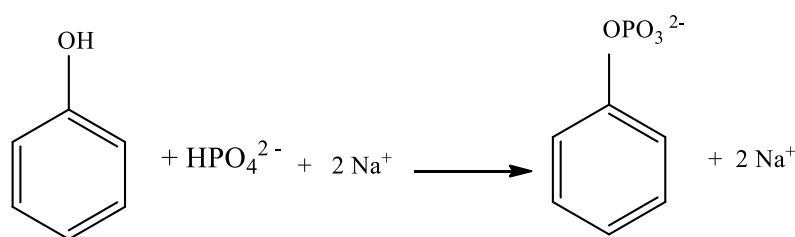


Figure 11 : Principe de la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu

2.1.2. Le protocole :

- Une solution mère d'acide gallique a été préparée avec une concentration de 1mg/ml (1000µg/ml) à partir de laquelle on a préparé une série des dilutions de concentration (200,175, 150, 125, 100, 75, 50, 25) µg/ml.
- Une courbe d'étalonnage standard à partir de ces dilutions d'acide gallique a été obtenue, en mélangeant 20 µl de chaque concentration avec 100µl de Folin Ciocalteu (FCR dilué 5 fois) et 80µl de Na_2CO_3 (0.4%), et elles ont été transférées sur une microplaque. La lecture a été prise après deux heures à 765 nm.
- Pour les extraits, 1 mg de chaque extrait (chloroforme, acétate d'éthyle et butanol) a été dissous dans un volume de 1 ml de méthanol, et 20 µl de chaque extrait préparé a été prélevé et mélangé avec 100 µl de Folin Ciocalteu (FCR dilué 5 fois) et 75 µl de carbonate de sodium (0.4%), après 2 heures Incubation, la lecture a été réalisée à 765 nm.

- Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par 20 μl du méthanol.
- La lecture des absorbances pour toutes les analyses a été effectuée à l'aide d'un lecteur de microplaque (Perkinelmer).

2.2. Dosage des flavonoïdes totaux :

2.2.1 Principe de la réaction :

Le principe de la réaction flavonoïde repose sur la capacité des flavonoïdes à réagir avec certains réactifs, produisant des colorations caractéristiques qui permettent leur identification. Le dosage des flavonoïdes dans l'extrait est basé sur le complexe formé entre Al^{+3} et les flavonoïdes. Selon La méthode de Topçu [66] est utilisée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque 96 puits.

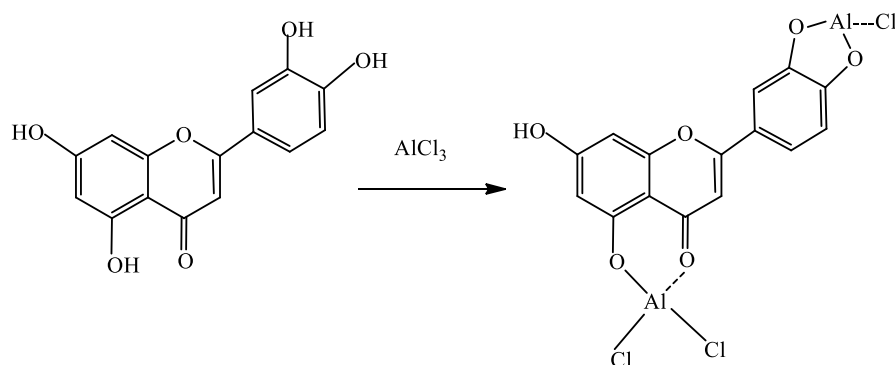


Figure 12: Réaction de formation du complexe flavonoïde-chlorure d'aluminium

2.2.2. Protocole :

- La teneur en flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine de différentes concentrations (200, 175, 150, 125, 100, 75, 50, 25) $\mu\text{g/ml}$, la solution mère de la quercétine a été préparée par la dissolvons de 1 mg de la quercétine sur 5 ml de méthanol pour obtenir 0,2 mg/ml de Sm.
- La courbe d'étalonnage de la quercétine a été réalisé en mélangeant 50 μl de chaque dilution préparée avec 20 μl de NaNO_2 , 20 μl de AlCl_3 et 20 μl de NaOH et après une durée de 40 min, la lecture est faite à 415 nm.
- Pour les extraits, 1 mg de chaque extrait (chloroforme, acétate d'éthyle et butanol) a été dissous dans un volume de 1 ml de méthanol, et 50 μl de chaque

extrait préparé a été prélevé et mélangé avec 20 μl de NaNO_2 , 20 μl de AlCl_3 et 20 μl de NaOH .

- Le blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait végétal par 50 μl du méthanol.
- Les solutions préparées ont été placées à l'obscurité pendant 40 minutes, et l'absorbance a été lue à 415 nm par un lecteur de microplaques (Perkinelmer).

3. Tests de l'activité antioxydante :

3.1 La méthode du test DPPH :

3.1.1 Principe de la réaction :

L'activité anti-radicalaire libre est déterminée par spectrophotométrie par le dosage du DPPH selon la méthode de Blois [67], ce test consiste à mesurer le pouvoir réducteur de l'antioxydant en présence du radical libre DPPH $^{\bullet}$ (2,2-diphényl-1-trinitrophénylhydrazine). C'est un radical libre violet. DPPH $^{\bullet}$ est réduit par un donneur d'atomes H (AH), entraînant la formation de 2,2-diphényl-1-trinitrophénylhydrazine incolore ou jaune pâle (DPPH-H) et au radical A $^{\bullet}$ [68]. Cette activité a été réalisée pour déterminer la concentration d'extrait requise pour réduire la concentration initiale de radicaux DPPH à 50 % [69].

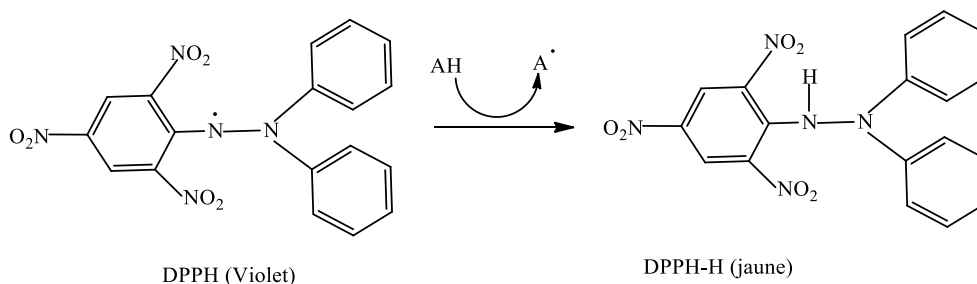


Figure 13: Réaction de réduction du DPPH $^{\bullet}$

3.1.2. Protocol :

- La solution de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$, $M=394.33$), est préparée par la solubilisation de 6 mg de DPPH dans un volume de 100 ml de méthanol pour obtenir une solution de 26 $\mu\text{g}/\text{ml}$, cette dernière est conservée à l'abri de la lumière à -20°C .

- Pour chaque extraits (CHCl_3 , AcOEt, *n*-BuOH) une solution mère et une série de six solutions (800,400, 200, 100, 50, 25, 12.5) $\mu\text{g/ml}$ ont été préparées.
- Dans une microplaque de 96 puis on a mélangé 40 μl de chaque solution des extraits à différentes concentrations avec 160 μl de DPPH, et pour chaque concentration le test est répété 3 fois.
- Un contrôle négatif est préparé en mélangeant 40 μl de méthanol avec 160 μl de DPPH.
- La lecture de l'absorbance est faite à 517 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante.
- L'efficacité des radicaux DPPH a été évaluée en termes de pourcentage d'inhibition des radicaux libres par les extraits de la plante, avec les valeurs IC_{50} exprimées en $\mu\text{l/ml}$. Pour le test DPPH, l' IC_{50} est définie comme la concentration d'antioxydant nécessaire pour atteindre une inhibition de 50 % des radicaux [70], l' IC_{50} calculé comme suit :

$$I\% = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{ECH}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

- I%: pourcentage d'inhibition
- A_{DPPH} : absorbance du contrôle négatif
- A_{ECH} : absorbance de l'échantillon.

3.2 La méthode de test ABTS :

3.2.1 Principe de la réaction :

L'activité ABTS [L'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)] est déterminée la première fois par la méthode de Re [71], représente un composant largement exploité dans l'évaluation de la capacité antioxydante globale des extraits de plantes, ce procédé photométrique repose sur la réduction grâce à la présence des composants antioxydants d'un radical métastable bien identifié ($\text{ABTS}^{*\cdot}$). L'ABTS génère également un radical libre relativement stable qui perd sa couleur lorsqu'il revient à son état non-radical. Dans cette méthode, un antioxydant est introduit dans une solution d'ABTS déjà formée en radical, puis après un laps de temps défini la quantité restante d' $\text{ABTS}^{*\cdot}$ mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 734 nm [72,73].

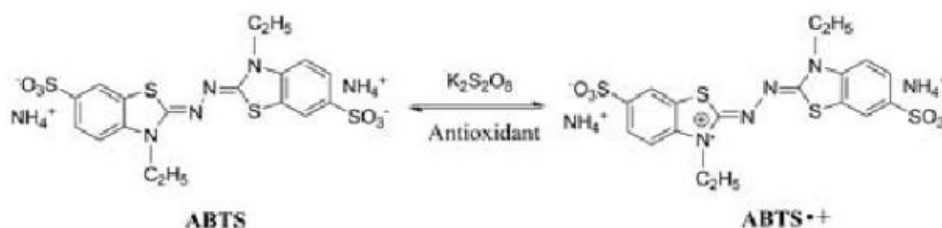


Figure 14 : Réaction chimique ABTS lors du test d'activité antioxydant

3.2.2 Protocol :

- Une solution d'ABTS⁺ est préparée en mélangeant l'ABTS et le persulfate de potassium (K₂S₂O₈), et placée 16 heures à l'abri de la lumière.
- Pour chaque extrait utilisé (CHCl₃, AcOEt, *n*-BuOH) une solution mère et 6 dilutions de concentration (800, 400, 200, 100, 50, 25,12.5) µg/ml ont été préparées.
- Sur une microplaque en mélangeant 160 µl de la solution ABTS⁺ avec 40 µl de chaque extrait pour chaque concentration.
- Le contrôle négatif est préparé de la même manière, en remplaçant l'extrait par le méthanol (160µl de la solution ABTS⁺ plus 40 µl de méthanol)
- Après 10 minutes à une température ambiante, la lecture de l'absorbance est faite à 734 nm sur le lecteur de microplaque (Perkinelmer).
- L'amplitude de la décoloration a été évaluée en pourcentage de réduction d'absorbance IC₅₀ [74]. Pour déterminer la capacité de piégeage des composés testés, l'équation suivante a été utilisée :

$$I\% = [(A_{\text{ABTS}} - A_{\text{ECH}}) / A_{\text{ABTS}}] \times 100$$

- I% : pourcentage d'inhibition.
- A_{ABTS} : absorbance du contrôle négatif.
- A_{ECH} : absorbance de l'échantillon.

3.3 La méthode du test phénanthroline :

3.3.1. Principe de la réaction :

La méthode de la réaction phénanthroline est déterminée par la méthode de Szydłowska-Czerniaka [75], elle repose sur la création d'un complexe stable entre la

phénanthroline et les ions ferreux (Fe^{2+}). Cette technique est largement exploitée en chimie analytique pour évaluer la concentration des ions ferreux dans une solution. En réaction avec les ions ferreux, la phénanthroline forme un complexe rouge orangé, appelé complexe fer-phénanthroline. La formation de ce complexe coloré facilite la mesure de la concentration des ions ferreux par spectrophotométrie. La densité optique de la solution est directement liée à la concentration des ions ferreux, ce qui garantit une quantification précise [76].

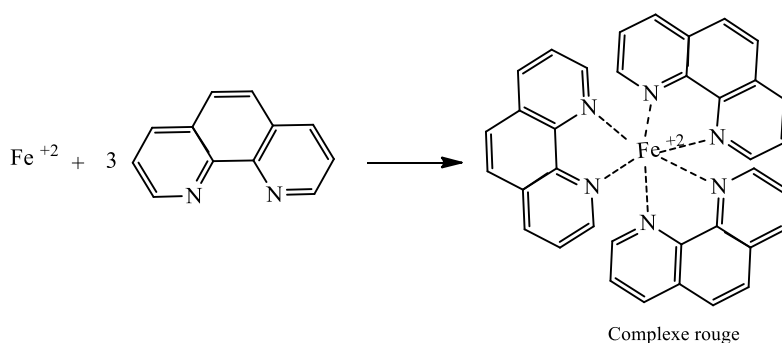


Figure15 : La formation de complexe stable entre la phénanthroline et les ions ferreux.

3.3.2 Protocol :

- Une solution du phénanthroline (0.5 %) a été réalisée en dissolvant 0.05 g de 1,10-phénanthroline dans un volume de 10 ml de méthanol.
- Une autre solution de chlorure ferrique (FeCl_3 ; 0.2 %) a été préparée en dissolvant 0,02 g de FeCl_3 dans un volume de 10 ml d'eau.
- Pour chaque extrait (CHCl_3 , AcOEt, *n*-BuOH) une solution mère et une série de solutions diluées de concentrations (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125) $\mu\text{g/ml}$ ont été préparées.
- Pour chaque concentration, en mélangeant 10 μl d'extrait avec 30 μl de phénanthroline, 110 μl de méthanol et 50 μl de FeCl_3 dans une microplaque.
- Le contrôle négatif est préparé de manière similaire, en remplaçant l'échantillon par le méthanol, puis en ajoutant les autres réactifs comme décrits précédemment.
- L'absorbance a été mesurée à 510 nm après incubation de 20 minutes à 30 °C.

4. L'activité antimicrobienne :

Nous avons étudié deux activités antimicrobienne *in vitro* ; l'activité antibactérienne et l'activité antifongique en suivant la méthode de diffusion en milieu solide [77]. Les deux activités ont été réalisées au centre de recherche de biotechnologie, l'activité antibactérienne au niveau du laboratoire de bactériologie et l'activité antifongique au niveau de laboratoire de mycologie.

4.1.L'activité antibactérienne :

4.1.1 Principe de la réaction :

L'activité antibactérienne des extraits a été déterminée à l'aide de la méthode de diffusion sur disque, qui est une méthode simple et pratique et largement utilisée notamment en microbiologie pour évaluer la sensibilité des micro-organismes aux agents antimicrobiens, où la zone d'inhibition de la croissance des micro-organismes autour des disques antimicrobiens est mesuré manuellement à l'aide d'une règle [78].

4.1.2. Protocol :

- **Les souches bactériennes** : notre étude a porté sur deux souches disponible dans le CRBT, de référence qui sont les suivantes : une bactérie pathogène à gram positive: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), et une bactérie à gram négative : *Escherichia coli* (ATCC 25922).
- **Préparation de milieu de culture** : le milieu Muller Hinton est fondu puis couler sur chaque boite de pétri. Les boites sont pré sèches avant l'utilisation.
- **Préparation de l'inoculum bactérien**: à partir d'une culture de 24 heures à 37 degrés, 4 à 5 colonies d'aspect identiques bien isolées ont été sélectionnées et transférées dans un tube contenant une solution de chlorure de sodium à 0.9%. , afin d'obtenir une solution bactérienne homogène avec une densité cellulaire initiale ou une turbidité proche de la densité de Mc Ferland de $0.5 (10^8 \text{ UFC/ml})$.



Figure 16: Préparation de l'inoculum.

- **Ensemencement** : à l'aide d'un écouvillon, la suspension a été étalée sur toute la surface de la gélose Mueller-Hinton par La méthode des trois cadrant. Ce processus est répété trois fois, en retournant la boîte d'environ 60 degrés après chaque application, l'objectif étant d'obtenir une distribution uniforme de l'inoculum.



Figure 17: Ensemencement des souches

- **Préparation des dilutions** : les trois extraits (CHCl_3 , AcOEt, *n*-BuOH) ont été repris avec le diméthylsulfoxyde (DMSO). Pour chaque extrait utilisé une solution mère a été préparée de concentration de 5mg/ml et 4 dilutions ont été réalisées de concentration : (2.5/ml, 1.25mg/ml, 0.625mg, 0.3125) mg/ml.



Figure 18: Préparation des dilutions.

- **Préparation des disques** : les disques ont été préparés à partir de papier Wattman N°3 et stérilisés dans un autoclave à une température de 120° pendant 20 minutes.

- **Dépôt des disques** : le disque stérile de papier Wattman N°3 a été posé sur la surface de la gélose Mueller-Hinton après avoir été imprégné avec 30 μ L de l'extrait respectif à différentes concentrations à l'aide d'une micropipette, ensuite les boîtes ont été incubées pendant 24h à 37°C.

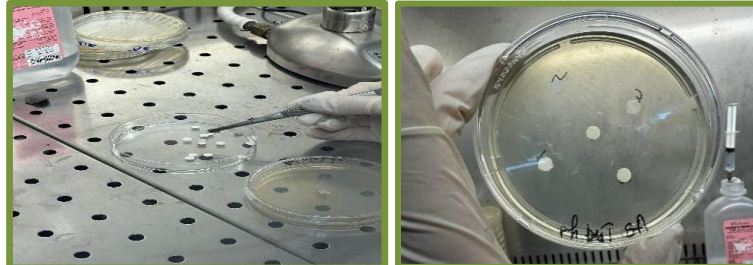


Figure 19 : Le dépôt des disques

- **Lecture des résultats** : après l'incubation l'effet des extraits se traduit par l'apparition autour de disque d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de la croissance. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible [79]. L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition. La sensibilité aux différents extraits a été notée selon le diamètre des halos d'amortissement comme suit :
 - Insensible (-) ou résistante: aux diamètres inférieurs de 8 mm.
 - Sensible (+): diamètre entre 9 à 14 mm.
 - Très sensible (++) : pour les diamètres entre 15 à 19 mm.
 - Extrêmement sensible (+++): diamètre supérieurs à 20 mm [79].

4.2.L'activité antifongique :

4.2.1. Principe de la réaction :

Le fondement de l'activité antifongique des composés naturels repose sur leurs interactions avec les cellules fongiques, entraînant la perturbation de divers processus cellulaires cruciaux pour la survie et la croissance des champignons, aboutissant ultimement à leur destruction [80].L'activité antifongique des trois extraits a été déterminée à l'aide de la méthode de diffusion [81].

4.2.2 . Protocol :

- **Les champignons utilisés :** notre étude a porté sur deux champignons disponibles dans le CRBT phytopathogènes qui sont : *Alternaria sp* et *Fusarium oxysporum f.sp. Lycopersici*.
- **Préparations de milieu de culture PDA :** la préparation de milieu PDA se prépare en faisant bouillir une quantité de pomme de terre coupée en petit morceau avec de l'eau dans un bêcher sur une plaque chauffante jusqu'à cuisson. Une fois le jus de pomme de terre sera prêt, on le récupère et on ajoute 44g de D glucose et 44g d'Agar et on le met sur agitateur chauffante et après l'homogénéisation du milieu, on complète le volume avec l'eau distillée stérile jusqu'à 2200 ml. On divise ce volume sur 22 Erlenmeyer stérile, chaque Erlenmeyer contient 100 ml de milieu PDA. Pour stériliser le milieu, ces 22 Erlenmeyer ont été placés dans un autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Après stérilisation et refroidissement, ils ont été versés dans des boîtes de Pétri à 45°C.
- **Préparation des dilutions:** pour les trois extraits (CHCl₃, AcOEt, *n*-BuOH) une solution mère a été préparée par la solubilisation de 3 mg d'extrait dans un volume de 300µl de DMSO à partir de laquelle on a préparé une série de solutions diluées de concentrations (1.25, 2.5, 5,10) µg/ml.
- **Evaluation de l'activité antifongique (Méthode de diffusion) :** l'activité antifongique des extraits est évaluée par la méthode de disque. Un disque de 5mm de diamètre pris d'une culture de champignon de 7 jours est déposé aseptiquement au centre de la boîte de pétri contenant le PDA et 23 µl de chaque extraits ont été appliqués sur le dessus de chaque disque, l'expérience est répétée 3 fois pour chaque concentration d'extrait. Le témoin est préparé en remplaçant l'extrait par le DMSO et un témoin négatif aussi est préparé en mettant le champignon sur le PDA seulement. Après 48h d'incubation à 25° C, la croissance mycélienne du champignon est mesurée à l'échelle millimétrique à l'aide d'une règle (d).
- **Lecture des résultats :** l'activité inhibitrice est effectuée en mesurant la croissance radiale du champignon sur le milieu PDA. Cela implique de mesurer le diamètre des colonies de champignons sur le milieu PDA avec l'application du produit par rapport au diamètre moyen des colonies de chaque milieu de lutte contre les champignons (DMSO) et de calculer la différence de diamètre. Les résultats sont ensuite exprimés en pourcentage d'inhibition de la croissance de

chaque champignon par chaque produit. L'activité d'inhibition en pourcentage est calculée selon la formule ci-dessous [81]:

$$\text{PI (\%)} = (D - d) / D \times 100$$

- **PI** : pourcentage d'inhibition.
- **D** : Croissance radiale du champignon en mm sur le PDA avec DMSO (témoin +).
- **d** : Croissance radiale du champignon en mm sur le PDA contenant l'extrait.

Résultats et discussion

Chapitre III : Résultats et discussions

1. Résultats des analyses quantitatives:

1.1 Résultat de dosage des polyphénols:

Le taux de polyphénols totaux présent dans les extraits de la plante a été quantifié par spectrophotométrie UV /Vis. La courbe d'étalonnage établie à l'aide de différentes concentrations de l'acide gallique à partir d'une solution mère, a permis d'estimer la teneur en composé phénolique de l'extrait. Les absorbances de la courbe d'étalonnage en fonction de leurs concentrations sont reportés sur la figure suivante :

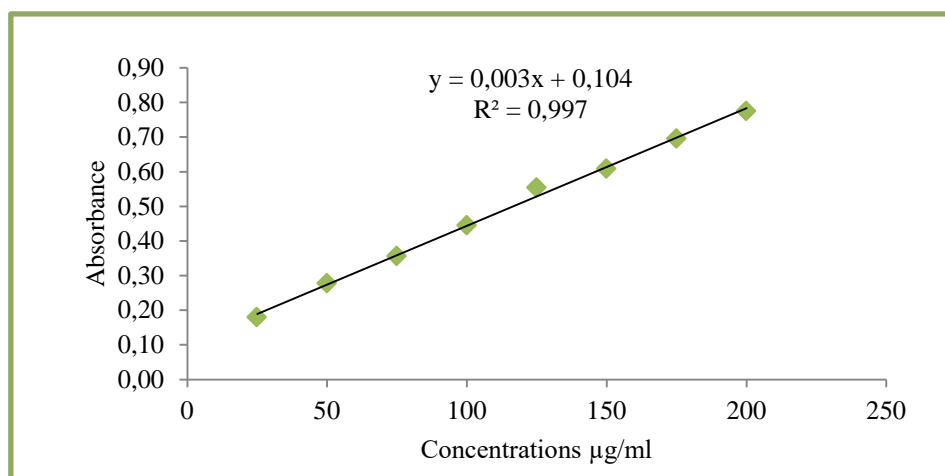


Figure 20 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

La teneur en polyphénols totaux estimé pour chaque extrait est calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en microgrammes en acide gallique par milligramme d'extrait est représentée dans le tableau 2 :

Tableau 2 : Résultats du dosage des polyphénols.

| Extrait | CHCl ₃ | AcOEt | <i>n</i> -BuOH |
|-----------------------------------|-------------------|-------------|----------------|
| Teneur en polyphénols (µgEAG /mg) | 261,5±1,21 | 655,23±1,36 | 702,24±2,90 |

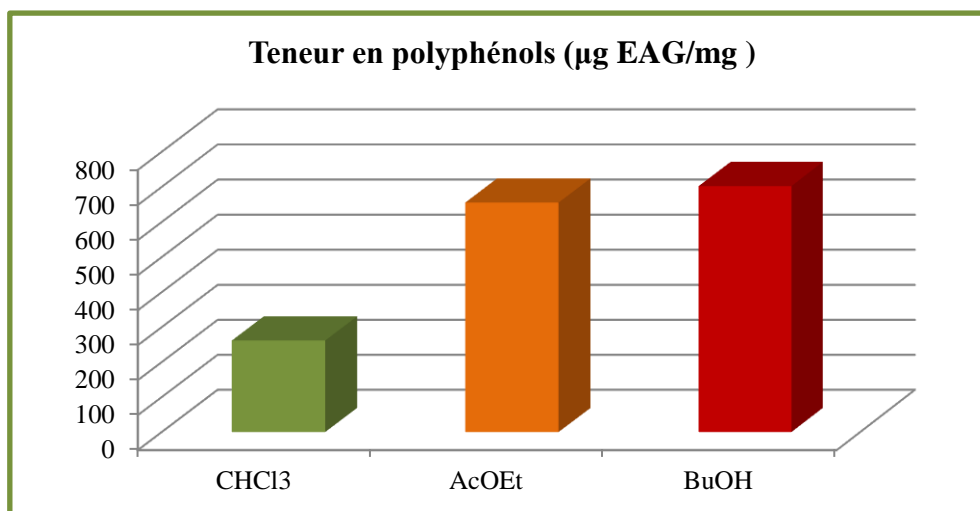


Figure 21 : Histogramme représente la quantité en (µg) des polyphénols dans les trois extraits.

- ✓ Le taux des polyphénols totaux calculé a révélé que l'espèce étudiée présente une teneur importante en composés phénoliques pour l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait butanolique, avec un taux plus élevé pour l'extrait butanolique (702,24±2,90 µgEAG/mg d'extrait), tandis que l'extrait chloroformique présente une teneur faible en composés phénoliques avec un taux de (261,5±1,21µgEAG/mg d'extrait).

1.2 Résultat de dosage des flavonoïdes:

La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard (la quercétine). Les absorbances de la courbe d'étalonnage en fonction de leurs concentrations sont reportés sur la figure suivante :

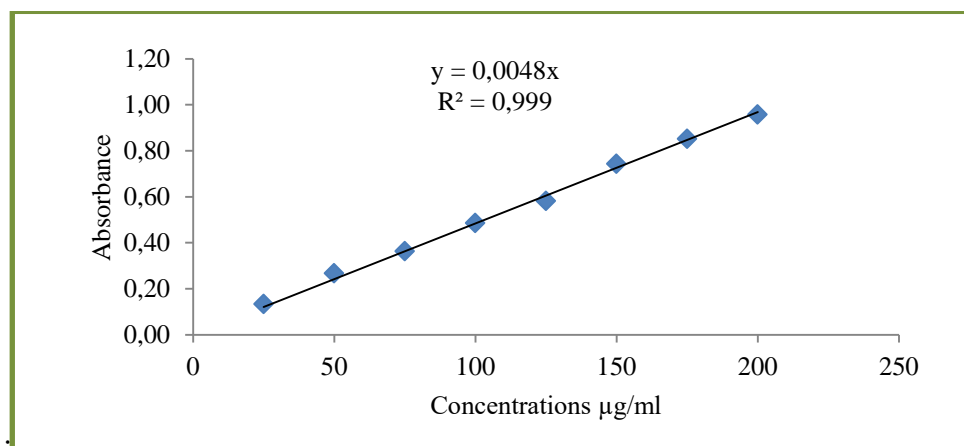


Figure 22 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

La teneur en flavonoïdes de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage et a été exprimée en microgrammes équivalent en quercétine par milligramme d'extrait est représentée dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Résultats du dosage des flavonoïdes.

| Extrait | CHCl ₃ | AcOEt | <i>n</i> -BuOH |
|-------------------------------------|-------------------|--------------|----------------|
| Teneur en flavonoïdes (μg EQ/mg) | 40,97±0,44 | 277,63 ±1,04 | 302,77±1,02 |

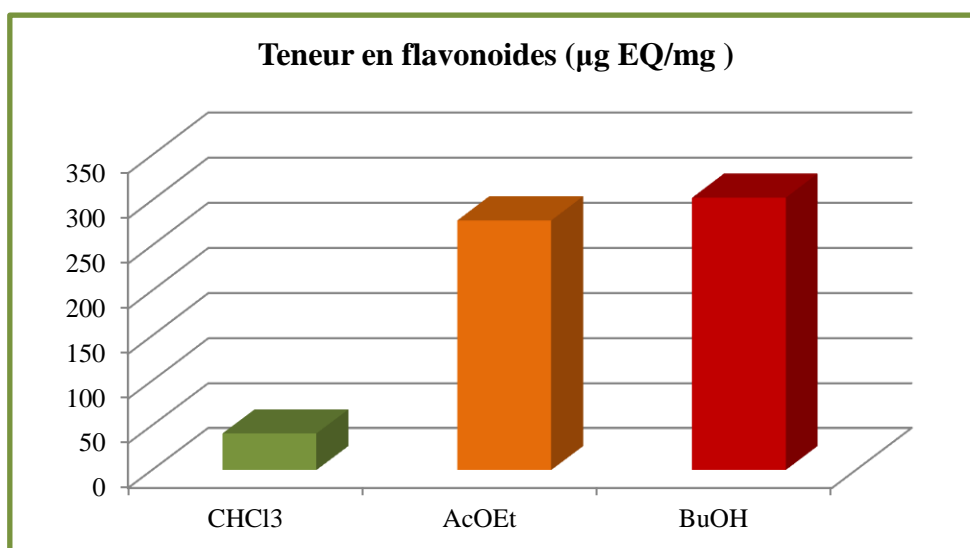


Figure 23: Histogramme représente la quantité en (μg) des flavonoïdes dans les trois extraits.

- ✓ Pour les flavonoïdes, le taux calculé a montré que l'extrait butanolique a la plus grande valeur (302,77±1,02 μg EQ/mg d'extrait) suivi par l'extrait acétate d'éthyle (277,63 ±1,04 EQ/mg d'extrait) et enfin l'extrait chloroformique (40,97±0,44μg EQ/mg d'extrait).
- ✓ Les résultats du dosage des polyphénols totaux sont conformes avec ceux des flavonoïdes. Ces résultats ont permis de classer les extraits selon leur richesse en composés phénoliques comme suit : extrait butanolique > extrait d'acétate d'éthyle > extrait chloroformique.

2. Résultat de l'activité antioxydante :

2.1. Résultat du test DPPH :

Dans ce test, l'activité anti-radicalaire des trois extraits CHCl_3 , AcOEt et *n*-BuOH a été évalué par la mesure des concentrations inhibitrices à 50% (IC_{50}) selon la formule indiquée dans la partie précédente, en se basant sur la capacité d'une substance à réduire le radical DPPH par rapport à des antioxydants standards (BHT et BHA)(Annexe 3) Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Inhibition du radical DPPH par les extraits CHCl_3 , AcOEt, *n*-BuOH

| Concentration (µg/ml) Extraits | % d'inhibition | | | | | | | IC_{50} (µg/ml) |
|-----------------------------------|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------------------------|
| | 12.5 | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 | 800 | |
| CHCl_3 | 11,00±6,98 | 15,25±4,60 | 28,12±1,20 | 50,40±1,87 | 72,10±2,08 | 73,13±1,81 | 74,22±1,87 | 392,64±10,00 |
| AcOEt | 11,39±5,01 | 6,36±5,87 | 20,25±6,98 | 50,31±4,60 | 28,12±1,20 | 82,16±0,71 | 83,21±1,38 | 16,86±0,70 |
| <i>n</i>-BuOH | 3,09±0,79 | 11,52±2,42 | 26,29±1,18 | 58,83±1,09 | 80,07±1,08 | 82,12±1,09 | 83,22±1,07 | 43,21±0,40 |
| BHA | 76,55±0,48 | 79,89±0,26 | 81,73±0,10 | 84,18±0,10 | 87,13±0,17 | 89,36±0,19 | 90,14±0,00 | 6,14±0,41 |
| BHT | 49,09±0,76 | 72,63±2,06 | 88,73±0,89 | 94,00±0,31 | 94,97±0,08 | 95,38±0,41 | 95,02±0,23 | 12,99±0,41 |

Les courbes de l'absorbance en fonction des différentes concentrations sont reportées sur la figure suivante

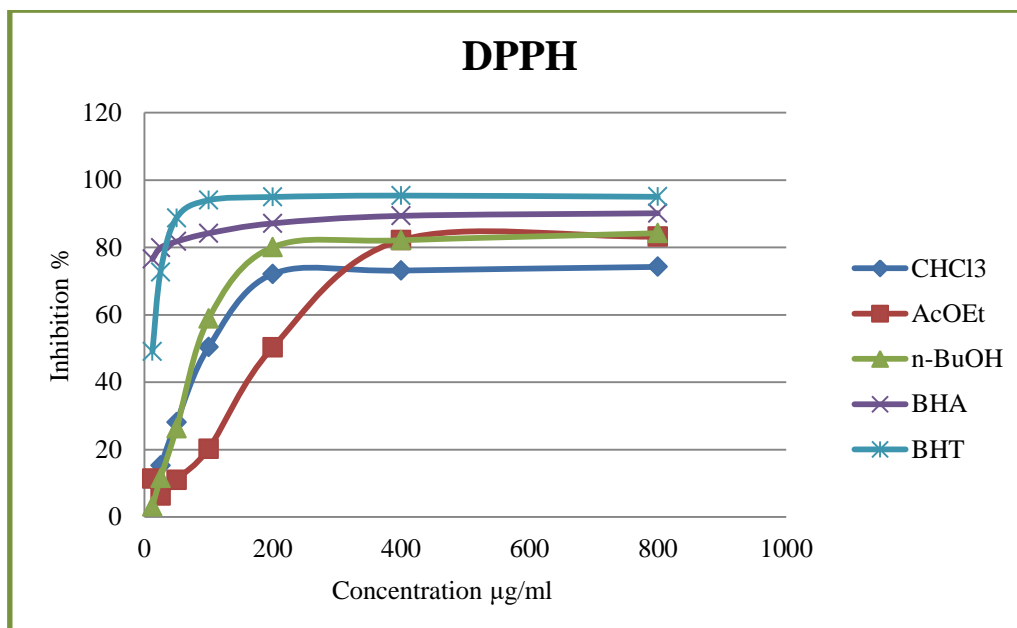


Figure 24 : Courbe représentative du pouvoir d'inhibition des trois extraits par le test DPPH.

- ✓ D'après le tableau 4, les résultats révèlent que les extraits acétate d'éthyle et butanolique sont les plus actifs avec des IC_{50} $16,86 \pm 0,70$ $\mu\text{g/ml}$ et $43,21 \pm 0,40$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement par rapport aux standards BHT et BHA ($12,99 \pm 0,41$ $\mu\text{g/ml}$, et $6,14 \pm 0,41$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement). L'extrait chloroformique est le plus faible avec une IC_{50} $392,64 \pm 10,00$ $\mu\text{g/ml}$.
- ✓ Les études indiquent le rôle direct des polyphénols et des flavonoïdes dans l'augmentation du pouvoir des antioxydants et l'inhibition des radicaux libres [82]. Cela explique la différence dans les résultats de l'activité antioxydante des trois extraits et la supériorité des extraits : acétate d'éthyle et butanolique.

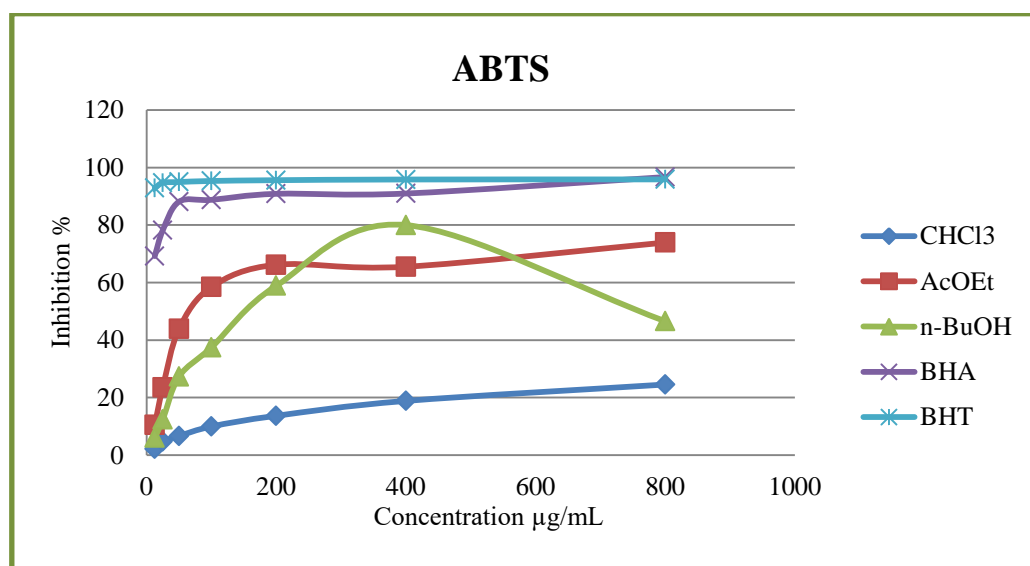
2.2. Résultat du test ABTS :

La méthode consiste à faire réagir l'antioxydant avec le cation radical $ABTS^{+}$, de couleur bleue, où les électrons sont transférés pour former $ABTSH^{+}$, qui est incolore. La réduction de couleur a été mesurée par lecture d'absorbance, permettant de déterminer la concentration inhibitrice des extraits testés, par rapport aux standards tels que le BHT et le BHA. Le pourcentage d'inhibition de l'ABTS a été calculé selon une formule prédéfinie. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Inhibition du cation ABTS^{•+} par les extraits CHCl₃, AcOEt, *n*-BuOH

| Concentration Extraits(µg/ml) | % d' inhibition | | | | | | | IC ₅₀ (µg/ml) |
|-------------------------------|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------------------|
| | 12.5 | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 | 800 | |
| CHCl₃ | 2,18±1,24 | 4,79±2,77 | 6,66±0,80 | 9,96±7,56 | 13,68±0,33 | 18,85±0,64 | 24,55±1,93 | >800 |
| AcOEt | 10,49±4,17 | 23,59±2,72 | 43,93±1,94 | 58,47±5,67 | 66,19±5,63 | 65,50±1,73 | 73,91±2,13 | 70,75±4,46 |
| <i>n</i>-BuOH | 6,02±0,65 | 12,41±0,82 | 27,32±8,30 | 37,49±0,40 | 58,89±7,97 | 79,98±5,35 | 46,54±6,60 | 157,40±14,07 |
| BHA | 69,21±0,40 | 78,23±1,34 | 88,12±1,28 | 88,76±3,07 | 90,85±1,74 | 90,95±0,51 | 96,68±0,39 | 1,29±0,30 |
| BHT | 92,83±1,42 | 94,68±0,42 | 94,95±0,90 | 95,32±0,25 | 95,59±0,47 | 95,83±0,15 | 95,86±0,10 | 1,81±0,10 |

Les courbes de l'absorbance en fonction des différentes concentrations sont reportées sur la figure suivante :

**Figure 25** : Courbe représentative du pouvoir d'inhibition des trois extraits par le test ABTS.

- ✓ Nos résultats ont démontré que les extraits d'acétate d'éthyle présentent une activité supérieure à celle des extraits butanoliques, avec des valeurs de IC₅₀ respectives de 70,75 ± 4,46 µg/ml et 157,40 ± 14,07 µg/ml. Cependant, en comparaison avec les standards BHA et BHT, qui affichent des IC₅₀ de 1,29 ± 0,30 µg/ml et 1,81 ± 0,10

$\mu\text{g/ml}$ respectivement, il est conclu que les deux extraits (*n*-BuOH, AcOEt) sont inactifs par rapport à ces standards.

- ✓ Les résultats de l'ABTS ont également confirmé que l'extrait chloroformique a la plus faible activité antioxydante et ces résultats sont cohérents avec les résultats du test DPPH.

2.3. Résultat du test phénanthroline :

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir donneur d'électron. Cette technique permet de mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) qui ensuite réagit avec la phénanthroline pour donner un complexe de couleur rouge orangé, et qui absorbe à 510 nm. Les résultats obtenus avec les trois extraits sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau 6: Absorbance du complexe Fe^{2+} -phénanthroline des trois extraits

| Concentration ($\mu\text{g/ml}$)Extraits | Absorbance | | | | | | | $A_{0,5}$ |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------|
| | 3.125 | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | 100 | 200 | $A_{0,5}(\mu\text{g/ml})$ |
| CHCl_3 | 0,31 \pm 0,01 | 0,27 \pm 0,03 | 0,29 \pm 0,04 | 0,30 \pm 0,04 | 0,34 \pm 0,02 | 0,40 \pm 0,02 | 0,43 \pm 0,03 | >200 |
| AcOEt | 0,42 \pm 0,05 | 1.30 \pm 0,06 | 1,20 \pm 0,24 | 2,08 \pm 0,23 | 2,67 \pm 0,47 | 3,40 \pm 0,07 | 3,59 \pm 0,01 | 3,42 \pm 0,18 |
| <i>n</i>-BuOH | 0,36 \pm 0,09 | 0,33 \pm 0,02 | 0,44 \pm 0,02 | 0,63 \pm 0,03 | 0,87 \pm 0,09 | 1,50 \pm 0,07 | 2,89 \pm 0,49 | 16,84 \pm 0,91 |
| BHA | 0,49 \pm 0,01 | 0,59 \pm 0,01 | 0,73 \pm 0,02 | 0,93 \pm 0,01 | 1,25 \pm 0,04 | 2,10 \pm 0,05 | 4,89 \pm 0,06 | 0,93 \pm 0,07 |
| BHT | 0,47 \pm 0,01 | 0,47 \pm 0,01 | 0,53 \pm 0,03 | 1,23 \pm 0,02 | 1,84 \pm 0,01 | 3,48 \pm 0,03 | 4,84 \pm 0,01 | 2,24 \pm 0,17 |

Les courbes de l'absorbance en fonction des différentes concentrations sont reportées sur la figure suivante

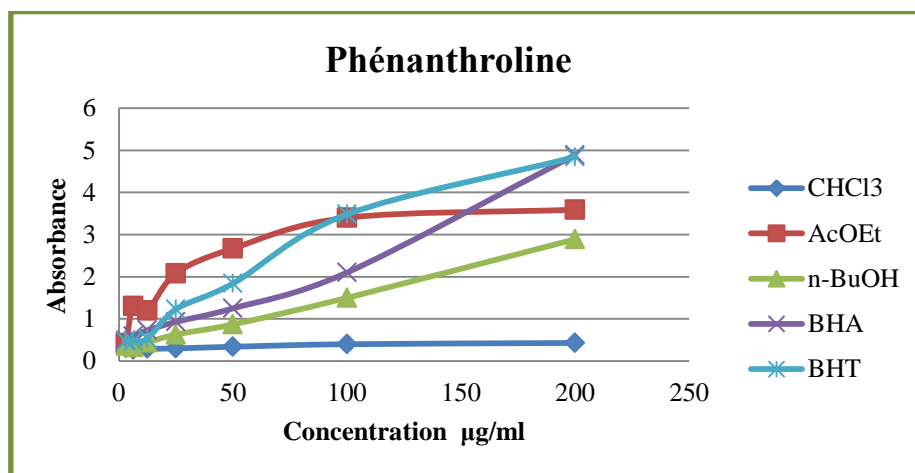


Figure 26 : Courbe représentative les absorbances des différents standards et extraits (phénanthroline).

- ✓ Les résultats du test phénanthroline ont confirmé les résultats des deux premiers tests, où les résultats ont montré que l'extrait acétate d'éthyle possède une activité antioxydante très significative ($A_{0,5} = 3,42 \pm 0,18 \mu\text{g/ml}$) par rapport aux standards utilisés BHT et BHA ($A_{0,5} = 2,24 \pm 0,17 \mu\text{g/ml}$ et $0,93 \pm 0,07$ respectivement), suivi de près par l'extrait butanolique ($A_{0,5} = 16,84 \pm 0,91 \mu\text{g/ml}$) et enfin avec moins d'efficacité l'extrait chloroformique ($A_{0,5} > 200 \mu\text{g/ml}$).

3. Résultats de l'activité antimicrobienne :

3. 1. Résultat de l'activité antibactérienne :

Après 24 heures d'incubation, les boîtes de Pétri ont été récupérées (Figures 28, 29 et 30) et les diamètres des zones d'inhibition des trois extraits sur les souches bactériennes étudiées ont été mesurés (on a calculé la moyenne de chaque trois boîtes d'une même concentration de chaque extrait) ; les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 7: zone d'inhibition de l'activité antibactérienne des trois extraits sur les *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*

| Souches bactériennes | Zone d'inhibition (mm) | | | | | | | | | |
|---------------------------------|--|------|------|------|----|---|------|------|-----|---|
| | <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) | | | | | <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) | | | | |
| [C]mg/ml | 0,31 | 0,62 | 1,25 | 2,5 | 5 | 0,31 | 0,62 | 1,25 | 2,5 | 5 |
| CHCl ₃ | / | / | / | / | / | / | / | / | / | 6 |
| AcOEt | 12,3 | 15,6 | 17,5 | 17,8 | 18 | / | / | / | / | / |
| n-BuOH | / | / | 13 | 14 | 17 | / | / | / | / | / |
| Témoin négative DMSO (20 µl) | / | | | | | / | | | | |
| Témoin positive Amoxicilline | 41 mm | | | | | 20 mm | | | | |

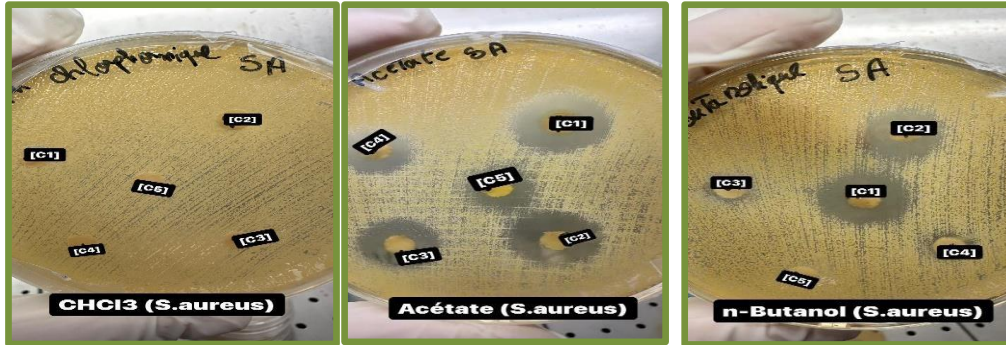


Figure 27: L'effet des trois extraits (CHCl₃, AcOEt, n-BuOH) sur la souche bactérienne *Staphylococcus aureus*.

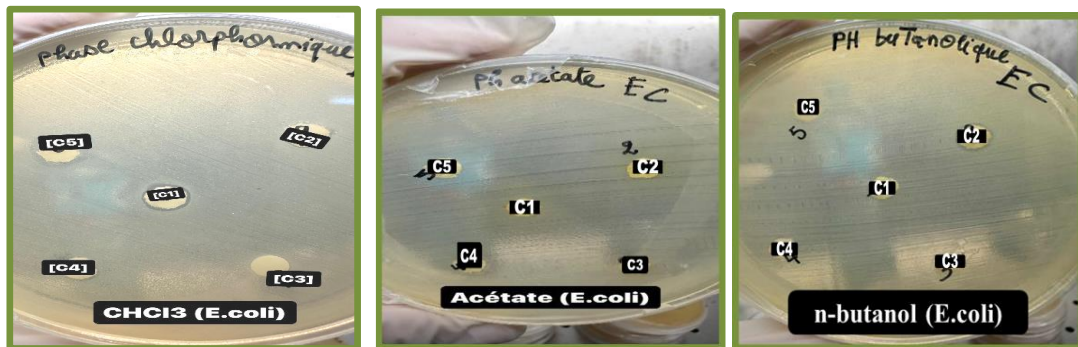


Figure 28: L'effet des trois extraits (CHCl₃, AcOEt, n-BuOH) sur la souche bactérienne *Escherichia coli*

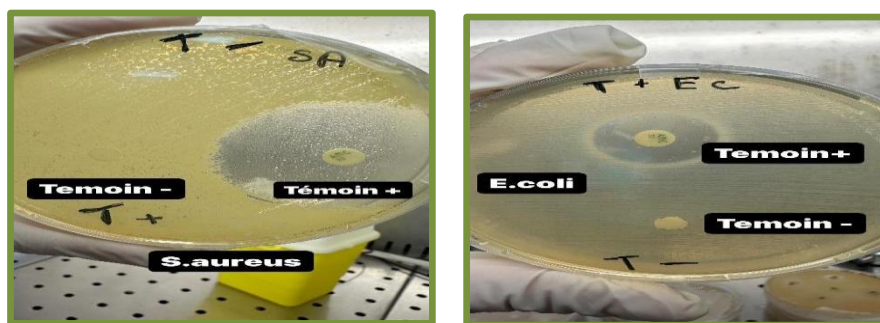


Figure 29 : L'effet de l'amoxicilline sur les deux souches testées (*S. aureus*, *E. coli*)

D'après les résultats obtenus, nous concluons ce qui suit :

- ✓ Les extraits de la plante *Vinca* montrent une efficacité antibactérienne plus marquée sur la bactérie à gram positif que sur celle à gram négatif. Plus précisément, l'extrait acétate d'éthyle présente une activité marquée contre *Staphylococcus aureus*. Ce dernier montre également une sensibilité accrue à toutes les concentrations testées de l'extrait (2.5, 1.25, 0.62, 0.31) (mg/ml), notamment à 5 mg/ml, où la zone d'inhibition est atteinte 18 mm.
- ✓ L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait *n*-butanol révèle une sensibilité élevée, bien que moindre que celle de l'extrait acétate d'éthyle, contre *Staphylococcus aureus* aux concentrations élevées (1.25, 2.5, 5) (mg/ml), mais aucune sensibilité, aux concentrations plus faibles (0.31, 0.62) (mg/ml). En comparaison, l'extrait chloroformique n'a pas montré de sensibilité à toutes les concentrations étudiées (figure 28).
- ✓ Concernant la bactérie à gram négatif ; *Escherichia coli*, aucune sensibilité n'a été observée pour les deux extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol, tandis qu'un effet inhibiteur marginal a été noté avec l'extrait chloroformique (figure 29).
- ✓ Les études ont montré que l'activité antibactérienne des extraits dépend de la richesse de ces derniers en composés phénoliques et en divers métabolites secondaires tels que les tanins et les alcaloïdes [83]. Ainsi, la différence d'activité antibactérienne entre les trois extraits peut s'expliquer par leur teneur différente de ces composés actifs.
- ✓ D'autre part, la recherche a montré que les métabolites secondaires exercent leur effet sur les cellules bactériennes par divers mécanismes [84]. Par exemple, les polyphénols végétaux ont la capacité d'interagir avec les protéines et les parois cellulaires bactériennes, de perturber les fonctions cytoplasmiques et la perméabilité membranaire, d'inhiber le métabolisme énergétique, d'endommager l'ADN ou d'inhiber la méthylation de l'ADN chez les bactéries [85].
- ✓ D'un autre côté, la bactérie à gram positive testé (*Staphylococcus aureus*) a montré une sensibilité accrue aux extraits testés par rapport à la bactérie de gram négative (*Escherichia coli*). Cette observation peut être attribuée aux différences dans les caractéristiques des parois cellulaires entre les deux types de bactéries. En effet, les bactéries gram négatives présentent une résistance intrinsèque aux agents antimicrobiens en raison de la structure de leurs membranes externes, constituées de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes [86].

3.2. Résultat de l'activité antifongique :

L'activité antifongique des trois extraits CHCl_3 , AcOEt et *n*-BuOH a été testé sur deux champignons pathogènes *Fusarium oxysporum* *f. sp. lycopersici* (*FOL*) et *Alternaria*, après 48h d'incubation, la croissance mycélienne du champignon a été mesuré à l'aide d'une règle en Mm on a calculé la moyenne de 3 boites de chaque concentration d'extraits puis le taux d'inhibition a été calculé, les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux suivants :

Tableau 8: Diamètres des zones de développement des champignons en présence des extraits en (mm).

| Diamètre de la zone de développement du champignon <i>FOL</i> (mm) | | | | | | | | | | | | |
|---|-------------------------|-----|------|------|---------------|------|------|-----|--------------|------|------|------|
| Extraits | Extrait CHCl_3 | | | | Extrait AcOEt | | | | Extrait BuOH | | | |
| Concentration (μl) | 1,25 | 2,5 | 5 | 10 | 1,25 | 2,5 | 5 | 10 | 1,25 | 2,5 | 5 | 10 |
| Résultats (mm) | 14,3 | 15 | 13,3 | 12,6 | 14,3 | 14,3 | 10,3 | 8,6 | 14,6 | 17,3 | 14,3 | 15 |
| Témoin (+) : champignon +PDA+DMSO : 15,3 mm | | | | | | | | | | | | |
| Témoin (-) : champignon +PDA : 17 mm | | | | | | | | | | | | |
| Diamètre de la zone de développement du champignon <i>Alternaria</i> (mm) | | | | | | | | | | | | |
| Extraits | Extrait CHCl_3 | | | | Extrait AcOEt | | | | Extrait BuOH | | | |
| Concentration (μl) | 1,25 | 2,5 | 5 | 10 | 1,25 | 2,5 | 5 | 10 | 1,25 | 2,5 | 5 | 10 |
| Résultats (mm) | 10,3 | 9,6 | 7,3 | 8,3 | 16 | 10,3 | 15 | 11 | 9,3 | 6,6 | 9,6 | 11,6 |
| Témoin (+) : champignon +PDA+DMSO : 10 mm | | | | | | | | | | | | |
| Témoin (-) : champignon +PDA : 18 mm | | | | | | | | | | | | |

Tableau 9: Taux d'inhibition de la croissance mycélienne

| Champignon <i>FOL</i> | Taux d'inhibition (%) | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|-------------------------|------|-------|-------|---------------|------|-------|-------|--------------|-----|------|------|
| | Extrait CHCl_3 | | | | Extrait AcOEt | | | | Extrait BuOH | | | |
| Concentration (μl) | 1,25 | 2,5 | 5 | 10 | 1,25 | 2,5 | 5 | 10 | 1,25 | 2,5 | 5 | 10 |
| Résultats | 6,5 | 1,96 | 13,07 | 17,74 | 6,53 | 6,53 | 32,67 | 43,79 | 4,57 | 0 | 6,53 | 1,96 |
| Champignon <i>Alternaria</i> | Taux d'inhibition (%) | | | | | | | | | | | |
| | Extrait CHCl_3 | | | | Extrait AcOEt | | | | Extrait BuOH | | | |
| Concentration (μl) | 1,25 | 2,5 | 5 | 10 | 1,25 | 2,5 | 5 | 10 | 1,25 | 2,5 | 5 | 10 |
| Résultats | 0 | 4 | 27 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 34 | 4 | 0 |

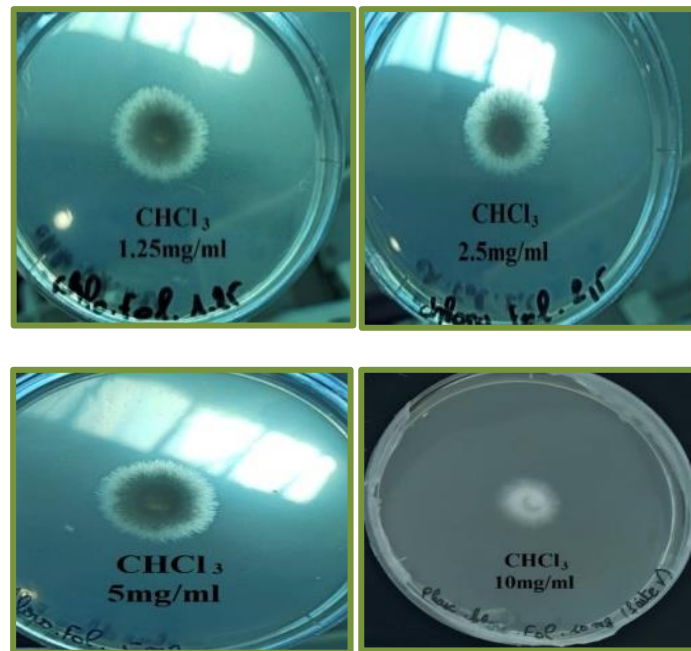


Figure 30 : l'évolution du *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici* (FOL) avec l'extrait chloroformique.

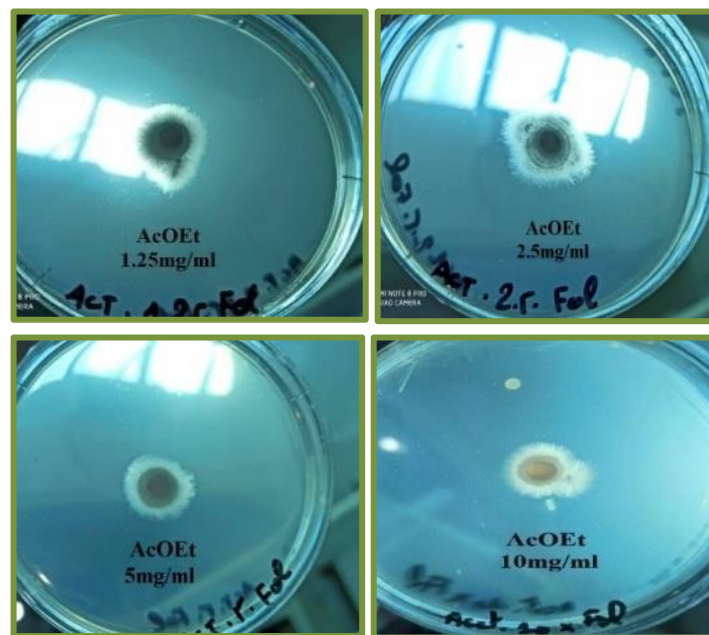


Figure 31 : l'évolution du *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici* (FOL) avec l'extrait acétate d'éthyle.

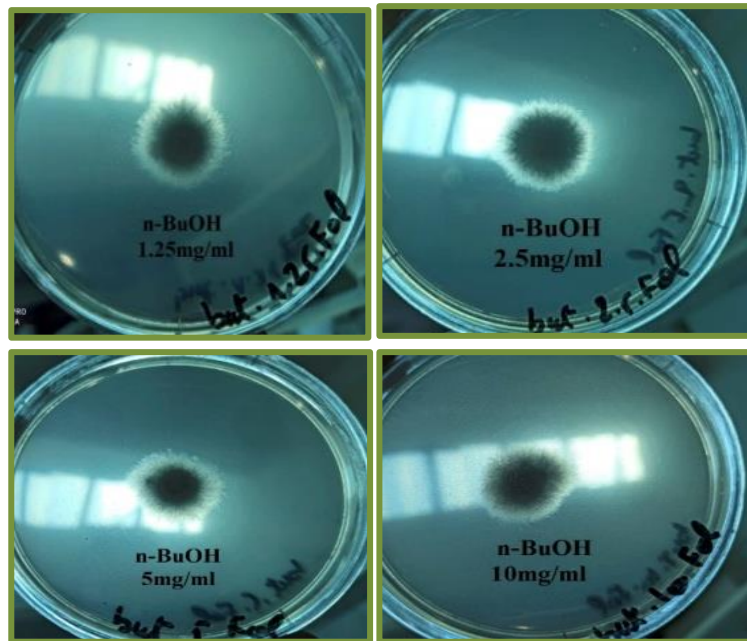


Figure 32 : l'évolution du *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici* (FOL) avec l'extrait butanolique

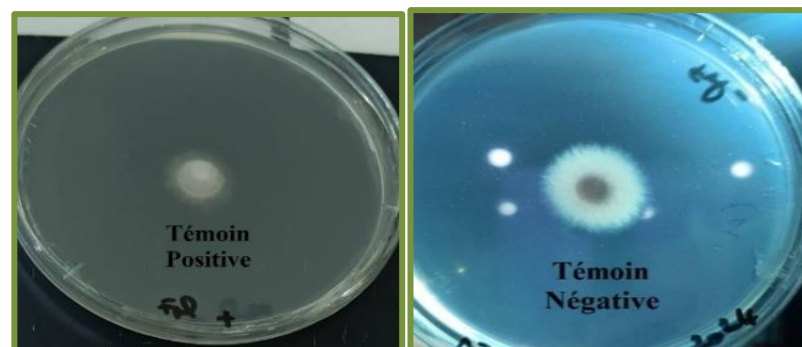


Figure 33 : l'évolution du *Fusariumoxysporum f.sp.lycopersici* (FOL) avec les deux témoins

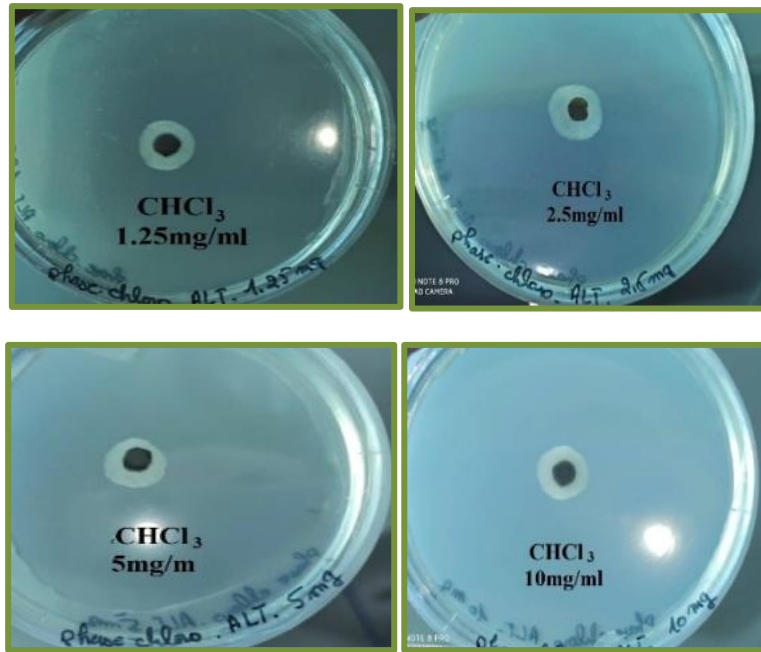


Figure 34: l'évolution d'*Alternaria sp.* avec l'extrait chloroformique

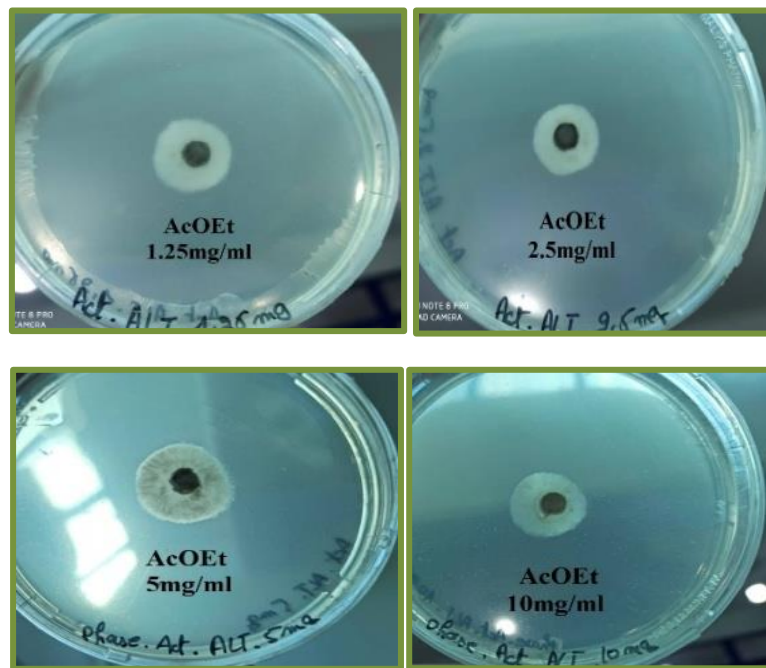


Figure 35 : l'évolution d'*Alternaria sp.* avec l'extrait acétate d'éthyle

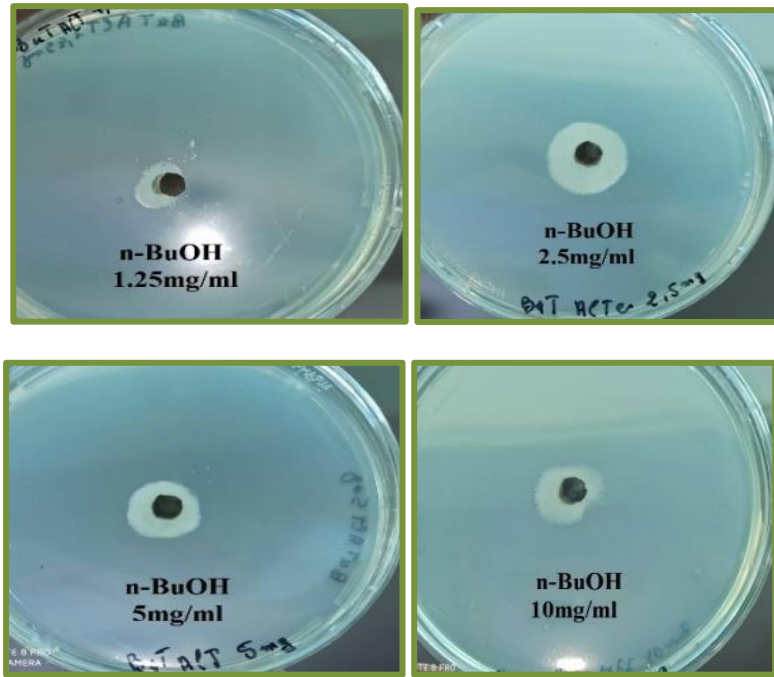


Figure 36: l'évolution d'*Alternaria sp* avec l'extrait butanolique

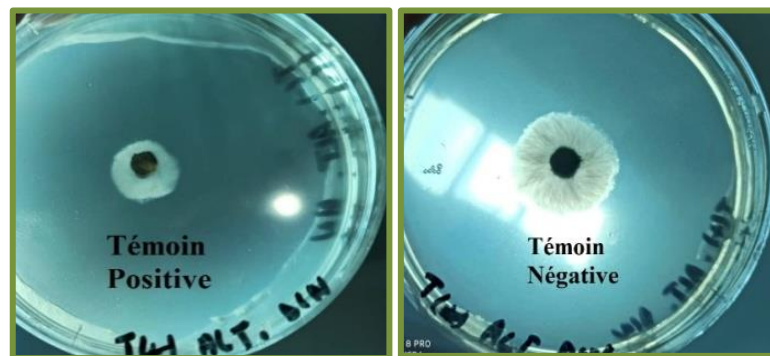


Figure 37: l'évolution d'*Alternaria sp* avec les deux témoins

- ✓ Les extraits de notre plante ont montré une activité antifongique significative contre le champignon *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici* (FOL) par rapport au champignon *Alternaria sp*.
- ✓ Les différents extraits testés (CHCl_3 , AcOEt et *n*-BuOH) ont conduit à une diminution significative du diamètre des colonies (FOL) par rapport au contrôle positif. Cette diminution s'est avérée plus marquée avec l'extrait Acétate d'éthyle plus qu'avec l'extrait de Chloroforme, notamment à des concentrations élevées (5 et 10 mg/ml). En revanche,

l'extrait de *N*-butanol a montré une réduction plus faible du diamètre des colonies avec toutes les concentrations testées (1.25, 2.5, 5 et 10 mg/ml).

- ✓ Pour le champignon *Alternaria sp* , l'extrait Chloroformique a montré une diminution significative du diamètre des colonies par rapport au contrôle positif aux concentrations 5 et 10 mg/ml. De plus, une diminution significative du diamètre des colonies a été observée pour l'extrait *n*- butanol à la concentration 2,5 mg/ml, tandis que l'extrait Acétate d'éthyle aucune diminution n'a été observée pour ce champignon avec toute les concentrations testées.
- ✓ Les effets inhibiteurs des extraits végétaux (Chloroforme, Acétate d'éthyle, *N*-butanol) sur la croissance des champignons *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici (FOL)* et *Alternaria sp* ont montré des résultats différents selon les concentrations utilisées. Le taux d'inhibition le plus élevé (PI=43,79%) a été enregistré avec l'extrait Acétate 'éthyle contre le champignon *FOL* à la concentration 10 mg/ml, tandis que le pourcentage d'inhibition le plus élevé contre le champignon *Alternaria sp* (PI=34%) a été enregistré à la concentration 2.5 mg/ml avec l'extrait Butanolique.
- ✓ Les résultats obtenus avec L'acétate d'éthyle et l'extrait Butanolique peuvent s'expliquer par le fait que ces deux derniers contiennent un nombre important et diversifié de métabolites secondaires comprennent les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins, molécules connues pour leur activité antifongique [87-88], cette étude confirme que les extraits des plantes peuvent empêcher ou retarder la croissance des champignons.

Conclusion

Conclusion :

Aujourd'hui, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie attire beaucoup d'attention dans la recherche biomédicale, devenant aussi importante que la pharmacothérapie. Cette popularité accrue est due, d'une part, à la richesse inépuisable des plantes en substances et composés naturels bio actifs, et d'autre part, à la quête de traitements plus doux et sans effets secondaires. Dans cette étude, notre intérêt est porté sur l'évaluation de l'activité biologique des extraits organiques d'une plante médicinale Algérienne du genre *Vinca*. Notre travail a débuté par l'estimation quantitative des phénols et des flavonoïdes pour les trois extraits : CHCl_3 , AcOEt et *n*-BuOH, en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu et trichlorure d'aluminium respectivement. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait butanolique était le plus riche en ce type de composants avec un taux en polyphénols de $702,24 \pm 2,90 \mu\text{g EAG/mg}$ et un taux en flavonoïdes de $302,77 \pm 1,02 \mu\text{g EQ/mg}$, suivi par l'extrait acétate. L'activité antioxydante de ces extraits a été évaluée par trois méthodes: DPPH, ABTS et phénantroline) en utilisant le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT) comme contrôles positifs, les résultats obtenus ont montré que l'extrait acétate d'éthyle était le plus actif, il possédait une activité antioxydante très significative par rapport aux standards utilisés (BHA, BHT) et par rapport aux autres extraits suivi par l'extrait butanolique avec un degré moindre. A la fin, l'activité antifongique et antibactérienne des trois extraits a été testée par la méthode de diffusion vis-à-vis deux souches bactériennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) et deux souches fongiques (*Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici* et *Alternaria sp*). Les résultats ont montré que les deux extraits : butanolique et acétate d'éthyle possèdent une sensibilité élevée contre *Staphylococcus aureus*. Concernant l'activité antifongique, les résultats ont montré que les trois extraits de notre plante, notamment l'acétate d'éthyle, possèdent une activité antifongique remarquable, particulièrement contre la souche fongique *Fusarium oxysporum.f.sp.lycopersici* (FOL). Les résultats obtenus sont très encourageants et ouvrent des perspectives pour des études ultérieures, telles que l'évaluation de nos extraits par rapport à d'autres activités biologiques, comme l'activité anti-inflammatoire, antitumorale et antidiabétique, et tester ces extraits sur d'autres souches bactériennes et fongiques.

Référence bibliographique

1. Lahsissene H., Kahouadji A. et Hseini S. (2009). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc Occidental). *Lejeunia, revue de botanique*, 175(3), p : 4-30.
2. Dasilva E. and Hoareau L. (1999). Medicinal plants: a re-emerging health aid. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2(2), p : 1-15.
3. Faustin M.(2013). Étude de l'effet des alcaloïdes sur la corrossion de l'acier C38 en milieu acide chlorhydrique 1M Guyane application à *Aspidosperma album* et *Geissospermum laeve* (Apocynacées). Thèse de doctorat : Chimie, Institut de l'Enseignement Supérieur de la Guyane, 78 p.
4. Bhadane B., Patil M., Maheshwari V., Patil R. (2018). Ethnopharmacology, phytochemistry, and biotechnological advances of family Apocynaceae. *Phytotherapy Research. Revue Phytotherapy Research*, (32), p : 1181 - 1210.
5. Straub S., Boutte J., Fishbein M., Livshultz T. (2020). Enabling evolutionary studies at multiple scales in Apocynaceae through Hyb-Seq. *Applications in Plant Sciences*, 8(11), p : 2_9.
6. Janot M., LeMen J., Garnier J., (1965). Chimiotaxinomie des pervenches. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 112(1), p : 117-124.
7. Khanavi M., Pourmoslemi S., Farahanikia B., Hadjiakhoondi A., Ostad N. (2010). Cytotoxicité de *Vinca minor*. *Biologie pharmaceutique*, 48(1), p : 96–100.
8. Sébastien L. (2011). Se d'alcaloïdes de *Vinca* et nouvelle approche de la synthèse de la (D)- méquitazine. Thèse de doctorat : Chimie Organique. Université de paris sud U.F.R. Scientifique d'orsay, 126 p.
9. Ozkan G., Kamiloglu S., Ozdal T., Boyacioğlu D. and Çapanoğlu E. (2016). Potential use of turkish medicinal plants in the treatment of various diseases. *Molecules*, 257 (21), p : 2-32
10. Dar R., Shahnawaz M. and Qazi P. (2017). General overview of medicinal plants. *Revue J Phytopharmacol*, (6), p : 349-351.
11. Khan H. and Javaid A. (2021). Identification of biologically important compounds in neem leaves through GC-MS analysis. *Jordan J Pharm Sci*, 14(3), p : 359- 366.
12. Uritu C., Mihai G., Stanciu G., Dodi T., Stratulat A., Luca B. and Tamba I. (2018). Medicinal plants of the family Lamiaceae in pain therapy. *A review Pain Res Manag*, 206(3), p : 14-45.

Références bibliographiques

13. Javaid N., Shah I., Khan A., Javaid S. and Waleed M. (2020). Herbicidal activity of *Ageratum conyzoides* against *parthenium*. *Pak J Weed Sci Res*, 26(2), p : 137- 146.
14. Banaras S., Javaid I. and Khan H. (2021). Bioassays guided fractionation of *Ageratum conyzoides* extract for the identification of natural antifungal compounds against *Macrophominaphaseolina*. *Int J AgricBiol*, 25(4), p : 761-767.
15. Chan E., Wong S. and Chan H. (2016). Apocynaceae species with antiproliferative and/or antiplasmodial properties. *Review of ten genera Journal of integrative medicine*, 14(4), p : 269-84.
16. Elavarasan S., Pechimuthu M., Arumugam R. and Thangavel S. (2021). Morphological and molecular identification of an endemic species from Tamil Nadu, India: *Wrightia Indica* Ngan (Apocynaceae). *The Journal of Indian Botanical Society*, 14(2), p : 49-59.
17. Morales J. (2006). Estudios en las Apocynaceae Neotropicales XXVIII: la familia Apocynaceae (Apocynoideae, Rauvolfioideae) de El Salvador, Centroamérica. *Darwiniana. Explore JSTOR*, (44), p : 453-489.
18. Anand U., Nandy S., Mundhra A., Das N., Pandey D. and Dey A. (2020). Review on antimicrobial botanicals, phytochemicals and natural resistance modifying agents from Apocynaceae family: Possible therapeutic approaches against multidrug resistance in pathogenic microorganisms Drug resistance updates. *Reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, (64), p : 25 -51.
19. Tamil Nadu. (2022). Systematic Studies on Ornamental Plants of the Apocynaceae Family in Kanyakumari District. *Journal of Pharmaceutical*, (6), p : 1-9.
20. Fishbein M., Livshultz T., Straub S., Simões A., Boutte J., McDonnell A. and Foote A. (2018). Evolution on the backbone: Apocynaceae phylogenomics and new perspectives on growth forms, flowers, and fruits. *American journal of botany*, 105 (3), p : 495-513.
21. Frédéric D. Jean-Louis G. (2015). Botanique: Les familles de plantes. France. Elsevier Masson. 292-388p.
22. El-fiki M., El-Taher A., EL-Gendy A. and Lila M. (2019). Morphological and anatomical studies on some taxa of family Apocynaceae. *Al-Azhar J Agric Res*, (44), p : 136-147.
23. Fallen M. (1986). Floral structure in the Apocynaceae: morphological, functional and evolutionary aspects. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte, und Pflanzengeographie*, (106), p : 245-286.
24. Endress M. and Bruyns P. (2000). A revised classification of the Apocynaceae. *Botanical Review*, (66), p : 1-56.

25. Islam sh. and Lucky R. (2019). A study on different plants of apocynaceae family and their medicinal uses. *Universal Journal of Pharmaceutical Research*, 4(1), p : 40-44.
26. Wong S., Lim Y. and Chan E. (2013). Botany, uses, phytochemistry and pharmacology of selected Apocynaceae species. *A review Pharmacognosy Communications*, (3), p : 2-11.
27. Bhadane B., Patil M., Maheshwari V. and Patil R. (2018). Ethnopharmacology, phytochemistry, and biotechnological advances of family Apocynaceae. *A review Phytotherapy Research*, (32), p : 1181 – 1210.
28. Paris R. et Moyses H. (1957). Les Pervenches indigènes et exotiques. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, 4(11), p : 481-489.
29. Barrales-Cureño H., Reyes C., García I., Valdez L., De Jesús A., Cortés-Ruiz J., Sánchez L., Calderón M., Magallón J. and Espinoza-Perez J. (2019). Alkaloids of pharmacological importance in *Catharanthus roseus* in alkaloids their importance in nature and human life. *Kurek J Ed Intech Open Ltd London UK*, (1), p : 1- 18.
30. Farnsworth R., Fong S., Blomster R. and Draus F J. (1962). Studies on *Vinca major* (Apocynaceae) II. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51(3), p : 217–224.
31. Rosa-Mera C., Ferrera-Cerrato R., Alarcón A., Sánchez-Colín M. and Muñoz-Muñiz O. (2011). Arbuscular mycorrhizal fungi and potassium bicarbonate enhance the foliar content of the vinblastine alkaloid in *Catharanthus roseus*. *Plant and Soil*, (349), p : 367-376.
32. Sottomayor M. and Barceló A. (2006). The *Vinca* Alkaloids From Biosynthesis and Accumulation in Plant Cells to Uptake Activity and Metabolism in Animal Cells. *Studies in natural products chemistry*, 33 (50), p : 813-857.
33. Tanaka N. (1999). Genetic Transformation of *Vinca minor* L In: Bajaj Y.P.S.(eds) *Transgenic Medicinal Plants Biotechnology in Agriculture and Forestry* Springer, Berlin. *Heidelberg*, (45), p : 355-365.
34. Farahanikia B., Akbarzadeh T., Jahangirzadeh A., Yassa N., Ardekani M., Mirnezami T., Hadjiakhoondi A. et Khanavi M. (2011). Étude phytochimique de *Vinca minor* cultivé en Iran. *Journal iranien de recherche pharmaceutique*, (10), p: 777 – 785.
35. Vanita R., Vipul K., Ramawatar M., Shreyans K. and Devilal B. (2023). Impact of Nitrogen Levels on the Growth and Medicinal Properties of Periwinkle (*Catharanthus roseus*) in an Inceptisol of Varanasi India. *International Journal of Plant & Soil Science*, 35(19), p : 954-962.

36. Koyuncu M., Ekşi G. and Özkan G. (2015). *Vincaispartensis*(Apocynaceae) a New Species from Turkey. *Annales BotaniciFennici*, 52(5-6), p : 340–344.
37. Ana M. (2020).les vincasdel jardin a la farmacia. Thèse de doctorat : Farmacia. Universidad de La Laguna, 12-29p
38. Ghédira K. et Goetz P. (2017). Petite pervenche *Vinca minor* L (Apocynaceae). *Phytothérapie*, 15(3), p : 169–172.
39. Leylaie S. et Zafari D. (2018). Antiproliferative and Antimicrobial Activities of Secondary Metabolites and Phylogenetic Study of Endophytic *Trichoderma* Species From *Vinca* Plants. *Frontiers in Microbiology*, (9), p : 6-16.
40. Narimène O. (2022). Etudes floristique et ethnobotanique du massif de Maadid (M'sila, Algérie) Systématique phylogénie et taxonomie. Thèse de doctorat : botanique. Université de M'Sila (Algérie), 147p.
41. Loh K. (2008). Know the Medicinal Herb: *Catharanthusroseus* (Vincarosea). Malaysian family physician .*the official journal of the Academy of Family Physicians of Malaysia*, 3 (2), p : 1- 123.
42. Javaid A., Ferdosi H., Khan A., Shoaib H., Saeed M. and Hassan M.(2021). Biochemical analysis of flowers of *vinca major*, a medicinal weed plant of hilly areas of pakistan. *Pak. J. Weed Sci. Res*, 27(4), p : 537-546.
43. Zhao J., Davis L. and Verpoorte R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 23 (4), p : 283-333.
44. Mithofer A. and Boland W. (2012). Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annual review of plant biology*, (63), p : 431-450.
45. Wu J. and Baldwin T. (2010). New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annual review of genetics*, (44), p : 1-24.
46. BouazizL. (2014).Identification de métabolites secondaires des plantes protecteurs des photorécepteurs à cônes pour le traitement de la rétinopathie pigmentaire. Thèse de doctorat : chimie. Université pierre et marie curie – Paris 6, 9-11p.
47. Kyselova Z. (2011). Toxicological aspects of the use of phenolic compounds in disease prevention.*Interdisciplinary toxicology*, (4), p : 173-183.
48. Mandal S., Chakraborty D. and Dey S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant signaling&behavior*, (5), p : 359-368.
49. Tafuri A., Ridaelli R. and Alfieri M. (2014). Determination of soluble phenolics content in Italian maize varieties and lines.*Tecnicamolitoria international*, 65 (15), p : 62.

50. Zouaoui S. (2019) .Contribution à l'étude phénologique et caractérisation phytochimique pour une évaluation des activités biologiques du *Chénopodium quinoa* Wild dans les régions semi arides (cas de l'Algérie occidentale). Thèse de doctorat : Biologie. Université DjillaliLiabès de Sidi Bel Abbès, 66-190p.
51. Krief S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. *Sciences du vivant museum national d'histoire naturelle – mnhn paris*, 18(5), p : 50-58.
52. Mondal A., Gandhi A., Fimognari C., Atanasov A. and Bishayee A. (2019). Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives. *European Journal of Pharmacology*, 153(3), p : 1-16.
53. Aniszewski T. (2007). Alkaloids - secrets of life: alkaloid chemistry, biological significance applications and ecological role. Amsterdam: Oxford Elsevier.1-6p.
54. Courdavault V., Papon N., Clastre M., Giglioli-Guivarc'h N., St-Pierre B. and Burlat V. (2014). A look inside an alkaloid multisite plants the *Catharanthus* logistics. *Current opinion in plant biology*, (19), p : 43-50.
55. Sukhdev S.,Jyoti G., Shamsheer S. and Kanwar p. (2014). Antiproliferative, antiproliferative and antiradical activities of methanolic extracts of *Vinca* .major *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, 3 (3), p : 54-63.
56. Sandra M., Grujić I., Ivana D., Radojević I., Sava M., Vasić L., Ljiljana R., Marina D. and Topuzovi C. (2014). Antimicrobial activity and some phytochemical analysis of tow extract *Vinca minor* L. *Kragujevac Journal of Science*, 36 (2), p : 145-154.
57. Prestinaci F., Pezzotti P. et Pantosti A. (2015). Résistance aux antimicrobiens : un phénomène mondial aux multiples facettes. *Santé de Pathog Glob*, 109(7), p : 18-309.
58. Ciorîță A., Zagrean-Tuza C., Moț A., Carpa R. and Pârnu M. (2021). The Phytochemical Analysis of *Vinca* L. Species Leaf Extracts Is Correlated with the Antioxidant, Antibacterial, and Antitumor. *Effects Molecules*, 26(10), p : 1-21.
59. Anubhav D., Deepanshi T., Kshama S., Prakash O. andRohit K. (2020). A discussion on *vinca* plant.*Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, 9(5), p : 27-31.
60. ELmansouri K. et MOUTAJ R. (2013). Recherche et évaluation de l'activité antifongique des extraits de plantes médicinales. *Doctoral dissertation Universite Cadi Ayyad*, (2), p : 1-4.

61. Samia N., Rukhama H., Samreen J. and Saiqa I. (2015). Evaluation of antimicrobial activity of extracts of in vivo and in vitro grown *Vincarosea L. A Review Catharanthus roseus against pathogens*, 28(3), p : 849-53.
62. Ujjwal N., Ankush G. and Nainika G. (2023). Antifungal herbs found in sirmour. *A Review Asian Pacific Journal of Nursing and Health Sciences*, 6(1), p : 1–3.
63. Domenico R., MILANO F. and SCIÒ E. (2012). Inhibitory Effect of Plant Extracts on Conidial Germination of the Phytopathogenic Fungus *Fusarium oxysporum*. *American J of Plant Sci*, (3), p : 1693-1698.
64. Singleton V. and Rossi J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer J Enol Viticult*, (16), p : 144-58.
65. Müller L., Gnoyke S., Popken M. and Böhm V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*, (43), p : 992–999.
66. 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), p : 816–822.
67. Blois M. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*, 4617 (181), p : 1119-1200.
68. Locatelli M., Gindro R., Travaglia F., Coisson J., Rinaldi M. and Arlorio M. (2009). Study of the DPPH-scavenging activity Development of free software for the correct interpretation of data. *Food Chemistry*, 114(5), p : 889-897.
69. Sylvestre K., Christelle C., N'GAMAN K., David B., Janat A., MAMYRBEKOVA B. et Yves-Alain B. (2018). Activité antioxydante des extraits bruts hydroéthanoliques et hydroacétoniques des organes de quatre plantes de Côte d'Ivoire médicinales. *Nature et technologie*, 6(3), p : 01-07.
70. Flieger J. and Flieger M. (2020). The [DPPH•/DPPH-H]-HPLC-DAD Method on Tracking the Antioxidant Activity of Pure Antioxidants and Goutweed (*Aegopodium podagraria L.*) hydroalcoholic extracts. *Molecules*, 25(24), p : 6005.
71. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. and Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med*, (26), p : 1231–1237.
72. Siddeeg A., AlKehayez N., Abu-Hiamed H., Al-Sanea E. and Al-Farga A. (2020). Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources an overview. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(2), p : 592-607.

Références bibliographiques

73. Cano A., Maestre A., Hernández-Ruiz J. and Arnao M. (2023). ABTS/TAC Methodology Main Milestones and Recent Applications. *Processes*, 11(185), p : 1-10.
74. Abdel-Aty A., Salama W., Fahmy A. and Mohamed S. (2019). Impact of germination on antioxidant capacity of garden cress new calculation for determination of total antioxidant activity. *Scientia Horticulturae*, (246), p : 155–160.
75. Szydłowska-Czerniaka A., Dianoczki C., Recseg K., Karlovits G. and Szlyk E.(2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*, (76), p : 899-905.
76. Yefrida H., Alif A., Efdi M., Aziz H., (2018). Modification of Phenanthroline Method to determine Antioxidant Content in Tropical Fruits Methanolic Extract. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 22(4), p : 28-35.
77. Pesarico A., Sartori G., Santos C., Neto J., Bortolotto V., Santos R., Nogueira C. and Prigol M. (2013). 2,2'-Dithienyl diselenide pro-oxidant activity accounts for antibacterial and antifungal activities. *Microbiological research*, 168(9), p : 80- 563.
78. Alonso C., Domínguez C., Heras J., Mata E., Pascual V., Torres C. and Zarazaga M. (2017). Antibioqramj A tool for analysing images from disk diffusion tests. *Computer methods and programs in biomedicine*, (143), p : 159-169.
79. Choi Y., Noh D., Cho S., Suh H., Kim K. and Kim J. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT - Food Science and Technology*, 39(7), p : 756-761.
80. Norma P., Silva B., Stephanie A., Khalid M., Julie M. and Charles P.(2023). Antifungal activity and mechanism of action of natural product derivates as potential environmental disinfectants. *J IndMicrobiolBiotechnol*, 50(1), p : 1-13.
81. Vinale F., Marra R., Scala F., Ghisalberti E., Lorito M. and Sivasithamparam k. (2006).Major secondary metabolites produced by two commercial Trichoderma strains active against different phytopathogens. *The Society for Applied Microbiology*,(438), p : 1-7.
82. Orak H., Yagar H. and Isbilir S. (2012). Comparison of antioxidant activities of juice, peel, and seed of pomegranate (*Punicagranatum L.*) and inter-relationships with total phenolic, tannin, anthocyanin, and flavonoid contents. *Food Science and Biotechnology*, 21(2), p : 373-387.
83. Ingabire H., KoumagloC., De-Souza C., Dotse K., Anani J., Kabera M. and Mukazayire E. (2007). Antimicrobial activity and preliminary phytochemical screening of turraeaheterophylla and terminaliaglaucescens used in togoethnomedecine to treat common infections. *Plantamedica*, 73(09), p : 215.
84. Daoudi A., Sabiri M., Bammou M., Zair T., Ibijibijen J. et Nassiri L. (2015). valorisation des extraits de trois espèces du genre *Urtica*: *Urticaurens L.*,

Urticamembranacea Poiret et Urticapilulifera L. *Journal of Applied Biosciences*, (87), p: 8094– 8104.

85. Lobiuc A., Pavăl N., Mangalagiu I., Gheorghita R., Teliban G., Amăriucăi-Mantu D. and Stoleru V. (2023). Future Antimicrobials: Natural and Functionalized Phenolics. *Molecules*, (28), p : 1-16.

86. Ameni L. (2016). Etude chimiotaxonomique et activité biologique des métabolites secondaires des plantes du genre *Eryngium*. Thèse de doctorat : Biologie. L'Université de Lille 2 École doctoral biologie santé, 97-101p.

87. Thomas K., Sorho S., Amian B. et Yaya S. (2021). Détermination des teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins de jeunes feuilles non encore ouvertes de *Piliostigmathonningii* (Caesalpiniaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 15(1), p : 97-105.

88. Dior S., Abou Moussa S., Mohamed D., Nalla M., Bédié M., Mouhamadou F., Ibrahima N. et El hadj A. (2022). Composition chimique et activité antifongique d'extraits d'*Euphorbia hirta* L. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, (51), p : 87-92.

Résumé

Une étude biologique a été menée sur une espèce végétale Algérienne appartenant au genre *Vinca* de la famille des Apocynacées. Nos investigations phytochimiques et biologiques ont porté sur les trois extraits CHCl_3 , AcOEt et *n*-BuOH de cette plante. L'évaluation quantitative des polyphénols et des flavonoïdes a révélé que les trois extraits examinés sont riches en ces composés principalement le *n*-BuOH a une teneur élevée de $702,24 \pm 2,90$ (ug EAG/mg) et $302,77 \pm 48,02$ (ug EQ/mg) respectivement.

Trois méthodes : DPPH, ABTS et la phénanthroline ont été réalisées pour évaluer l'activité antioxydante sur les trois extraits étudiés. Les résultats ont montré que l'extrait acétate d'éthyle était le plus actif par rapport à l'extrait butanolique et chloroformique avec un IC_{50} plus proche aux standards utilisés (BHA, BHT) de $3,42 \pm 0,18$ ($\mu\text{g/ml}$). Suivi par l'extrait butanolique avec un degré moindre.

L'activité antibactérienne des trois extraits a également été évaluée selon la méthode de diffusion en milieu gélosé sur deux souches ; *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Les résultats ont montré que les deux extraits ; acétate d'éthyle et butanolique possèdent une sensibilité élevée contre *Staphylococcus aureus* avec une grande zone d'inhibition de 18 mm à 5 mg/ml pour l'extrait acétate d'éthyle.

A la fin, l'activité antifongique des trois extraits a été testée contre deux champignons pathogènes ; *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici* et *Alternaria sp.* Les résultats ont montré que les trois extraits, en particulier l'acétate d'éthyle, ont un effet inhibiteur efficace contre *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici* avec un taux d'inhibition le plus élevé de 43,79% a été enregistré avec l'extrait acétate d'éthyle à la concentration 10 mg/ml.

Les mots clés : Apocynacées, *Vinca*, dosage des polyphénols, dosage des flavonoïdes, activité antioxydante, activité antifongique et antibactérienne.

Abstracts

A biological study was carried out on an Algerian plant species belonging to the *Vinca* genus of the Apocynaceae family. Our phytochemical and biological investigations focused on the three extracts CHCl₃, AcOEt and *n*-BuOH of this plant. Quantitative evaluation of polyphenols and flavonoids showed that the three extracts are rich in these compounds *n*-BuOH in particular has a large content of 702.24±2.90 (ug EAG/mg) and 302.77±48.02 (ug EQ/mg) respectively.

Three methods: DPPH, ABTS and phenanthroline were carried out to evaluate the antioxidant activity on the three extracts studied. The results showed that the ethyl acetate extract was the most active compared to the butanolic and chloroform extract with an IC₅₀ closer to the standards used (BHA, BHT) of 3.42±0.18 (µg/ml). followed by the butanolic extract with a lesser degree.

The antibacterial activity of the three extracts was also evaluated using the diffusion method on two strains; *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The results showed that both extracts; Ethyl acetate and butanolic have high sensitivity against *Staphylococcus aureus* with a large inhibition zone of 18 mm at 5 mg/ml for ethyl acetate extract.

At the end, the antifungal activity of the three extracts was tested against two bathogenic fungi; *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici* and *Alternaria sp.* The results showed that the three extracts, especially ethyl acetate, have an effective inhibitory effect against *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici* with the highest inhibition rate of 43.79% was recorded with the ethyl acetate extract at a concentration of 10 mg/ml.

Key words: Apocynaceae, *Vinca*, total phenolic content, total flavonoid content antioxidant activity, antifungal and antibacterial activity.

ملخص

أجريت دراسة بيولوجية على نوع نباتي جزائري ينتمي إلى جنس الفينكا من عائلة الابوسيناسيات.

تركزت دراستنا الفيتوكيميائية والبيولوجية في هذا العمل على ثلاثة مستخلصات هي : الكلوروفورم، الأسيئات الإيثيلي و البوتانول ، حيث أظهر التقييم الكمي للبوليفينولات و الفلافونويدات غنى هذه مستخلصات بهذه المركبات و بشكل رئيسي البوتانول الذي احتوى على نسبة عالية تقدر ب 2.90 ± 702.24 (ug EAG/mg) و 48.02 ± 302.77 (ug EQ/mg) على التوالي .

لتقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات الثلاث المدروسة تم اختيار ثلاث طرق: (DPPH, ABTS, Phenanthroline). أظهرت النتائج أن مستخلص الأسيئات الإيثيلي كان الأكثر فعالية حيث أن متوسط التركيز المثبط الجد متقارب للمعايير المستخدمة (BHA, BHT) والمستخلصات قدر ب 0.18 ± 3.42 (ميكروجرام/مل) ، يليه مستخلص البوتانول بدرجة أقل .

تم أيضا تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلصات الثلاث باستخدام طريقة الانتشار على سلاتين ، العنقوديات الذهبية و الاشريكية القولونية ، أظهرت النتائج أن كلا المستخلصين الأسيئات الإيثيلي و البوتانولي لديهما حساسية عالية ضد العنقودية الذهبية مع تأثير مثبط جد فعال بلغ 18 ملم عند تركيز 5 ملغم/مل لمستخلص الأسيئات الإيثيلي .

في النهاية تم اختيار النشاط المضاد للفطريات للمستخلصات الثلاث ضد فطرين ممرضين (*Alternaria sp* و *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici*) ، أظهرت النتائج أن الثلاث مستخلصات خاصة الأسيئات الإيثيلي لديها تأثير مثبط فعال وسجلت أعلى نسبة تثبيط لهذا المستخلص قدرت ب 43.79% و ذلك عند تركيز 10 ملغم/مل.

الكلمات المفتاحية: أبوسيناسيات ، فينكا ، محتوى الفينول الكلي ، محتوى الفلافونويد الكلي ، النشاط المضاد للأكسدة ، النشاط المضاد للفطريات و البكتيريا.

Année universitaire : 2023-2024

Présenté par : Sebti nahla
Telaidji loudjeina isra
Baziz doria

.....

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master 2en Microbiologie. Spécialité : MYCOLOGIE ET BIOTECHNOLOGIE FONGIQUE

Résumé

Une étude biologique a été menée sur une espèce végétale Algérienne appartenant au genre *Vinca* de la famille des Apocynacées. Nos investigations phytochimiques et biologiques ont porté sur les trois extraits CHCl₃, AcOEt et n-BuOH de cette plante. L'évaluation quantitative des polyphénols et des flavonoïdes a révélé que les trois extraits examinés sont riches en ces composés principalement le n-BuOH a une teneur élevée de 702,24±2,90 (ug EAG/mg) et 302,77±48,02 (ug EQ/mg) respectivement.

Trois méthodes : DPPH, ABTS et la phénanthroline ont été réalisées pour évaluer l'activité antioxydante sur les trois extraits étudiés. Les résultats ont montré que l'extrait acétate d'éthyle était le plus actif par rapport à l'extrait butanolique et chloroformique avec un IC₅₀ plus proche aux standards utilisés (BHA, BHT) de 3,42±0,18 (µg/ml). Il possédait une activité antioxydante significative par rapport aux standards suivi par l'extrait butanolique avec un degré moindre.

L'activité antibactérienne des trois extraits a également été évaluée selon la méthode de diffusion en milieu gélosé sur deux souches ; *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Les résultats ont montré que les deux extraits ; acétate d'éthyle et butanolique possèdent une sensibilité élevée contre *Staphylococcus aureus* avec une grande zone d'inhibition de 18 mm à 5 mg/ml pour l'extrait acétate d'éthyle.

A la fin, l'activité antifongique des trois extraits a été testée contre deux champignons pathogènes ; *Fusarium oxysporum* f.sp.lycopersici et *Alternaria* sp. Les résultats ont montré que les trois extraits, en particulier l'acétate d'éthyle, ont un effet inhibiteur efficace contre *Fusarium oxysporum* f.sp.lycopersici avec un taux d'inhibition le plus élevé de 43,79% a été enregistré avec l'extrait acétate d'éthyle à la concentration 10 mg/ml.

Mots-clés : Apocynacées, *Vinca*, dosage des polyphénols, dosage des flavonoïdes, activité antioxydante, activité antifongique et antibactérienne.

Laboratoires de recherche : Unité de recherche VARENBIOMOL (U Constantine 1 Frères Mentouri).
Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBT)

Présidente du jury : Pr. Bicha Sabrina (PROF -U Constantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant : Dr. Aliouche Lamia (MC(A) - UFM Constantine 1)

Examinatrice : Dr. Almi Hiba (MC(B) -UFM Constantine 1).

