

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

(Espace_réservé1)(Espace_réservé2)

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة مولاي الطاهر، سعيدة

Université MOULAY Tahar, Saida

كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie



N° d'Ordre

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

En Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Evaluation phytochimique et microbiologique de la *Buxus dioïca* de la région de Bougtob Wilaya d'Elbayadh(Algérie).

Présenté par :

- Mme : Zehouf Lila
- Mme : Zaoui Khawla

Soutenu le : 09/06/2022

Devant le jury composé de :

Présidente

Dr. HENDI Amina

MAA Université Saida

Examineur

Dr. AMMAM Abdelkader

MCA Université Saida

Rapporteur

Dr. CHALANE Fatiha

MCA Université Saida

Année universitaire 2021/2022

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

لاؤلا

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة مولاي الطاهر، سعيدة

Université MOULAY Tahar, Saida

كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

N° d'Ordre



Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

En Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Evaluation phytochimique et microbiologique de la *Buxus dioica* de la région de Bougtob Wilaya d'Elbayadh(Algérie).

Présenté par :

- Mme : Zehouf Lila
- Mme : Zaoui Khawla

Soutenu le : 09/06/2022

Devant le jury composé de :

Présidente	Dr. HENDI Amina	MAA Université Saida
Examineur	Dr. AMMAM Abdelkader	MCA Université Saida
Rapporteur	Dr. CHALANE Fatiha	MCA Université Saida

Année universitaire 2021/2022

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

"رب أوزعني أن أشكر نعمتك

التي أنعمت عليّ وعلى والديّ

وأن أعمل صالحاً ترضاه

وأصلح لي في ذريّتي

إنّي تبنت إليك و إنني من المسلمين"

صدق الله العظيم



Je dédie ce mémoire

A mes chers parents :Ma mère Keltouma et mon père Laid

Amon grand-mère Meriem

A mon fiançai Zahir Bejaia

A mon binôme Khawla

**A ma cousine Mokhtaria ;Marwa ; Khawla et Ahlem et tous ma
famille**

A tous mes amies

Leila



Je dédie ce modeste travail

A mon très chère père KHeladi merci pour tout ce qui tu fais pour moi.

A ma mère Naima et grand-mère Fariha pour leur amour et leur compréhension et leur soutien.

A mes très chère frères : Imad –Souhayb.

A mes très chère sœurs : Firdaws–Hanane

Les enfants des ma sœur et son marie

A mon fiançai Aymen

A mes oncle ; tants ; et tout les membres de ma famille.

A mon binôme et amie Leila.

Tout mes amies ; a tout personnes qui me connait.

Khawla

Remerciement

Avant tout, nous tenons à remercier Allah de nous avoir, aidé et éclairé
notre chemin.

Nous exprimons nos profonds remerciements et nos vives
reconnaisances à Dr. **CHALANE Fatiha** pour les directives précieuses
qu'elle nous a consacré afin d'améliorer ce modeste travail.

Nous tenons à remercier chaleureusement les membres de jury

Dr. AMMAM et Dr. HENDI

D'avoir accepté d'évaluer notre travail.

Nos sincères gratitude à tous les enseignants qui nous ont accompagnés
durant ce cursus Universitaire et à tous ceux qui ont contribué de près ou de
loin à élaborer ce travail.

Merci



Liste des abréviations

MO : Microorganisme.

DPPH : Radical1, 1-diphényle-2-picrylhydrazyl.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

EOR : Espèce oxygénées réactive.

mm : millimètre.

C° : Degré Celsius.

nm:Nanomètre.

μl:Micromètre.

ml : millimètre.

mg : Milligramme.

IC50: Concentrations qui correspondent à 50% d'inhibition.

PI : Pourcentage inhibitrice.

BN : Bouillon nutritif.

GN : Gélose nutritif.

MH : Mueller Hinton.

ATCC : American type culture collection.

UFC : Unité formant colonie.

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
01	Structure de base des principaux flavonoïdes.	10
02	Classification botanique du genre Buxus.	14
03	Matériel et réactifs chimiques utilisées.	22
04	Différentes souches utilisées pour l'évaluation des activités antimicrobiennes.	29
05	Les concentrations utilisées pour l'évaluation des activités antimicrobiennes.	30
06	Rendements des extraits bruts des feuilles de Buxus dioïca.	35
07	Résultats de screening phytochimique.	33-37
08	Diamètres des zones d'inhibitions obtenus par l'extrait méthanolique de Buxus dioïca.	38
09	Résultats de CCM de l'extrait des feuilles de Buxus dioïca	40

Liste des figures

Numéro	Titre	Pages
1	Structure chimique de deux molécules de tanins	12
2	<i>Buxus dioïca</i>	14
3	Réaction du DPPH avec un antioxydant	16
4	Réaction du superoxydadismutose SOD	16
5	Réaction de la glutation peroxydase GPx	17
6	Position géographique de la zone d'étude	21
7	Les feuilles du <i>Buxus dioïca</i>	21
8	Protocole de préparation d'extrait éthanoïque, méthanoïque et aqueux	23
9	Quelques étapes d'extraction	24
10	Schéma des tests phytochimique pour la détection des flavonoïdes	25
11	Schéma des tests phytochimique pour la détection des tanins	25
12	Schéma des tests phytochimique pour la détection des alcaloïdes	26
13	Schéma des tests phytochimique pour la détection d'amidon	26
14	Schéma des tests phytochimique pour la détection les glycosides cardiaques.	27
15	Schéma des tests phytochimique pour la détection les composés réducteurs	28

16	Schéma des tests phytochimique pour la détection les anthocyanes	28
17	Les boites de pétri préparé	30
18	Muller Hinton	30
19	Ensemencement des boites de pétri	31
20	Remplissez les puits	31
21	Piégeages du radical libre DPPH	32
22	Rendement d'extraction	35
23	Photos montrant des zones d'inhibitions de la croissance bactérienne	39
24	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH de l'extrait méthanoïque	40
25	Résultats de CCM de Buxus dioica	41

Résumé

La médecine traditionnelle a toujours occupé une place importante dans les traditions de médication en Algérie. Ce mémoire s'inscrit dans le cadre d'une contribution à l'étude des activités biologiques de *Buxus dioica*. la préparation de différents extraits a été réalisée suivie par un screening phytochimique. Après, une évaluation de l'activité antioxydante (capacité totale et piégeage du DPPH) et de l'activité antimicrobienne (diffusion sur milieu solide).

Trois extraits ont été préparés, il s'agit de l'extrait méthanolique, éthanolique (macéré) et l'extrait aqueux (infusé). Les résultats obtenus ont enregistré que l'extrait aqueux avait un rendement le plus élevé 9.3 % parmi les extraits étudiés. Le screening phytochimique a montré la présence de différents métabolites secondaires (tanins, flavonoïdes, saponides et amidon). L'évaluation d'activité antioxydante a révélé que cette plante a des très bonnes propriétés antioxydantes, avec un pourcentage de 92% et avec une IC50 de l'ordre de 2.01mg/ml. Les tests de sensibilité des microorganismes ont révélé que *Candida albicans* ATCC 10231 A14 était la plus sensible à l'extrait méthanolique (22 mm) par la méthode de diffusion en milieu solide.

Mots clé : *Buxus dioica*, phytochimie, antioxydante, antibactérienne, antifongique,

Abstract

Traditional medicine has always occupied an important place in the traditions of medicine in Algeria. This thesis is part of a contribution to the study of the biological activities of *Buxus dioica*. The preparation of different extracts was carried out followed by a phytochemical screening. Afterwards, an evaluation of the antioxidant activity (total capacity and trapping of DPPH) and of the antimicrobial activity (diffusion on a solid medium).

Three extracts were prepared; they are the methanolic, ethanolic (macerated) extract and the aqueous extract (infused). The results obtained recorded that the aqueous extract had the highest yield of 9.3% among the extracts studied. Phytochemical screening showed the presence of various secondary metabolites (tannins, flavonoids, saponides and starch). The evaluation of antioxidant activity revealed that this plant has very good antioxidant properties, with a percentage of 92% and with an IC₅₀ of around 2.01mg/ml. Microorganism susceptibility testing revealed that *Candida albicans* ATCC 10231 A14 was most sensitive to the methanolic extract (22 mm) by the solid medium diffusion method.

Keywords: *Buxus dioica*, phytochemistry, antioxidant, antibacterial, antifungal.

ملخص

لطالما احتل الطب التقليدي مكانة مهمة في تقاليد الطب في الجزائر. هذه الأطروحة جزء من مساهمة في دراسة الأنشطة البيولوجية لـ. تم تحضير المستخلصات المختلفة متبوعًا بفحص كيميائي نباتي. بعد ذلك، تقييم النشاط المضاد للأكسدة (السعة الكلية ومحاصرة DPPH) والنشاط المضاد للميكروبات (الانتشار على وسط صلب). تم تحضير ثلاثة خلاصات هي المستخلص الميثانولي والإيثانولي (المتبلد) والمستخلص المائي (المنقوع). أظهرت النتائج المتحصل عليها أن المستخلص المائي كان له أعلى إنتاجية بنسبة 9.3% بين المستخلصات المدروسة. أظهر الفحص الكيميائي النباتي وجود مستقبلات ثانوية مختلفة (العفص والفلافونويد والسابونيدات والنشا). أظهر تقييم النشاط المضاد للأكسدة أن هذا النبات له خصائص مضادة للأكسدة جيدة جدًا، بنسبة 92% وبنسبة تركيز 50IC تقريبًا 2.01 mg/ml. أظهر اختبار الحساسية للكائنات الحية الدقيقة أن المبيضات البيضاء ATCC 10231A 14A كانت الأكثر حساسية للمستخلص الميثانولي (22 مم) بطريقة انتشار الوسط الصلب.

الكلمات الرئيسية: *Buxus dioica*، الكيمياء النباتية، مضادات الأكسدة، مضاد للجراثيم

Table des matières

	Page
Partie 1 : Introduction générale	
Partie 2 : Synthèse bibliographique	
Chapitre 1 : Généralité sur les plantes médicinales et <i>Buxus dioïca</i>	
1-Définition	6
2-La phytothérapie	6
2-1 Avantage et efficacité de la phytothérapie	7
2-2 Inconvénients et limites d'utilisation de la phytothérapie	8
3-les principes actifs	8
3-1 : Définition des principes actifs	8
3-2 : Les principaux éléments actifs des plantes	9
3-2-a : Alcaloïdes	9
3-2-b : Flavonoïdes	9
3-2-c : Saponosides	11
3-2-d : Les tanins	11
3-2-e : Glucosides cardiaques	12
3-2-f : Les anthocyanes	12
4-Présentation de la plante étudiée	13

4-1 : Classification botanique du genre Buxus	14
5-Procédés d'extraction	14
Chapitre 2 : Actinite biologique du <i>Buxus dioïca</i>	
1 : Activité antimicrobienne	15
2 : Capacité antioxydant	15
2-1 : Les antioxydants	16
2-2 : Mécanisme d'action des antioxydants	16
3-Contrôle et analyse par la chromatographie sur couche mince CCM	17
Chapitre 3 : Généralité sur les souches testées	
1-Bactéries à Gram positif	18
1-1 : Staphylococcus aureus	18
1-2 : Listeria monocytogenes	18
2-Bactéries à Gram négatif	18
2-1 : Escherichia coli	18
2-2 : Klebsella pneumonie	18
3-Levures	19
3-1 : Candida albicans	19

Partie 3 : Matériels et méthodes

1-Matériel :	21
1-1: Zone d'étude	21
1-2 : Matériel végétale	21
1-3 : Matériels et réactifs chimiques utilisés	22
2-Extraction	22
2-1 : Préparations de l'extrait aqueux sous reflux	23
2-2 : préparation de l'extrait méthanoïque et éthanoïque	23
3- Calcul de rendement	24
4-Screening phytochimique	24
4-1 : Flavonoïdes	24
4-2 : Tanins	25
4-3 : Saponosides	25
4-4 : Les Alcaloïdes	26
4-5 : Amidon	27
4-6 : Glucosides cardiaques	27
4-7 : Composés réducteurs	28
4-8 : Anthocyanes	28
5- Evaluation de l'activité antibactérienne	29

5-1 : Les souches utilisées	29
5-2 : Les milieux de culture utilisés	29
5-3 : Méthode de diffusion sur milieu gélosé	29
5-3-1 : Préparation de l'inoculum bactérien	29
5-3-2 : Préparation de les boites de pétri	30
5-3-3 : Préparation de la gamme de concentration d'extrait	30
5-3-4 : Ensemencement des boites de pétri	31
5-3-5 : La lecture	31
6- Evaluation de l'activité antioxydante	32
7- Fractionnement de l'extrait par CCM	32
Partie 4 : Résultats et discussion	
1-Rendement de l'extrait	35
2-Résultats de screening phytochimique	36
3-Résultats de l'activité antimicrobienne	37
4-Résultats de l'activité antioxydante	40
5-Résultats de la chromatographie sur couche mince CCM	40
Partie 5 : Conclusion	
Partie 6 : Références	

INTRODUCTION

Introduction générale :

Les plantes médicinales ont été utilisées comme une source importante de médicaments pour des milliers d'années de l'histoire humaine, et même aujourd'hui, elles constituent la base des pratiques systématiques de la médecine traditionnelle pendant plusieurs siècles dans le monde entier (Pan et al., 2009). L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité (A G.-F. , 2006). En effet, il existe environ 500.000 espèces de plantes sur terre, dont 80.000 possèdent des propriétés médicinales (Benkhniq O., 2011).

En Afrique, où les médicaments à base de plantes sont toujours utilisés par de nombreuses populations pour des soins sanitaires, le pouvoir thérapeutique des plantes était connu de façon empirique.

La flore algérienne, avec ses différentes espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, reste très peu explorée tant sur le plan phytochimique que sur le plan pharmacologique (B M. , 2009). L'abondance en principes actifs confère à la plante des propriétés pharmacologiques remarquables, ce qui pourrait justifier ses multiples indications thérapeutiques et pour lesquelles elle est utilisée en tradithérapie.

Les vertus médicinales et thérapeutiques des plantes sont dues à leur richesse en métabolites secondaires dits principes actifs qui agissent directement sur l'organisme (. Al-Gabbiesh A., 2015). Les recherches récentes sur les métabolites secondaires sont très poussées, particulièrement dans les domaines de la phytothérapie et de l'hygiène alimentaire, en raison de leurs diverses propriétés biologiques : antioxydant, antimicrobiennes, hypoglycémiantes, anti-inflammatoires...etc. En outre, ces métabolites peuvent avoir des effets physiologiques favorables dans la prévention des cancers et de nombreuses maladies chroniques, tels que les maladies cardiovasculaires.

La famille des Buxaceae est représentée par 6 genres répartis en 123 espèces différentes et viennent de la famille du buis. On trouve ces arbustes ; arbres ou plantes herbacées dans les régions tempérées à tropicales d'Amérique du Nord ; d'Europe ; d'Afrique du Nord (Algerie) et D'Asie.

Les Buxaceae peuvent mesurer jusqu'à 15 mètres de hauteur. Ces plantes sont utilisées à des fins ornementales ou en raison du buis qu'elles produisent. Leurs fleurs sont petites, unisexuées et ne comportant aucun pétale. La majorité des espèces portent des fleurs mâles et femelles sur des plantes différents. Les feuilles sont persistantes sempervirentes et disposées de manière alternées le long des tiges. Quant aux fruits, ce sont des capsules ou des drupes charnues.

L'objectif de notre travail vise à faire une analyse qualitative (un screening phytochimique) et quantitative des métabolites secondaires existants dans la partie aérienne de cette plante afin d'évaluer les propriétés biologiques des extraits de la plante étudiée.

Notre étude englobe cinq parties : La première partie Introduction

La deuxième partie est d'ordre bibliographique divisée en trois chapitres ; le premier est consacré à des données générales sur la plante *Buxus dioica* et leurs métabolites secondaires ; le deuxième chapitre est réservé aux différentes activités biologiques de *Buxus dioica* ; et la troisième partie est consacré à des données générales sur les souches utilisés dans les activités antibactérienne et antifongiques.

La troisième partie illustre le matériel et les méthodes utilisés dans les différentes étapes de notre travail expérimental. Nous avons entamé cette partie par une préparation de différents extraits du *Buxus dioica*. Des tests phytochimiques préliminaires sont ensuite effectués sur les parties feuille de cette plante et détermination quantitative des composés actifs dans les extraits de la plante étudiée. En application, les extraits du *Buxus dioica* sont testés pour une évaluation des activités biologiques.

La quatrième partie est consacrée à la présentation, l'interprétation et la discussion des résultats obtenus.

Et en fin une conclusion.

**SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE
DES PLANTES
MEDICINALES**

Chapitre1 : Généralité sur les plantes médicinales et *Buxus dioïca* :

1-Définition :

Les plantes médicinales sont utilisées pour leurs propriétés particulières bénéfiques pour la santé humaine. En effet, elles sont utilisées de différentes manières, décoction, macération et infusion. Une ou plusieurs de leurs parties peuvent être utilisées, racine, feuille, fleur (DutertreJ.M., 2011).

D'après Hordé (2014), les plantes médicinales sont utilisées par l'homme depuis près de 7 000 ans et que certains animaux les consomment aussi dans un but thérapeutique. Environ 35 000 espèces de plantes sont employées à l'échelle mondiale à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne, les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important (ELQAJ M., 2007).

Les espèces végétales d'intérêt médicinales sont impliquées dans différents secteurs à l'état brut ou sous formes d'huiles, extraits, solutions aqueuses ou organiques. Leurs préparations à base végétales contiennent un ou plusieurs principes actifs utilisables à des fins thérapeutiques.

2-La phytothérapie :

D'un point de vue étymologique, le terme "phyto" de phytothérapie provient du grec ancien avec le terme plus précis de "phyton" et signifie "végétal". La phytothérapie est donc la "thérapie par le végétal ou par le monde végétal", aujourd'hui nous considérons davantage la phytothérapie comme la "thérapie par les plantes" ou plus exactement la méthode thérapeutique utilisant des plantes médicinales dans le traitement de maladies.

Selon l'OMS, la phytothérapie est le traitement médical le plus utilisé au monde.

2.1-Avantages et efficacité de la phytothérapie :

-De nombreuses études scientifiques relatent les effets bénéfiques des plantes, parfois même supérieurs aux médicaments, et ce dans les plus grandes revues médicales.

Quatre organismes aujourd'hui s'attachent à démontrer leur efficacité :

L'EMA, l'ESCOP, l'OMS et la Commission E en Allemagne

Ces 4 instances répertorient les vertus médicinales des plantes, étudient les usages traditionnels et se prononcent sur leur utilité dans le traitement de certains symptômes.

-La phytothérapie couvre un très large champ de maladies et l'industrie pharmaceutique utilise de nombreux principes actifs végétaux pour traiter. Toutes sortes de maladies par exemple le taxol (molécule utilisée pour le traitement du cancer) (P, 2001).

-Les médicaments chimiques provoquent souvent des effets néfastes (responsables de 10 à 20% des hospitalisations), contrairement aux phyto-médicaments qui ne présentent quasi pas d'effets secondaires si utilisés avec précaution ;

-Les plantes médicinales sont beaucoup moins chères que les médicaments de synthèse ;

-La phytothérapie peut être utilisée comme un moyen de prévention ;

-La phytothérapie est accessible pour tout le monde et ne nécessite pas d'obtenir une ordonnance.

-Le corps humain est mieux adapté à un traitement à base de plantes qu'à une thérapie essentiellement chimique ;

-La production des plantes est très peu polluante contrairement aux médicaments chimiques. (Grumwald J. & Janck C., 2006)

2.2- Inconvénients et limites d'utilisations de la phytothérapie :

-Il est particulièrement difficile d'apporter des preuves d'efficacité des plantes ;

-Il y a aussi beaucoup d'herbes qui ne sont pas recommandés pour les enfants et sont dangereux pour eux, ainsi que pour les femmes enceintes (Hilinaruthnadia., 16/02/2018])

-Certaines plantes renferment des toxines si puissantes que l'ingestion d'une quantité infime risque de se révéler mortelle ;

-La toxicité peut être aussi due à l'utilisation d'une dose excessive ou une erreur d'identification de la plante, vu que pour deux plantes qui se ressemblent sur le plan botanique l'une peut être toxique. Une mal-interprétation des symptômes peut être très dangereuse du fait que la phytothérapie repose le plus souvent sur l'automédication. Les préparations domestiques ne peuvent pas être conservées pour une longue durée donc une préparation mal conservée peut donner des intoxications au lieu de nous guérir.

-Les plantes contiennent des fois des substances allergisantes.

Heureusement aujourd'hui, les phytothérapeutes connaissent le degré d'efficacité des plantes médicinales et leurs limites dans le traitement de certaines pathologies. Ils ne se risqueraient jamais à juguler une maladie infectieuse aiguë sans l'aide d'antibiotiques ni à soigner une affection séreuse, comme le diabète, uniquement avec des plantes. Toutefois, ils peuvent traiter et soulager efficacement leurs patients atteints de maladies bénignes avec un traitement à base de plantes comme par exemple les affections gastro-intestinales, les problèmes dermatologiques ou d'affections légères du système nerveux (stress et insomnie). (V., 2003)

3-Les principes actifs :

3.1- Définition des principes actifs :

Les principes actifs ce sont des molécules contenues dans une drogue végétale ou dans une Préparation à base de drogue végétale, utilisé pour la fabrication des médicaments ; ils présentent une activité thérapeutique curative ou préventive pour l'Homme ou l'animale.

Ces composés sont souvent en quantité extrêmement faible dans la plante, mais se sont eux qui en sont l'élément essentiel. Il est donc parfois important de réaliser une

extraction qui va isoler la seule fraction intéressante de la plante. (: <http://www.futura-sciences.com> , 2017)

3.2-Les principaux éléments actifs des plantes :

Les effets curatifs de certaines plantes sont bien connus. La camomille allemande, par exemple, est utilisée depuis des milliers d'années contre les troubles digestifs. Or, ce n'est que récemment que les éléments actifs à l'origine des actions thérapeutiques des plantes ont été isolés et étudiés.

3.2.a- Alcaloïdes :

Les alcaloïdes forment l'un des groupes de principes actifs les plus importants de la matière médicale. Ce sont des bases azotées généralement hétérocycliques, douées d'une activité pharmacodynamique marquée. Pour la plupart se sont des poisons végétaux dotés d'une action spécifique. Certains ont une action médicale sur l'appareil digestif tel que l'aescine d'*Aesculus hippocastanum* qui possède une action anti hémorroïdaire. (G., 1965).

3.2. b- Flavonoïdes :

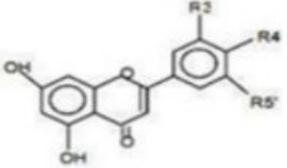
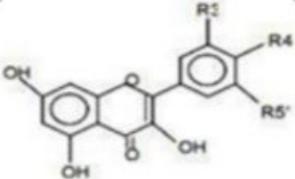
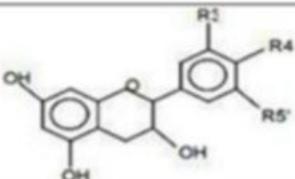
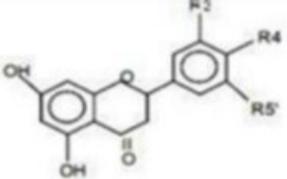
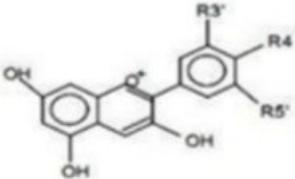
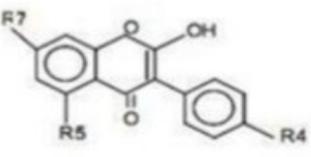
Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes et occupent une place prépondérante dans le groupe des phénols des plantes. 2 % environ du carbone organique est photo synthétisé par les plantes, avec une production annuelle de 109 tonnes par an sont convertis en flavonoïdes (A, 2007).

De nombreux flavonoïdes présents dans produits de consommation présentent un intérêt d'un point de vue de la santé humaine et font l'objet de nombreuses allégations concernant la santé, particulièrement de par leur caractère antioxydant. (Lock O., 2006). Parmi les flavonoïdes, les anthocyanes et les flavonols sont des sous-classes particulièrement intéressantes. Les propriétés thérapeutiques, cosmétiques et alimentaires ont fait l'objet de nombreuses publications et brevets (Tableau01).

Les flavonoïdes ont une activité antibactérienne contre la croissance de nombreuses bactéries telles que *Staphylococcus aureus* (Babayi H., 2004), *Escherichia coli* (K, 2006), *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Heliotropium sinuatum*, *Proteus mirabilis*, (B, 2005)

Tableau01 : Structure de base des principaux flavonoïdes

(Harborne J. B., 2000)

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH ₃	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidzeine

3.2.c- Saponosides :

Les saponosides possèdent à la fois trois types de propriétés : moussantes, hémolytiques et cytotoxiques. La biosynthèse des saponosides est caractéristique d'environ 80 familles végétales. Leur utilisation est variée : dans les domaines veinotonique, anti-thrombotique, Antiparasitaire, antifongique, analgésique, sédatif, psychotrope immun modulateur et Cytotoxique (Taskin M. K., 2005). Les saponosides sont des hétérosides de stérols ou de triterpène. Ce sont des composés très répandus dans le règne végétal. Les saponosides forment une classe particulière de terpénoïdes constituée d'hétérosides de tri terpènes (ou de stérols).

Les saponosides sont solubles dans l'eau, libèrent par hydrolyse un ou plusieurs oses et une agénine (ou aglycone), forment une solution moussante.

3.2.d- Les tannins :

Les tanins sont des substances poly phénoliques de structure variée, de saveur astringente ayant en commun la propriété de tanner la peau, cette aptitude est liée à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da. Caractérisées par leur astringence, ils ont la propriété de précipiter les protéines et les métaux lourds. Ils favorisent la régénération des tissus et la régulation de la circulation veineuse, tonifient la peau dans le cas des rides (Kansole, 2009).

Les tanins sont très répandus dans le règne végétal, mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les Fagacées, les rosacées (Ghestem A., 2001). Ils peuvent exister dans divers organes : l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines.

☞ **Tanins hydrolysables:** Les tanins hydrolysables sont des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement scindés par les enzymes de tannases en oses et en acide phénol, selon la nature de celui-ci on distingue : les tanins galliques, et les tanins ellagiques.

- **Tanins galliques (Gallo tanins):**

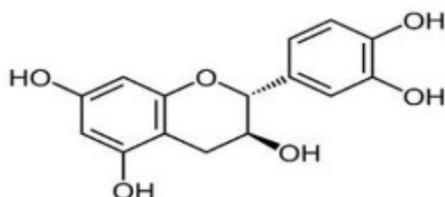
Ils sont scindés par l'hydrolyse des oses et de l'acide gallique.

- **Tanins ellagiques (Ellagitanins):**

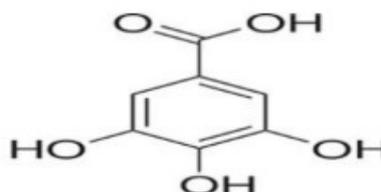
Ils sont scindés par les enzymes en oses et en acide ellagique

Tanins condensés:

Les tanins condensés sont des polymères flavanolique constitués d'unités flavan-3-ols, le plus souvent épicatechine et catéchine.



Catéchine



Acide gallique

Figure 1 : Structure chimique de deux molécules de tanins.**3.2.e-Glucosides cardiaque :**

Présents dans de nombreuses plantes médicinales, telles que les digitales laineuse et pourpree (*Digitals lanata* et *D purpurea*) et le muguet (*Convallana mcgalis*), les glucosides cardiaques comme la digitoxine, la digoxme et la convallotoxine ont une action directe et puissante sur le cœur .Ils l'aident a maintenir le rythme cardiaque en cas d'affaiblissement.

Ces glucosides sont également diurétiques .Ils contribuent a transférer les liquides des tissus et du système circulatoire vers les conduits urinaires.

3.2.f- Les anthocyanes

Les anthocyanes sont issus de l'hydrolyse des anthocyamdmes (flavonoïdes proches des flavones), qui donnent aux fleurs et aux fruits leurs teintes bleue, rouge ou pourpre. Ces puissants antioxydants nettoient l'organisme des radicaux libres. Ils maintiennent une bonne circulation, notamment dans les régions du cœur, des mains,des pieds et des yeux La mûre sauvage (*Rubus jruticosus*), la vigne rouge (*Vitisinmfera*) et l'aubépine (*Crataegus oxyacantha*) en contiennent toutes des quantités appréciables.(32)

4-Présentation de la plante étudiée :

Buxaceae est l'une des familles les plus importantes parmi les 20 familles de plantes contenant des alcaloïdes, qui comprend quatre genres, dont *Buxus*, *Sarcococca*, *Pachysandra* et *Styloceras* (Von, Endress, & Qiu, 2000). La famille est représentée par 2 genres et 7 espèces (Gaur, 1999). Est principalement distribué en Asie du Sud-Est et en Afrique régions semi aride (Algérie, Maroc, Tunisie).

Au cours des cinq dernières décennies, de nombreux travaux chimiques ont été effectués sur les plantes de ce genre en raison de leurs utilisations traditionnelles qui intéressent les chercheurs. Ces plantes sont des sources majeures d'alcaloïdes bioactifs tels que les alcaloïdes A et B, la saracocine, l'alcaloïde C, la E-salignone, la Z-salignone et la Na-déméthylsaracodin, l'époxynepapakistamine-A, l'époxysarcovagénine- D, funtumafrine C, N-méthylfuntumine, axillaridineA, spiropachysine, acide oléanolique et stigmastéryl glucoside. La majorité des travaux chimiques ont été signalés sur *S. coriacea*, *S. hookeriana*, *S. saligna* et plus de 50 alcaloïdes ainsi que d'autres constituants mineurs ont été signalés à partir de ces trois espèces seules. La plupart de ces plantes sont connues pour leur importance biologique distincte, y compris l'activité inhibitrice du cholinestérase. La démence d'Alzheimer (MA) se caractérise par une perte de mémoire progressive qui entraîne une profonde perturbation émotionnelle dans les stades ultérieurs. La maladie s'accompagne de dysfonctionnements du système de neurotransmission cholinergique du système nerveux central. L'influx nerveux dans les synapses cholinergiques est terminé par l'enzyme acétylcholinestérase, qui catalyse l'hydrolyse du neurotransmetteur acétylcholine.

Buxus dioica : permet de foncer les teintes obtenues avec le henné et de donner de l'éclat aux cheveux, il a la particularité de couvrir les cheveux blancs. Proche de l'indigo, lorsqu' il est mélangé au henné il donne une palette de couleur allant du châtain clair au foncé (brun chocolat) selon la couleur de base, le temps de pose et le nombre de hennés présents sur le cheveu



Figure 2 : *Buxus dioïca*

4- 1 : classification botanique du genre *Buxus*

Tableau02 : classification botanique du genre *Buxus* :

Règne :	Plante
Embranchement :	Spermatophyta (Angiospermae)
Classe :	Dicotylédones
Ordre :	Celastrales
Famille :	Buxaceae
Genre :	<i>Buxus</i>

5-Procédé d'extraction :

La norme ISO 9235 (Norme ISO, 1997) décrit un extrait végétal comme étant un « produit obtenu par le traitement d'un solvant, puis, après filtration, le solvant est éliminé par distillation sauf dans le cas de l'utilisation de solvant non volatils ».

Dans le domaine pharmaceutique, on appelle « drogue végétale » toute plante ou partie de plante médicinale (Pharmacopée européenne, 2015).

L'extrait doit être :

-Liquide : obtenues par extraction (extraits fluides et teintures)

-Semi –solide :obtenues par évaporation du ou des solvants ayant servi à leur production (extraits mous et oléorésines)

-Solides : obtenues également par évaporation du solvant ayant servi à leurs productions (extraits secs). Elles sont obtenues à partir de drogues végétales à l'aide de solvants

appropriés. Un extrait est essentiellement défini par la qualité de la drogue végétale dont il est issu, le procédé de la production utilisé (solvants d'extraction, procédé de traitement ...) et par des spécifications.

Chapitre 2 : Activités biologiques du *Buxus dioïca*

2.1. Activité antimicrobienne

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes (MO) qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux. Pour résister à ces microorganismes de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut schématiquement en distinguer 3 groupes : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise. (SHE, Host response to intracellular pathogens, 1997)

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multi résistantes d'où l'im (SHE, Host response to intracellular pathogens, 1997)portance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (W, 1998).

2.2 : Capacité antioxydant

Du fait de leur haute réactivité, les espèces oxygénées réactives (EOR) sont responsables de nombreux dommages vis-à-vis des constituants cellulaires. Cette production d'espèces délétères est généralement équilibrée par leur consommation à vitesse égale par le système antioxydant endogène. La rupture de l'équilibre entre espèces pro- et anti-oxydantes est désignée par le terme de stress oxydant.

2.2.1: Les antioxydants

Les antioxydants sont des molécules ayant la capacité de neutraliser des radicaux libres qui sont responsables de nombreuses maladies. Les antioxydants sont des composés qui inhibent ou retardent le processus d'oxydation en bloquant l'initiation ou la propagation des chaînes de réactions oxydatives (Behera J. N.). Les antioxydants naturels ou synthétiques sont utilisés pour prévenir de nombreuses maladies (cardiovasculaires et neurodégénératives, inflammation, diabète...) et le vieillissement, dus à la formation exagérée des radicaux libres. Les antioxydants sont également utilisés dans les aliments

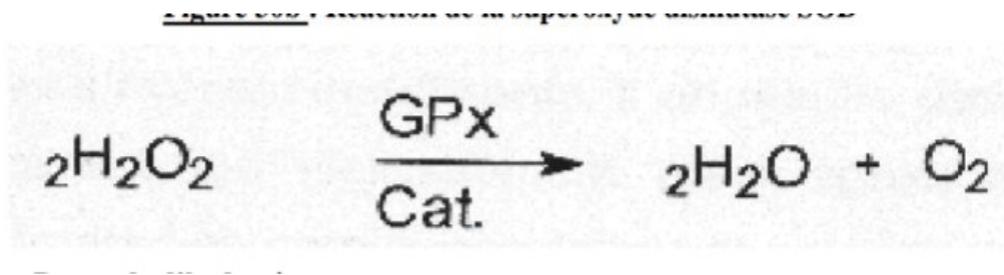


Figure 5: Réaction de la glutathion peroxydase GPx

3. Contrôle et analyse par la chromatographie sur couche mince CCM

La chromatographie est une méthode physique d'analyse basée sur la séparation de constituants d'un mélange ; les différents constituants de ce mélange appelés solutés sont séparés et entraînés par un fluide (un liquide ou gaz) que l'on appelle phase mobile ; ils interagissent ou au contraire n'interagissent pas avec une phase fixe que l'on appelle phase stationnaire qui exerce sur eux un effet retardateur. L'origine du mot chromatographie vient peut-être de la séparation de composés colorés puisque chroma en grec, signifie couleur et graphe in signifie écrire (al, 2013)

Chapitre3 :Généralité sur les souches testées

1.Bactéries à Gram positif

1.1 *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des cocci Gram positif qui tendent à se grouper en amas. Une espèce, *Staphylococcus aureus* (staphylocoque doré), tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales (Chambers, 1998).

1.2 *Listeria monocytogenes*

Les *Listeria* sont regroupées avec les *Brochetrix* dans la famille des *Listeriaceae*. Le genre *Listeria* comporte 8 espèces dont l'espèce *monocytogenes* ; pathogène pour homme et animaux et espèce *ivanovii*, pathogène pour les animaux et rarement pour l'homme.

2. Bactéries à Gram négatif

2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli (bacille à Gram négatif), commensal du tube digestif, est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires. Elle peut aussi provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers, ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales.

2.2 *Klebsiella pneumoniae*

Le genre *Klebsiella* a été nommé par Trévisans en 1887 pour honorer Klebs Edwin. Un microbiologiste Allemand 19^{ème} siècle. L'espèce type est *Klebsiella pneumoniae*, connue autre fois sous le nom de pneumobacille de Friedlander. Ce dernier avait décrit cette bactérie dans les poumons d'un patient décédé d'une pneumonie. (8)

Les bactéries appartenant à l'espèce *Klebsiella pneumoniae* sont des bacilles à Gram négatif, immobiles, diplobacilles généralement capsulées, non sporulées, anaérobies facultatifs.

3-Levure :

3-1-Candida albicans :

Candida albicans est une levure commensale de la voie orale, vaginale, gastro-intestinale, cutanée et des surfaces muqueuses. Elle est considérée comme pathogène fongique opportuniste le plus commun chez l'humain.

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel :

1.1. Zone d'étude :

La wilaya de El Bayadh est située à sud-ouest algérien(Figure),elle s'étend sur une superficie de 71697Km.Elle est délimitée comme suit (Terras, 2010):

- Au nord par la wilaya de Saida ; Tiaret ; Sidi-Bel Abbés.
- A l'ouest par la wilaya de Naama.
- Au sud par la wilaya de Bachar ; Adrar.
- A l'est par la wilaya de Laghouat.

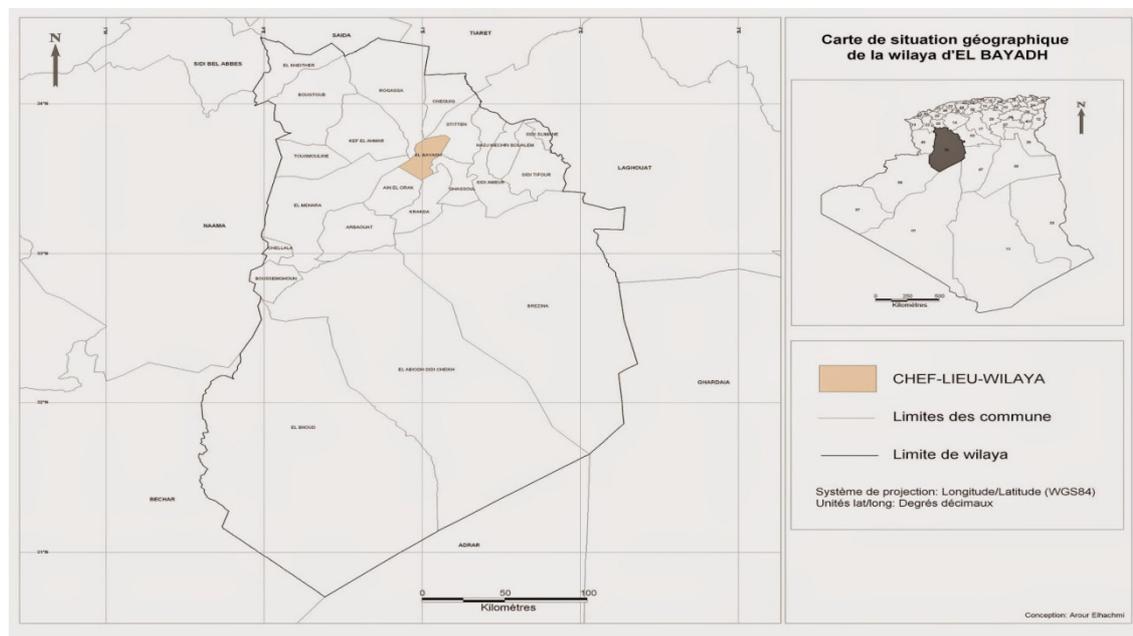


Figure 6 :Position géographique de la zone d'étude

1.2. Matériel végétal :

L'espèce étudiée est *Buxus dioïca* qui disponible dans région de Bayadh .Nous avons acheté la matière végétale sous forme séchée devant un herboriste.



Figure 7 : Les feuilles du Buxus dioïca

1.3. Matériel et réactifs chimiques utilisés :

Le matériel expérimental et les réactifs chimiques utilisés durant le travail pratique sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau 03 : matériel et réactifs chimiques utilisés :

Matériel	Réactif chimique
Balance de précision	Réactif de Mayer
Balance -Centrifugeuse	Réactif de Wagner
Etuve -Bain marie	Tournures de magnésium
Spectromètre UV-Vis	FeCl ₃ diluée (1%)
Micropipette 200µl	Chloroforme anhydre
Boîte de pétri -Anse de platine	Anhydre acétique
Autoclave -Bec benzen	Acide sulfurique (H ₂ SO ₄)
Plaque CCM- Les tubes à essai	DPPH
Les tubes héparine	Méthanol
Ecouvion -Eprouvette	Ethanol
Bicher -Flacon	HCl
Retavapor -Vortex	L'ammoniac
Plaque chauffante	Eau distillé
Papier filtre -Ballon	Iode de potassium
Milieux : Bouillon nutritive – Muller Henton –Gélose nutritive – sabourand.	

2 : Extraction : Les extraits utilisés ou cours de notre études sont préparés selon plusieurs mode d'extractions : macération ou sous reflex.

Les extraits préparé sont : extrait méthanolique, extrait aqueux, extrait éthanolique.

2.1 :Préparation de l'extrait aqueux sous reflex :

- Extraction sous reflex de 15g de feuilles en présence dans 100ml d eau distillé pendant 2h
- Filtration de la solution et récupération du filtrat.
- Evaporation à sec du filtrat.

2.2 : Préparation de l'extrait méthanolique et éthanolique :

-Extraction sous reflex et à chaud (100%) de 15g de feuilles dans 100ml d éthanol /méthanol pendant 2h. Les macéras sont filtrés par papier filtre.les filtrats sont concentrées à sec sous pression réduite et à une température 60C° au moyen d'un évaporateur rotatif.

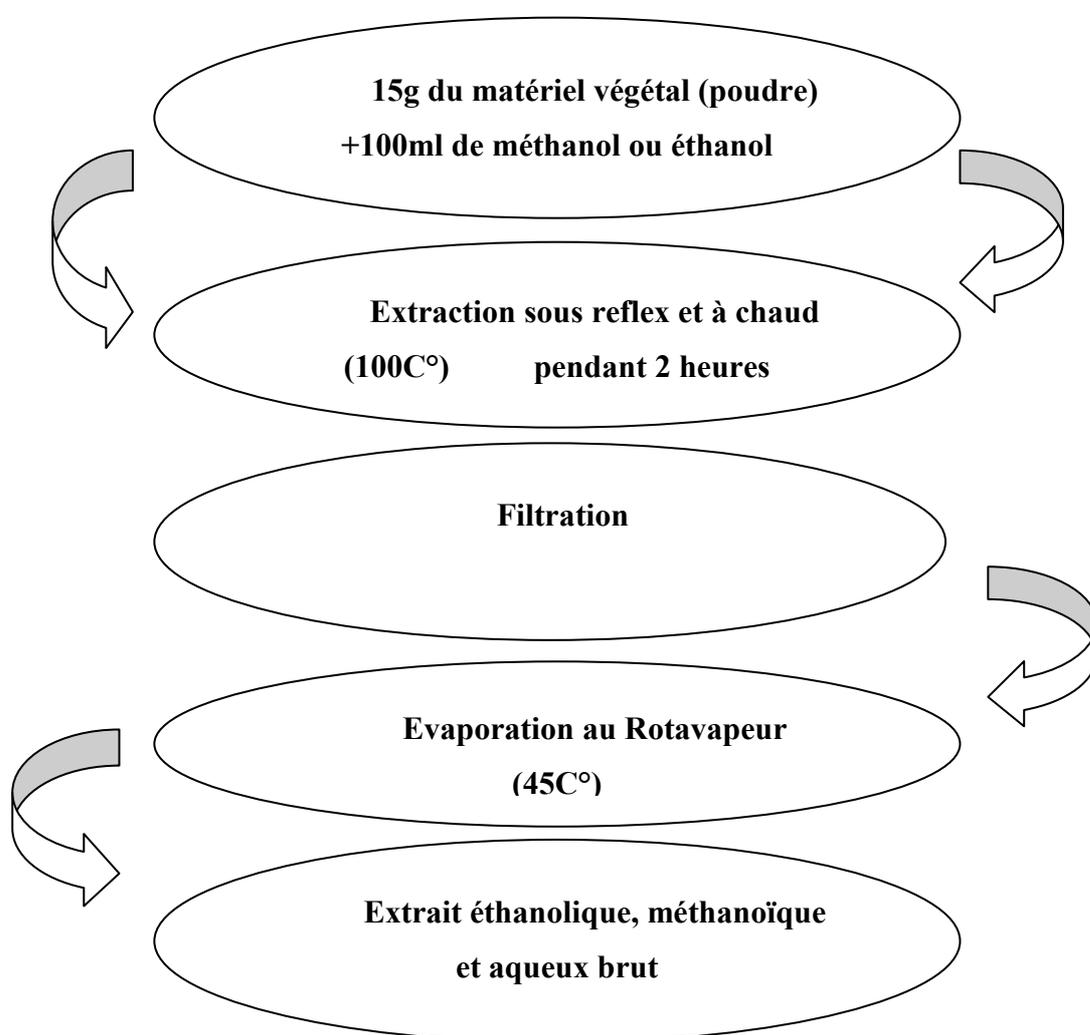


Figure 8 : Protocole de préparation d'extrait éthanolique, méthanoïque et aqueux.



Figure 9 : Quelques étapes d'extraction.

3. Calcul de rendement :

Le pourcentage de rendement pour chaque extrait a été calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = (M/M_0) \times 100$$

(%) : Rendement exprimé en %

M : masse en gramme de l'extrait sec résultant.

M₀ : masse en gramme du matériel végétal à traiter.

4: Screening phytochimique :

Afin de mettre en évidence la présence ou l'absence de certains composés appartenant aux familles chimiques des métabolites secondaires, nous avons réalisé des tests phytochimiques spécifiques fondés sur des réactions de coloration, de turbidité ou de précipitations.

4.1 : Flavonoïdes :

Dans un tube à essai on ajoute à 5 ml de solution (extrait éthanolique), puis on ajoute 1 ml HCl et 0.5 g de Mg (lire pendant 3 min). L'apparition d'une coloration rose ou rouge indique la présence d'un flavonoïde (Hopkins, 2003).

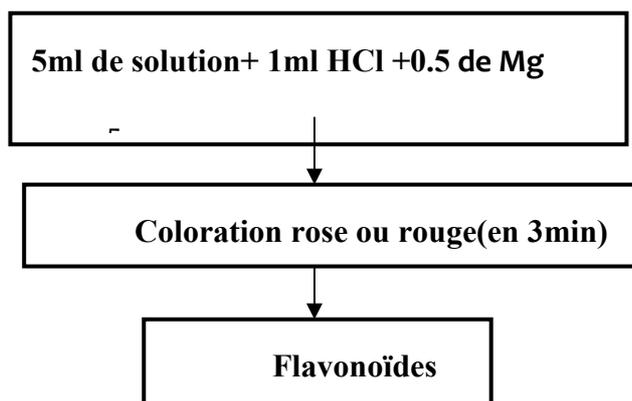


Figure 10 : schéma des tests phytochimiques pour la détection des flavonoïdes

4.2 : Tanins : (Cathélique ou Gallique) :

On met 1 ml de solution avec 2 ml H₂O et ajoute 2 à 3 gouttes de FeCl₃ 1%. En présence de tanins, il se développe une coloration bleu-vert (tanins Cathélique) ou bleu noire (tanins Gallique) (TREASE E., 2004).

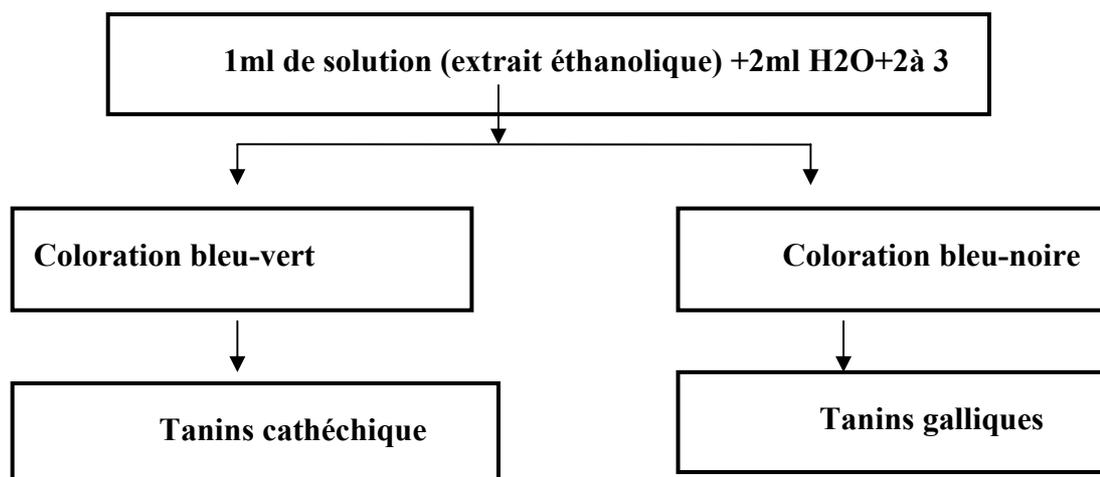


Figure 11 : schéma des tests phytochimiques pour la détection des tanins

4.3 : Saponosides :

La mise en évidence des saponosides repose sur leur faculté à former une mousse (Dohou N., 2003) Dans un bécher, on ajoute 100 ml d'eau distillée à une quantité de 2 g de poudre végétale, puis la solution est portée à ébullition pendant 30 min. Après refroidissement, on filtre le mélange et on ajuste le filtrat à 100 ml avec l'eau distillée. Dans une série de dix tubes à essai, sont introduits successivement 1, 2, ... 10 ml d'infusé à 2% de poudre végétale puis le volume est ajusté dans tous les tubes à 10 ml avec l'eau distillée. Chaque tube est agité pendant 15 secondes dans le sens de la longueur. Après un

repos de 15 min, la hauteur de la mousse est mesurée, si cette dernière est égale à 1 cm, la dilution de la substance dans ce tube correspond à l'indice de mousse recherché, il est égal à $1000/n^{\circ}$ tube. Un indice supérieur à 100 est considéré comme une réaction positive témoignant d'une richesse de la plante en saponosides.

4.4 : Les alcaloïdes :

La caractérisation des alcaloïdes est effectuée en utilisant des réactifs de Mayer et Wagner (E.A., 1982). Dans un erlenmeyer de 250 ml, introduire 2 g de la poudre végétale et 50ml d'une solution aqueuse acidifiée par H_2SO_4 à 10%. Le mélange est agité et macéré pendant 24 heures à la température ambiante du laboratoire. Il est ensuite filtré sur papier filtre et lavé à l'eau distillée de manière à obtenir environ 50ml de filtrat. Dans deux tubes à essai sont introduit 1ml de filtrat à puis on ajoute 1-5 gouttes des réactifs de Mayer (2.5 g d'iode, 5 g d'iodure de potassium et 100 ml H_2O) dans le premier tube et 2-5 gouttes de Wagner dans le second. La présence d'une turbidité ou d'un précipité après 15 minutes dans les deux tubes confirme la présence des alcaloïdes.

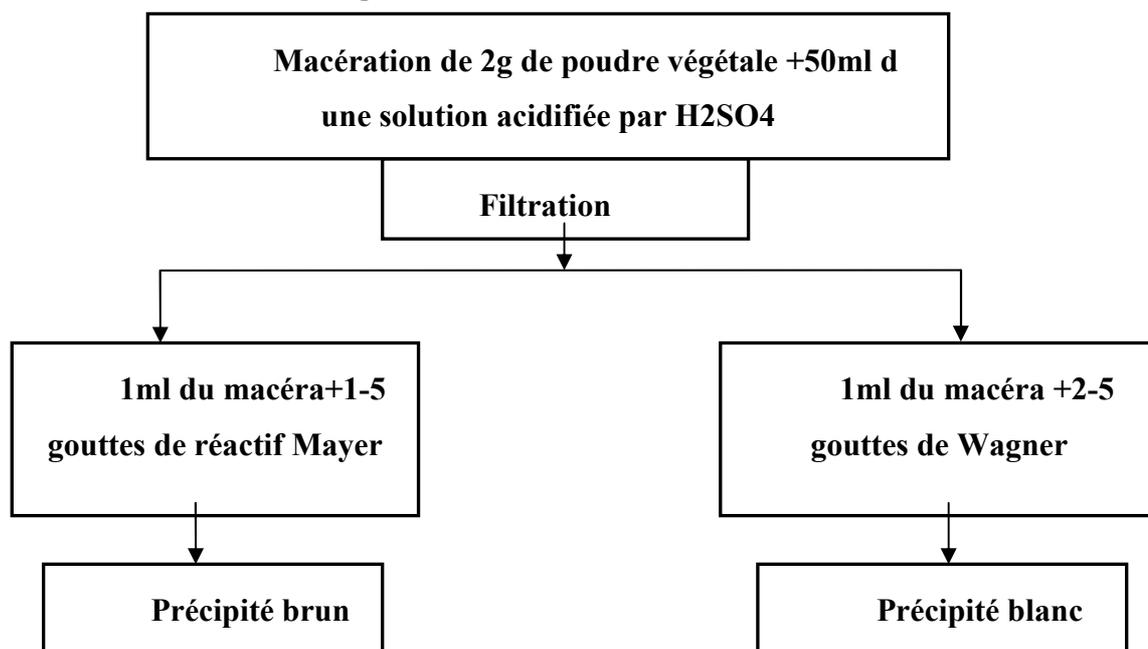


Figure 12: schéma des tests phytochimiques pour la détection des alcaloïdes

4.5 : Amidon :

Le test effectué consiste à : Chauffer 5 ml de l'extrait (aqueux, éthanolique, méthanolique) avec 10 ml d'une solution de Na Cl saturée dans un bain marie jusqu'à l'ébullition ; Ajouter le réactif d'amidon .Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue violacé(J.L.Guignard., 2004)

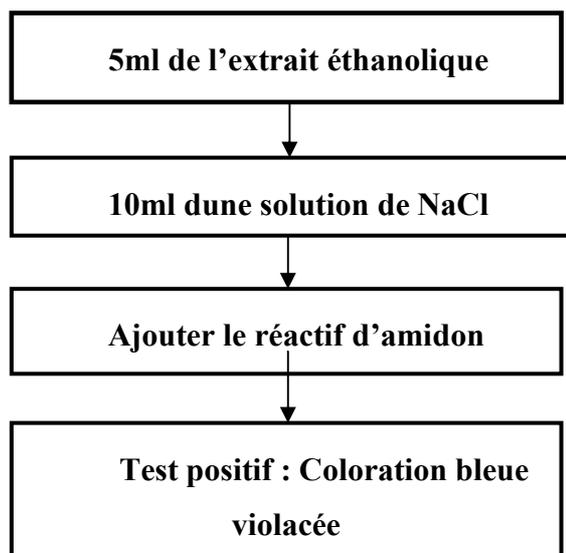


Figure 13: schéma des tests phytochimiques pour la détection d'amidon

4.6 : Glycosides cardiaques :

2 ml de chaque extrait (aqueux, éthanologique, méthanolique) a été dissous avec 2 ml de chloroforme, l'acide sulfurique concentré a été ajoutée avec précaution pour former une couche rougeâtre foncée à l'interface de l'anneau stéroïde, qui indique la présence de glycosides cardiaques(D.Dialla, 2000)

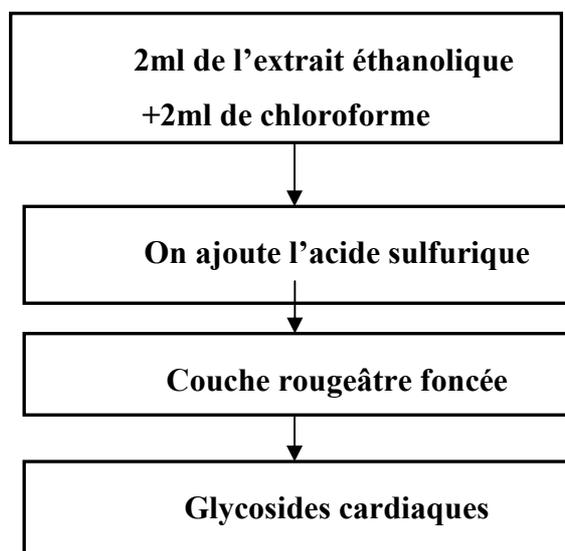


Figure 14: schéma des tests phytochimiques pour la détection les glycosides cardiaques

4.7 : Composés réducteurs :

1 ml de solution avec 2 ml H₂O et ajoute 20 gouttes de réactif de Fehling puis chauffé. Formation le précipité rouge-brique signifie la présence des composés réducteurs (TREASE E., Pharmacognosie, Billiaire Tindall. London 13 th Edition. P 61-62., 1987)

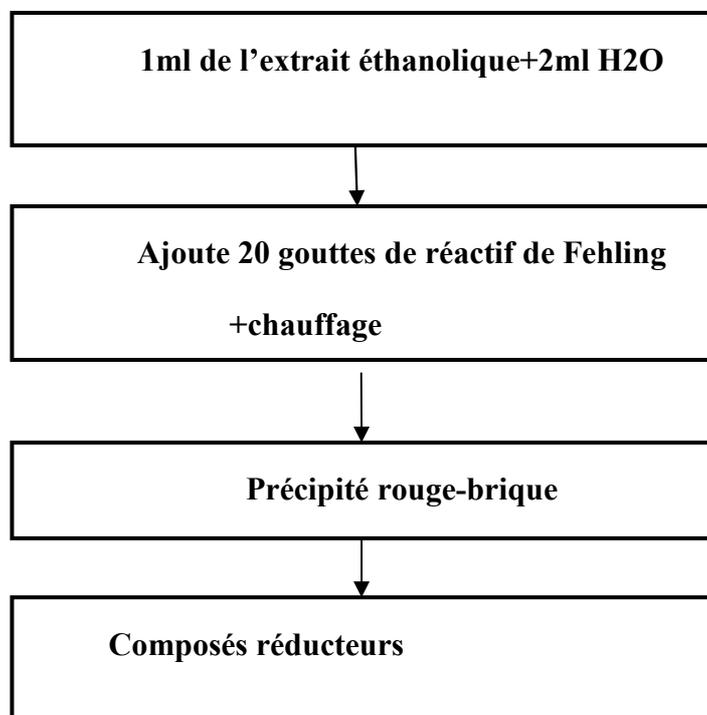


Figure 15 : schéma des tests phytochimiques pour la détection les composés réducteurs

4.8: Anthocyanes :

2 ml d'infusé aqueux sont ajoutés à 2 ml de HCL 2N. L'apparition d'une coloration rose- rouge qui vire au bleu violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes (Figure) (Debray M., 1971).

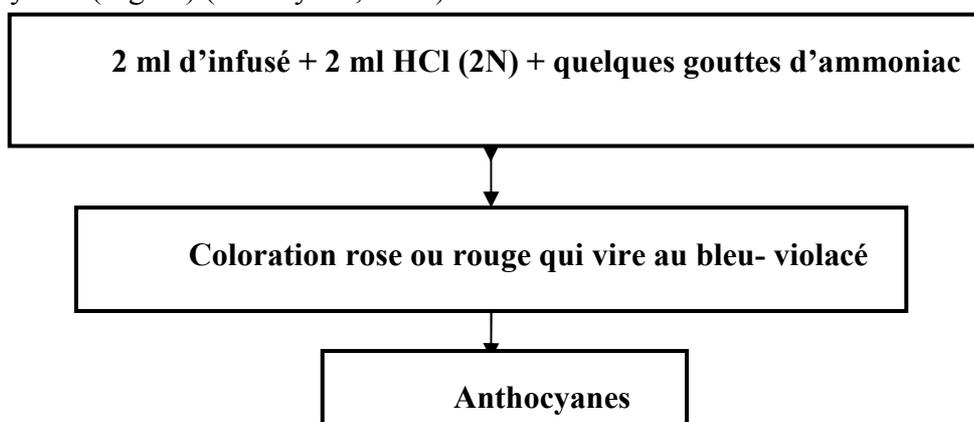


Figure 16 : schéma des tests phytochimiques pour la détection les anthocyanes

5. Evaluation de l'activité antibactérienne

5.1 : Les souches utilisées :

Tableau 04 : Différentes souches utilisées pour l'évaluation des activités antibactérienne :

Nom de la souche	Références	Gram
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC19115	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923	+
<i>Klebsella pneumoniae</i>		-

5.2 Les milieux de cultures utilisés :

Nous avons utilisé 3 trois milieux de culture : gélose nutritive –gélose Muller Hinton- Bouillon nutritif.

5.3 Méthode de diffusion en milieu gélose :

5.3.1 Préparation de l'inoculum bactérien :

Les souches bactériennes ont été revivifiées dans un bouillon nutritif à 37°C pendant 24 heures. Puis des gouttelettes de suspension bactérienne sont ensemencées en strie dans des boîtes de pétri préalablement coulées de gélose nutritive. Concernant les levures ;la pré culture en milieu solide (sabouraud) de 48h à 35C°.

Après incubation, préparé un inoculum à partir des colonies bien isolées dans 2 ml l'eau physiologie stérile.

- laisser bien homogénéiser la suspension bactérienne.

- L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum.

5.3.2 : Préparation de les boites pétrie :

- Laver les mains.
- Laver la surface de travail avec un désinfectant.
- Allumer le bec bunsen.
- Placer la gélose MH dans une boite de pétri.
- Fermer la boite de pétri.
- Laisser à gélifier.
- Laver la surface de travail avec un désinfectant.



Figure 17 : les boites de petri préparés



Figure 18: Muller Hinton

5.3.3 : Préparation de la gamme de concentration d'extrait :

L'extrait éthanolique a été dissout dans l'éthanol pour obtenir une solution mère de 5mg/ml ; pour préparer les différentes dilutions $\frac{1}{2}$. Cette gamme (tableau) a été préparée dans des 5 tubes en verre :

Tableau 05: les concentrations utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne :

N°	1	2	3	4	5
Mg/ml	5	2.5	1.25	0.625	0.33

5.3.4 : Ensemencement des boîtes :

Les boîtes de Pétri contenant de Mueller Hinton gélosé MH (pour les bactéries) et Sabourant (pour les levures) sont ensemencées aseptiquement par écouvillonnage. Ensuite elles sont séchées à proximité de la flamme (15min).

- 30 μ l de chaque solution d'échantillon à tester ont été déposés dans les puits précédemment creusés
- Les boîtes de pétri ont été laissées pendant 1 heure à la température ambiante pour une pré-diffusion des substances ; avant d'être incubées à 37C° à l'étuve pendant 24h (Oke MA, 2013).
- Des puits d'antibiotiques (Céphalosporine) ont été également utilisés pour servir de témoins positifs.
- L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque puit.

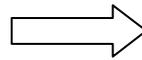


Figure 19: Ensemencement des boîtes de pétri

Figure 20: Remplissez les puits

5.3.5 : Lecture :

Selon Barros et al., 2007, l'activité antimicrobienne est exprimée en zones d'inhibition comme suit :

- Diamètres inférieurs à 7 mm : aucune activité antimicrobienne (-)
- Diamètres de 7 à 9,9 mm : activité antimicrobienne faible (+)
- Diamètres de 10 à 11,9 mm : activité antimicrobienne modeste (++)
- Diamètres de 12 à 15 mm : activité antimicrobienne élevée (+++)
- Diamètres supérieurs à 15 mm : activité antimicrobienne forte (++++)

6-Evaluation de l'activité antioxydante :

Test de piégeage du radical libre DPPH : Le test antioxydant a été réalisé avec la méthode au DPPH (Sanchez-Moreno C., 1998). 50µl de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations (de 0,0125 à 5mg/ml) sont ajoutés à 1,95 ml de la solution méthanolique du DPPH. Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50µl de méthanol avec 1,95 ml de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 515nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration le test est répété 3fois. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (PI).

$$PI= 100(A0-A1)/A0$$

A0 : absorbance DPPH

A1 : absorbance échantillon

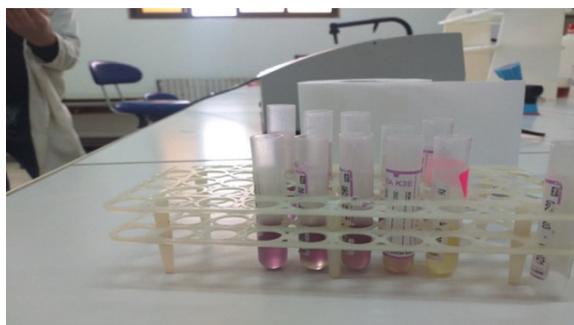


Figure 21 : Piégeages du radical libre DPPH

Les valeurs de la CI50 ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire.

7-Fractionnement de l'extrait par CCM

Supports utilisés dans cette expérimentation

Des plaques en verre (20cm sur 20cm) sont rincées avec du méthanol et séchées, le gel silice est répandu uniformément sur ces plaques à l'aide d'un étaleur pour avoir une épaisseur de 0.5 mm. Ensuite, les plaques sont séchées à l'air libre pendant 15 min puis activées dans une étuve à 110°C pendant 30min. Les

différents dépôts sont espacés de 2 cm en laissant 1.5 cm aux deux extrémités latérales.

Les essais de CCM sont réalisés sur extrait : l'extrait méthanolique 20mg de chaque extrait est solubilisé dans 1 ml méthanol, Les témoins utilisés sont : l'acide gallique, myrcétine, catéchine et la quercétine.

Les échantillons sont disposés sur une plaque préparée de verre fluorescente recouverte d'une face de gèle silice ; Les éluants testés sont essentiellement :

- Méthanol : Chloroforme (50/50).
- Méthanol : Acétate d'éthyle : acide formique :(75 /25/25/5).

Après migration du système sur plaque CCM, on procède à la révélation des chromatogrammes par une lampe UV : 254,336 nm.

L'interprétation qualitative du chromatogramme s'effectue par la détermination des facteurs de rétention RF. La position finale de la tache (ou spot) est caractéristique de la molécule. Ce RF est le rapport de la distance parcourue par le composé divisé par la distance parcourue par l'éluant. **(ALI et BENARIBA ,2012).**

$$RF= X/Y = \text{Hauteur de la tache} / \text{Hauteur du front du solvant.}$$

RESULTATS ET DISCUSSION

1-Rendement de l'extrait : Le rendement des extraits étudiés (méthanolique, éthanolique) a été déterminé par rapport à 15g du matériel végétal sec (feuilles). Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau.

Tableau06 : Rendements des extraits bruts des feuilles de *Buxus dioica*

Extrait brut	Poids de l'extrait(g)	Rendement de l'extrait (%)
Extrait méthanolique	0.96	6.4
Extrait éthanolique	0.87	5.8

Les taux- de polyphénols totaux enregistrés dans les extraits éthanolique, méthanolique de l'espèce *Buxus dioica* étudiée sont résumés dans la (Figure22).

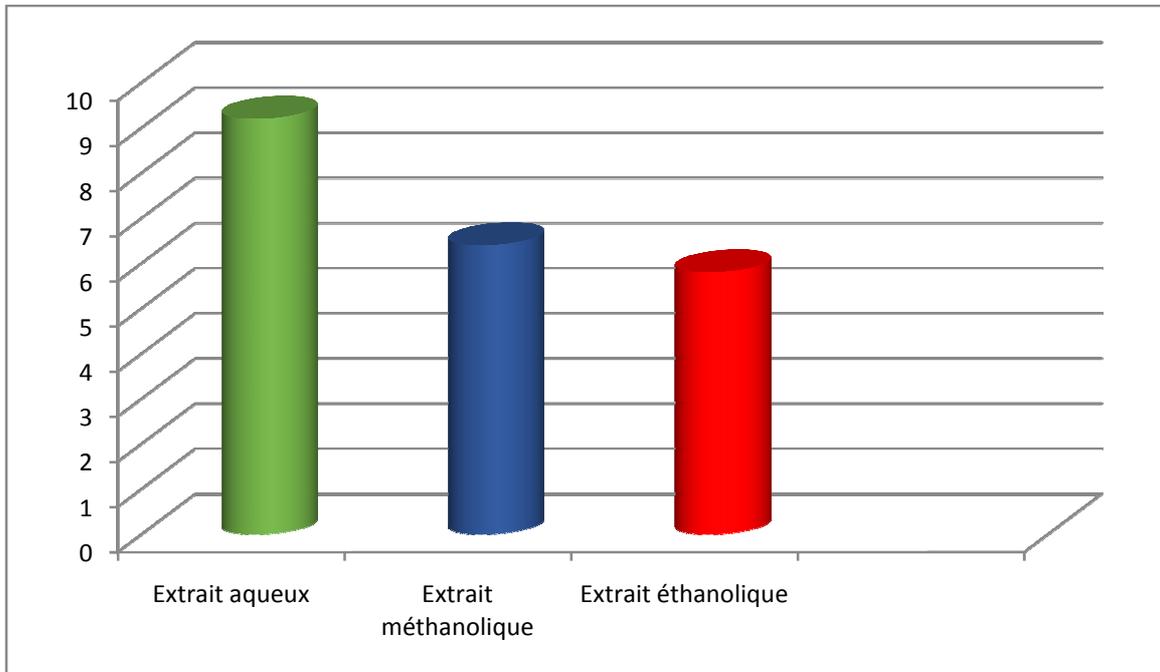


Figure 22: Rendement d'extraction

D'après ces résultats on constate clairement que le taux de polyphénols estimés varie proportionnellement en fonction de la polarité des solvants d'extraction. En effet, l'extrait aqueux a présenté le taux le plus élevé avec une valeur de 9.3% suivie par l'extrait méthanolique 6.4%. Alors que la teneur la plus faible est enregistrée pour l'extrait éthanoliques avec une valeur de 5.8%.En accord avec ces résultats, plusieurs travaux affirment que les polyphénols sont solubles dans les solvants apolaires (Djahra.Ali.Boutelis, 2013).

D'une manière générale, les teneurs en extraits secs varient en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide des polyphénols, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion du solvant. En plus de ces aspects quantitatifs, quelque soit la méthode d'extraction appliquée, elle doit tenir compte de la qualité d'extrait, autrement dit de la bioactivité de ses principes actifs.

2-Résultats de screening phytochimique :

Tableau 07: Résultats de screening phytochimique :

Métabolites secondaires	Remarque	Résultat
Flavonoïdes	Apparition d'une couleur rouge	(+)
Composé réducteurs	Ne apparition pas d'une couleur rouge brique	(-)
Tanins cathéchique	Apparition d'une couleur bleu-vert	(+)
Tanins gallique	Ne apparition pas d'une couleur bleu-noire	(+)



Saponides	Le tube n°8 est plus proche de 1cm, donc l'indice de mousse I=125	(+) 
Amidon	Apparition d'une couleur bleu - violacée	(++) 
Anthocyanes	Pas de couleur rose ou rouge	(+) 
Alcaloïdes	Ne apparition pas d'une précipité blanc	(-) 
Glycosides cardiaque	Ne apparition pas d'une couleur rougeâtre	(-) 

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de quelques métabolites secondaire au niveau des feuilles de la plante étudiée (*Buxus dioïca*). La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitation ou un changement de couleur.

Les résultats obtenus des tests phytochimiques, des différentes préparations des feuilles du *Buxus dioïca*, ont révélé la richesse de cette plante en tanins ; flavonoïdes ; saponides et amidon dans les différentes préparations éthanolique et méthanolique.

Par contre, les tests des alcaloïdes ; des glycosides cardiaques et des anthocyanes sont marqués négatifs dans les différents extraits.

3-Résultats de l'activité antimicrobienne :

Le tableau(17) reflète les résultats des tests d'inhibitions effectués par les méthodes de diffusion de puits d'agar, montrant forte activité antibactérienne de l'extrait méthanolique contre *Staphylococcus aureus* avec des zones d'inhibitions de 21-13-6-4 mm. Pour l'activité antifongique : montrant forte activité de l'extrait méthanolique contre A14 ; A7 et A6 avec des zones d'inhibitions de 22-20-18-14mm ; 20-16-13-12mm et de 18-17-15-14mm respectivement.

Tableau08 : Diamètres d'inhibitions obtenus par l'extrait méthanoliques de *Buxusdioïca*

Diamètre des zones d'inhibitions en mm				
Concentration(mg/ml)	5	2.5	1.25	0.6
<i>Staphylococcus aureus</i>	21	13	6	4
<i>Listéria monocytogenes</i>	10	8	7	5
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
<i>Klebsella pneumoniae</i>	10	5	-	-
<i>Candida albicans</i> A6	15	17	15	18
<i>Candida albicans</i> A7	20	16	13	14
<i>Candida albicans</i> A9	14	11	8	8
<i>Candida albicans</i> A14	22	20	18	14

(-) : aucune inhibition

Les diamètres des zones obtenus de l'extrait méthanolique varient de 04 mm jusqu'à 22 mm. Les deux souches *C. albicans* A14 (22 à 14) ; *C. albicans* A7 (20

à 14mm) et *C.albicans* A6 (15à18mm) étaient les plus sensibles (de 5mg/ml à 0,625 mg/ml) par l'extrait méthanolique de *Buxus dioïca*, suivie de *C.albicans* A9(14à8mm)(de 5mg/ml à 0.625mg/ml).

Cependant, l'activité antibactérienne a montré une sensibilité de *S. aureus* (21 à 4mm)(5mg/ml à 0.625mg/ml), *L. monocytogenes* (10 à 5 mm)(5mg/ml)et *K. pneumoniae* (10 à 5mm)(5mg/ml). Cependant, il na aucun effet sur la souche *E. coli*.

Les photos de la Figure illustrent les zones d'inhibitions pour l'extrait méthanoliques.

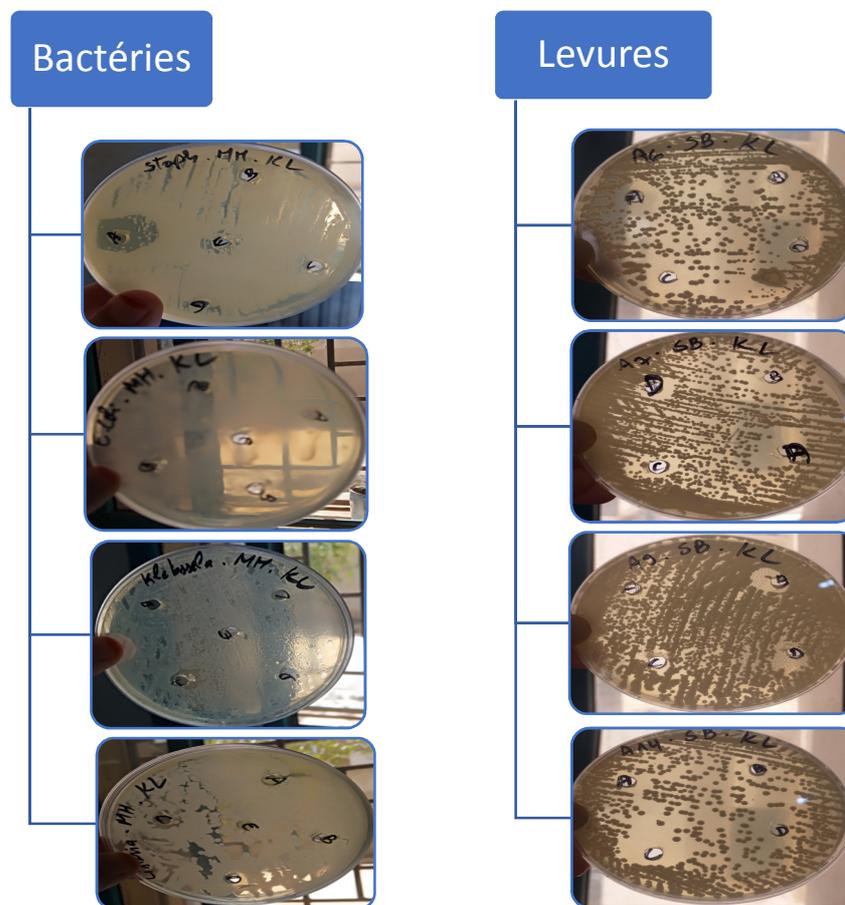


Figure 23 : Photos montrant des zones d'inhibition de la croissance bactérienne

4-Résultats de l'activité antioxydant

Afin dévaluer l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique la capacité de piégeage des radicaux DPPH a été évaluée. La figure montre que l'extrait méthanolique est doté d'une

capacité significative à piéger le radical DPPH avec une concentration inhibitrice médiane égale à $IC_{50\%}=2.01$ mg/ml

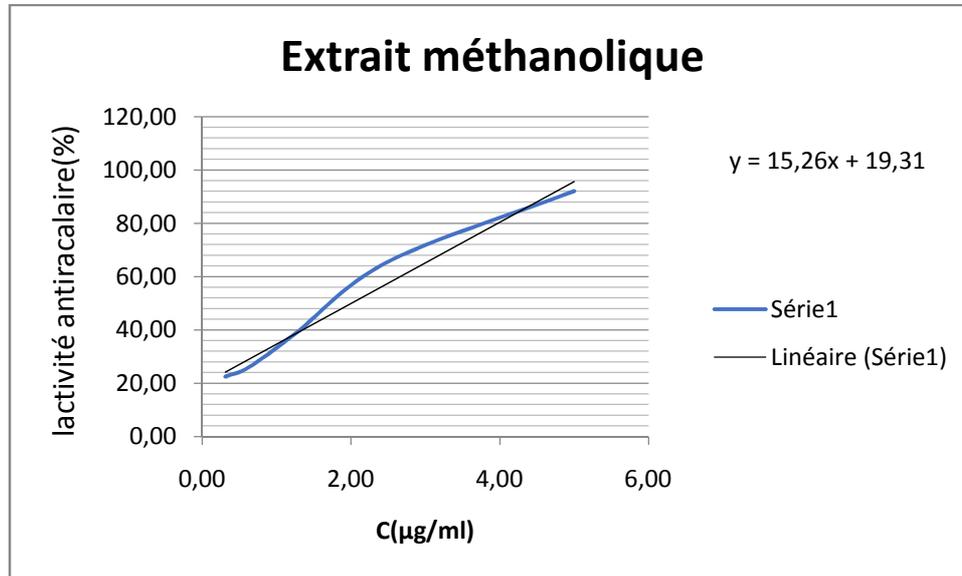


Figure 24 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH de l'extrait méthanolique.

5- Résultats de la chromatographie sur couche mince

Tableau 09 : Résultats de CCM de l'extrait bruts des feuilles de *Buxus dioïca*

Phase mobile	Méthanol/ chloroforme	Méthanol/Acétate d'éthyle/Acide Formique
RF	0.098	0.11

L'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) d'extrait méthanolique a donné une seule tache de couleur jaune à un rapport frontal (RF) de 0.098 pour la phase mobile (Méthanol/ Chloroforme) et 0.11 pour la phase mobile (Méthanol/ Acétate d'éthyle/Acide formique) qui indique la présence de rutine (est une molécule naturelle appartenant à la famille des flavonoïdes)

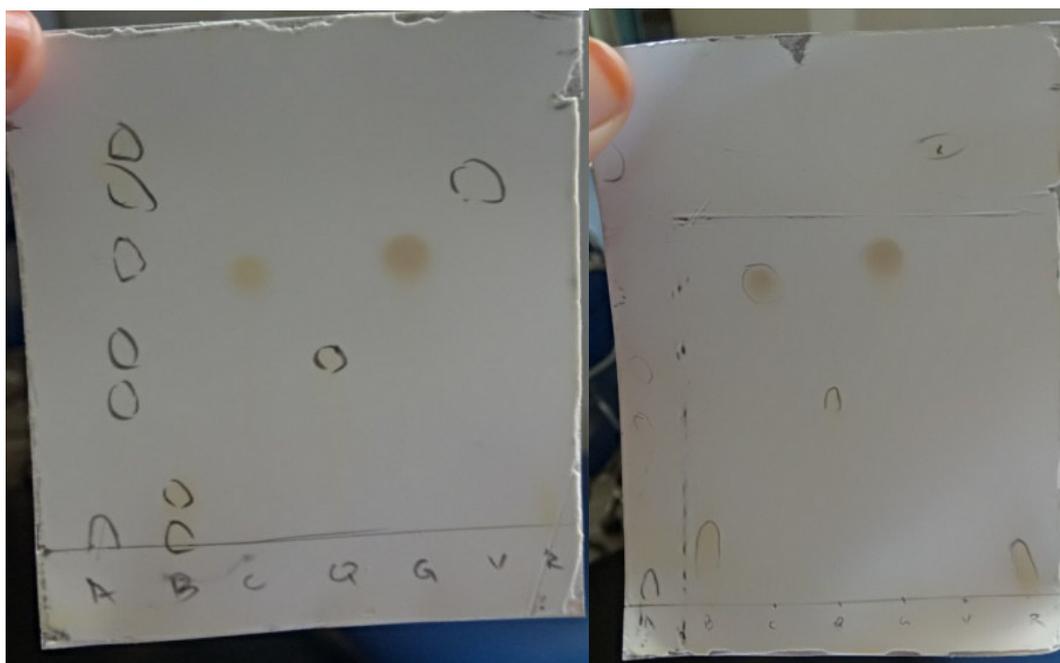


Figure 25 : Résultats de CCM de l'extrait de *Buxus dioica*

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

Notre travail a porté sur l'étude phytochimique des feuilles du *Buxus dioïca*, récoltée dans la région d'El Bayadh.

L'étude phytochimique, e des feuilles du *Buxus dioïca* a permet d'obtenir un rendement d'extraction avec des solvants de polarité différente (eau, méthanol, éthanol) de l'ordre de 9.3% ; 6.4% et 5.8% respectivement. En accord avec ces résultats, plusieurs travaux affirment que les poly phénols sont plus solubles dans les solvants polaires que dans ceux apolaires.

Les résultats des tests phytochimiques effectués sur les différents extraits (aqueux, éthanolique et méthanolique) ont prouvé la richesse des feuilles du *Buxus dioïca* en tanins, flavonoïdes, saponines et amidon.

L'évaluation d'activité antioxydante a révélé que cette plante a des très bonnes propriétés antioxydantes, avec un pourcentage de 92%.

L'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique des feuilles de la plante *Buxus dioïca* a été évaluée sur quatre souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsella Pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*), selon la méthode de diffusion sur milieu. Les résultats ont montré que l'extrait éthanolique du *Buxus dioïca* a exercé une activité sur *Staphylococcus aureus*. Pour le test antifongique, les résultats obtenus ont montré que l'extrait éthanolique du *Buxus dioïca* a exercé un effet antifongique sur *Candida albicans* à des concentrations différentes.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- . Al-Gabbiesh A., K. M. (2015). Influencing the Contents of Secondary Metabolites in Spice and Medicinal Plants by Deliberately Applying Drought Stress during their Cultivation. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 1 (8), 1 – 10.
- : <http://www.futura-sciences.com> . (2017, 12 05). *Futura santé.Définition-plante-médicinale, principe-actif-substance-active* .
- A, G.-F. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 1-93.
- A, L. (2007). *Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes*.
- al, M. e. (2013).
- al, M. e. (2005). Tropical Medicine & International Health. *Blackwell Synergy*, 11, 136-143.
- B, M. (2005). *Screening of medicinals plants used in Rural Indian Folk* .
- B, M. (2009). Thèse de doctorat. "Phytochimie. *Contribution a l'étude phytochimique de deux plantes de la famille des Apiaceae : Carum montanum Coss. & Dur. et Bupleurum montanum Cos* , 01.
- Babayi H., K. I. (2004). *The antimicrobial activities of methanolic*.
- Behera J. N., R. J. *A Ni²⁺ (S = 1) Kagome Compound Templated by 1,8-Diazacubane American of Chemistry Society*, 128 (29), 9334-9335.
- Benkhnigue O., Z. L. (2011). *.Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri*, 53, .191-216 .
- D. Ouraini, A. A.-A. (2007). Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides*. *Phytothérapie* (01), 6-14.
- D.Dialla. (2000). Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them: *Glinus oppositifolius* (*Azoaceae*), *Diospyros abyssinica* (*Eblanceae*), *entada Africana* (*Meliaceae*), *these de Doctorat* .
- Debray M., J. H. (1971). *Travaux et documents de l'Orstom* (8).

Djahra.Ali.Boutelis. (2013). thèse de Doctorat. *Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou Marrubium vulgare L.*

Dohou N., Y. K. (2003). Screening phytochimique d'une endémique Ibero-marocain. *Thymelaea lytroides*. *Thymelaea lytroides*, 142, 61-78.

Dutertre J.M. (2011). *Enquête prospective au sein de la population consultant dans les cabinets de médecine générale sur l'île de la Réunion : à propos des plantes médicinales, utilisation, effets, innocuité et lien avec le médecin généraliste*. Thèse doctorat d'état, Univ. Bor. France,; p33.

Dzoyem J.P., T. J. (2010). *Activité antifongique des extraits de quelques plantes médicinales camerounaises*, 10.

E.A., S. (1982). Medicinal plants and traditional medicine in Africa. *John Wiley and Sons* , 256.

El kalamouni C., M. B. (2010). Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits des plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. *Thèse de Doctorats, Université de Toulouse*.

ELQAJ M., A. A. (2007). *ELQAJ M., AHAMI A. et BELGHYTI D., 2007 - La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires*. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques. Maroc.

G., F. (1965). *Guide des travaux pratique en matière médicale pharmacognosie*. France :JOUVE.

Gaur, R. (1999). Flora of the district Garhwal. *Family Buxaceae*, 107, 331-332.

Ghestem A., S. E. (2001). Le préparateur en pharmacie dossier 2ème Ed TEC&DOC. 275.

Grumwald J., & Janck C. (2006). *guide de la phytothérapie*. 2ème édition. Italie:marabout.

Harborne J. B., W. C. (2000). *Advances in flavonoid research since 1992*, 55 (6), 481-504.

- Hilinaruthnadia. (16/02/2018]). *Les bénéfiques et les inconvénients de la phytothérapie.[en ligne]*.
- Hopkins. (2003). *Physiologie végétale. 2ème édition Boeck* , 276-280.
- J.L.Guignard., F. (2004). *Botanique et systématique moléculaire* , 284.
- J.N, E. (1998). *A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria.*, 64 (8), 711-3.
- K, U. (2006). *Arch.Microbial. Differential antibacterial activity of genistein arising from*, 184 (5) , 271-8.
- Kansole, M. (2009). *Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de Leucas martinicensis (Jacquin)*.
- Lock O., C. I. (2006). *Analysis of flavonoids in plants. Current*.
- M, C. M. (1999). *Plant products as antimicrobial agents. Clinical microbiology reviews*, 12 ((4)), 564-570.
- M, P. (2006). *Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat* , 161.
- Marc Pihet, A. M. (2013). *Diagnostic biologique des candidoses. REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES (N°450)*.
- Norme ISO. (1997). *Matières premières d origine naturelle-vocabulaire (9235)*.
- Oke MA, B. A. (2013). *Evaluation of antibacterial efficacy of some alcoholbased hand sanitizers sold in Ilorin (north-central Nigeria).*, 15 (1), 111-117.
- P, B.-B. E. (1995). *Antibiothérapie en pratique clinique*. Ed. Masson, Paris.
- P, I. (2001). *Encyclopédie des plantes médicinales. 2ème édition*. Londres : Larousse.
- Pharmacopée européenne. (2015). *Extraits de drougue végétale (0765)*.
- Sanchez-Moreno C., L. J.-c. (1998). *A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. Journal Science Technology International*, 8, 144-153.

SHE, K. (1997). *Host response to intracellular pathogens*. Ed. Springer ; R.G. Landes, New York; Austin.

SHE, K. (1997). *Host response to intracellular pathogens*. Ed. Springer ; R.G. Landes, New York; Austin,.

Taskin M. K., A. C.-g. (2005). Triterpène saponins from *Nigella sativa* L. *Turkish Journal of Chemistry*, 29, 561-569.

TREASE E., E. W. (1987). Pharmacognosie, Billiaire Tindall. London 13 th Edition. P 61-62. In Karumi Y, Onyeyili PA et Ogugduaja VO,2004 , 61-62.

TREASE E., E. W. (2004). Pharmacognosie,Billiaire Tindall. In Karumi Y, Onyeyili PA et Ogugduaja VO , 61-62.

Ulanowska K., M. A.-B. (2007). Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia*, 62, 132-135.

V., N. (2003). *Encyclopédie des plantes médicinales et aromatiques*. Paris .

Von, B., Endress, P., & Qiu, Y. (2000). *Phylogenetic relationships in Buxaceae based on nuclear internal transcribed spacers and plastid ndhF sequence*, 161, 785-792.

W, B. J. (1998). Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot. *Q. Rev. Biol*, 73, 3-49.

Z, H. (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus: Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). *Mémoire de magister."* *Biochimie appliquée et Biotechnologies* , 16-17.

