

N° d'ordre...

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
Département des Sciences de l'Environnement

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

Présentée par :

Mr BENCHIHA Walid

Spécialité : Environnement

Option : Ecologie Végétale et Environnement

Intitulé

**Phyto-écologie et étude biochimique des composants
phénoliques (traitement in vivo contre hépatite)
de *Rhamnus alaternus* L. des monts de Tessala
Wilaya de Sidi Bel Abbès**

Soutenue le

Devant l'honorable jury composé de :

Président de jury : Mr MEHDADI Z.

Professeur, UDL/SBA

Examineurs : Mr BELKHODJA M.

Professeur, Univ. Es-Sénia/Oran

Mr LATRECHE A.

Professeur, UDL/SBA

Mme REZZOUG W.

M.C.A, Univ. Tiaret

Mr CHADLI R.

M.C.A, Univ. Ibn Badis /Mostaganem

Directrice de thèse : Mme MAHROUG S.

M.C.A, UDL/SBA

Année universitaire 2015 - 2016

DEDICACE

*Je dédie ce travail,
À mes Parents Pour leur soutien tout le long de mes études,
Vous qui avez toujours cru en moi et su me redonner confiance
lorsque la motivation n'était plus au rendez-vous,
A mes Sœurs et mes Frères,
À mes Amis,
A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour*

REMERCIEMENTS

“Le meilleur ami de « Merci » est « beaucoup »” - Michel Bouthot-

A l'issue de ce travail de recherche, je tiens tout particulièrement à remercier ma directrice de thèse, Mme **MAHROUG S.** Maitre de conférences à l'université de Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes pour avoir accepté d'encadrer avec beaucoup d'attention et de soin de cette thèse. Je lui suis très reconnaissant pour sa disponibilité, sa bienveillance et son soutien permanent, et d'avoir prêté un intérêt constant au sujet. Je lui dois beaucoup pour le contenu du travail présent, pour ses critiques constructives et son aide aux différentes entraves rencontrées.

L'occasion est du jour pour remercier tous se qui ont accepté d'associer leurs compétences et leurs savoirs afin de juger ce travail :

A Mr. **MEHDADI Z.** Professeur au département de l'environnement de l'université de Djilali Liabes qui nous fait l'honneur de présider le jury de cette soutenance. Je lui adresse mes respectueux remerciements.

A Mr **BELKHODJA M.** Professeur au département de biologie de l'université d'Es-Sénia (Oran) a qui je dois leur adresser mes remerciements les plus sincères.

A Mr **LATRECHE A.**, Professeur au département de l'environnement de l'université de Djillali Liabes qui a bien voulu juger ce travail ce travail et avoir très aimablement consenti à part au jury de cette thèse.

A Mme **REZZOUG W.** Maitre de conférences « A » à l'université de Tiaret pour avoir eu l'amabilité de juger sans hésitation ce travail et d'accepter de siéger parmi les membres de jury.

A Mr **CHADLI R.** Maitre de conférences « A » à l'université de Mostaganem pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de faire partie du jury de cette thèse. Je vous transmets ma plus grande gratitude.

Ce travail à bénéficier du soutien de plusieurs personnes à qui je dois adresser mes remerciements les plus sincères.

Je dois beaucoup à Mr **LATRECHE A.** Professeur au département des sciences de l'environnement, faculté des sciences de la nature et de la vie, université Djillali Liabes qui avec sérieux et enthousiasme réconfortant ma beaucoup aider dans la réalisation de l'étude écologique.

Je suis profondément reconnaissant à Mme **IGHILHARIZ H.** Maitre de conférences au département de biologie de l'université d'Es-Sénia (Oran) pour la qualité de son accueil lors de mon passage dans son laboratoire de « Cytologie et infrastructures végétale », pour son aide afin d'identifier les différents tissus végétaux ainsi pour ses nombreux conseils dans l'accomplissement de l'étude anatomique.

Qu'il me soit permis d'exprimer ma profonde gratitude à Dr. **AOUED L.** Docteur à la faculté de médecine, université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de « Bactériologie », pour m'avoir guidé, conseillé et orienté dans la réalisation de la partie microbiologique.

Je tiens à remercier très chaleureusement Dr. **BOUTERFAS K.** Dr. **DIF M. M.** Melle **BENAOUM Z.** Mr. **MAKHFI N.** et tous les membres du laboratoire de recherche « biodiversité végétale : conservation et valorisation » et « Ecodéveloppement des espaces vert » qui ont contribué à la réalisation de l'étude biochimique.

Je remercie vivement Dr. **KEBIR N.** et Mr. **BELALIA A.** pour leurs Assistance morales, matérielles et techniques qui ont contribué à la finalisation de l'activité antihépatotoxique « in vivo ».

Enfin, je suis reconnaissant à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

Table des matières

Table des matières

Dédicace

Remerciement

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des planches

Liste des abréviations

Résumé

المخلص

Abstract

Page

Introduction

1

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : *Rhamnus alaternus* L. : Caractéristiques et propriétés

I. 1 Aperçut sur la famille des <i>Rhamnaceae</i>	4
I.1. 1 Généralités	4
I. 1. 2 Position des <i>Rhamnaceae</i> dans les différents systèmes de classification	5
I. 2 Aperçu sur le genre	7
I. 2. 1 Caractéristiques morphologiques et botaniques du genre <i>Rhamnus</i>	7
I. 2. 2 Les espèces du genre <i>Rhamnus</i> en Algérie	7
I. 3 Présentation de l'espèce <i>Rhamnus alaternus</i> L.	8
I. 3. 1 Description générale	8
I. 3. 2 Nomenclature	8
I. 3. 3 Écologie	8
I. 3. 4. 1 Répartition phytogéographiques du <i>Rhamnus alaternus</i> L. en Algérie	9
I. 3. 4. 2 Répartition du <i>Rhamnus alaternus</i> L. en France	10
I. 4. Les études antérieures sur l'espèce <i>Rhamnus alaternus</i> L.	11
I. 4. 1 Les flavonoïdes	11
I. 4. 2 Essais pharmacologiques	11

Chapitre II: Composés phénoliques et activités biologiques

II. 1 Généralité	14
II. 2 Principales classes des polyphénols	14
II. 2.1 les acides phénoliques simples	14
II. 2. 1. 1 Acides hydroxycinnamiques	14
II. 2. 1. 2 Acides hydroxybenzoïques	14
II. 2. 1. 3 Coumarines	14
II. 1. 1 Les flavonoïdes	16
II. 1. 1. 1 Généralités	16
II. 1. 1. 2 Structure chimique et classification	16
II. 1. 1. 3 Localisation et distribution des flavonoïdes	17
II. 1. 1. 4 Biodisponibilités des flavonoïdes	17
II. 1. 1. 5 Quelques propriétés des flavonoïdes	17
II. 1. 2 Les tanins	18
II. 1. 2. 1 Généralités	18
II. 1. 2. 2 Les tannins hydrolysables	18

Table des matières

II. 1. 2. 2 Les tannins condensés	19
II. 1. 2. 3 Propriétés pharmacologiques des tannins	19
II. 2 Activités biologiques	19
II. 2 .1 Activité antioxydant	19
II. 2. 1. 1 Définition d'un radical libre	20
II. 2. 1. 2 Les antioxydants	20
II. 2. 1. 2. 1 Les antioxydants primaires	20
II. 2. 1. 2. 2 Les antioxydants secondaires	21
II. 2. 1. 3 Mécanismes d'action des antioxydants	21
II. 2. 2 Activité antimicrobienne	22
II. 2. 2. 1 Les principales substances antimicrobiennes	22
II. 2. 2. 1. 1. Les antibiotiques	22
II. 2. 2. 1. 2 Les composés phénoliques	23
II. 2. 2. 2 Micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiens	23
II. 2. 2.2.1 Escherichia coli	23
II. 2. 2. 2. 2 Staphylococcus aureus	23
II. 2. 2. 2. 3 Pseudomonas aeruginosa	23
II. 2. 2. 2. 4 Candida albicans	23
II. 2. 2. 2. 5. Aspergillus sp	24
II. 2. 3 Notion de pathologies hépatiques	24
II. 2. 3. 1 Les causes de la pathologie hépatique	24

Partie II : Partie expérimentale

Chapitre I: Présentation de site d'étude

I. 1. Contexte local du site d'étude	27
I. 2 Pédologie	28
I. 2. 1 Caractères spécifiques des sols en montagne	28
I. 2. 2 Principaux types de sols	28
I. 3 Géomorphologie	29
I. 3. 1 Altitude	29
I. 3. 2 Expositions	30
I. 3. 3 La pente	30
I. 3. 4 Erosion et risques naturels	31
I. 4 Caractéristiques climatiques et bioclimatiques	32
I. 4. 1 Les précipitations	33
I. 4. 2 Température	34
I. 4. 3 L'humidité	35
I. 4. 4 Synthèse climatique	36
I. 5 Cadre biotique	39
I. 5. 1 Occupation des sols	39
I. 5. 2 Les incendies	41
I. 5. 3 Le surpâturage	41

Chapitre II: Matériels et biologiques et méthodes d'études

II. 1. Etude écologique	42
II. 1. 1 Equipements du terrain	42
II. 1. 2 Localisation des stations	42
II. 1. 3 Etude pédologique	42
II. 1. 3. 1 Analyses physiques	43

Table des matières

II. 1. 3. 1. 1 La couleur	43
II. 1. 3. 1. 2 la structure	43
II. 1. 3. 1. 3 Humidité (H)	43
II. 1. 3. 1. 4 Analyse granulométrique et texture	43
II. 1. 3. 2 Analyses chimiques	45
II. 1. 3. 2. 1 le potentiel hydrogène (pH)	45
II. 1. 3. 2. 2. Conductivité électrique (CE)	45
II. 1. 3. 2. 3 Calcaire total (C.T)	46
II. 1. 3. 2. 4 Calcaire actif	46
II. 1. 3. 2. 5 Matière organique	46
II. 1. 4 Etude de la composition floristique	47
II. 1. 4. 1 Méthode utilisée	47
II. 1. 4. 2 Prélèvement et collecte des espèces	48
II. 1. 4. 3 Stockage et séchage	49
II. 1. 4. 4 Identification des espèces	49
II. 1. 4. 5 Mise en herbier et archivage	49
II. 2 Etude anatomique et histologique	50
II. 2. 1 Réalisation des coupes par microtome	50
II. 2. 1.1 Fixation	50
II. 2. 1. 2 Déshydratation	50
II. 2. 1. 3 Imprégnation dans la paraffine fondue	51
II. 2. 1. 4 Inclusion des échantillons	51
II. 2. 1. 5 Confection des coupes	51
II. 2. 1. 6 Déparaffinage et réhydratation	52
II. 2. 1. 7 Coloration	52
II. 2. 1. 8 Montage et observation des coupes	53
II. 3 Etude biochimique	53
II. 3. 1 Technique d'Extraction des flavonoïdes	54
II. 3. 1. 1 Rendement des extraits en flavonoïdes	54
II. 3. 1. 2 Dosage des flavonoïdes	54
II. 3. 1. 3 Activités antioxydants : test de piégeage du radical libre DPPH	56
II. 3. 1. 4 Activités antimicrobiennes	55
II. 3. 1. 4. 1 Préparation des concentrations	56
II. 3. 1. 4. A Test antibactérien	56
II. 3. 1. 4. B. Test antifongique	56
II. 3. 1. 4. C Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques et des antifongiques	57
II. 3. 1. 4. C .1 Antibiogramme	58
II. 3. 1. 4. C. 2 Antifongigramme	59
II. 3. 1. 4. D Classement des souches testées selon leurs sensibilités aux antibiotiques, antifongiques et aux extraits	60
II. 3. 1. 4. 2 Concentration minimales inhibitrices (CMI) : technique de dilution en milieu liquide	60
II. 3. 2 Effet antihépatotoxique	61
II. 3. 2. 1. Préparation des extraits	61
II. 3. 2. 2. Test antihépatotoxique	61
II. 4 Analyse statistique	62

Table des matières

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. 1 Autoécologie de l'espèce <i>Rhamnus alaternus</i> L. au niveau du mont de Tessala	63
III. 1. 1. 1 Etude édaphique	63
III. 1. 1. 2 Analyse floristique	64
III. 1. 1. 2. 1 Caractérisation systématique	64
III. 1. 1. 2. 2 Caractéristique biologique	65
III. 1. 1. 2. 3 Caractérisation morphologique	65
III. 1. 1. 2. 4 Eléments phytochoriques	66
III. 1. 1. 2. 5 Analyse phytoécologique	66
III. 1. 2 Etude anatomique et histologique des feuilles, des tiges et des fleurs du <i>R. alaternus</i> L.	70
III. 1. 2. 1 Les feuilles	70
III. 1. 2. 2 Les tiges et les fleurs	70
III. 1. 3 Etude biochimique	74
III. 1. 3. 1. Etude biochimique d'extraits flavonoïques des feuilles de <i>R. alaternus</i> L.	74
III. 1. 3. 1. 1. Rendement des extractions	74
III. 1. 3. 1. 2. Teneur en flavonoïdes totaux des différents extraits de feuilles	74
III. 1. 3. 1. 3. Test de piégeage du radical libre DPPH	75
III. 1. 3. 1. 4. Activité antibactérienne	78
III. 1. 3. 1. 4. 1. Classement des souches microbiennes et des extraits flavonoïques des feuilles	80
III. 1. 3. 1. 4. 2. Antibiogramme et antifongogramme	82
III. 1. 3. 2 Etude biochimique d'extraits flavonoïques des écorces de <i>R. alaternus</i> L.	85
III. 1. 3. 2. 1 Rendement des extractions	85
III. 1. 3. 2. 2 Teneur en flavonoïdes totaux des différents extraits	85
III. 1. 3. 2. 3. Test de piégeage du radical libre DPPH	86
III. 1. 3. 2. 4 Activité antibactérienne	88
III. 1.4 Etude statistique	93
III. 1.4.1 Teneur en des extraits flavonoïques des deux organes (feuille et écorce) en flavonoïdes totaux	93
III. 1. 4. 2 Activité antioxydant des extraits flavonoïques des deux organes (feuille et écorce)	93
III. 4. 1. 3 Pouvoir antimicrobien des extraits flavonoïques des deux organes (feuille et écorce)	94
III. 1. 5 Essai pharmacologique antihépatotoxique	95
III. 1. 5. 1 Etude phytochimique qualitative	95
III. 1. 5. 2 Essais pharmacologiques antihépatotoxique	95
III. 1. 5. 3 Effets antihépatotoxique comparatifs	96
III. 2 Discussion	99
III. 2. 1 Etude écologique	99
III. 2. 2 Rendement et teneur des extraits flavonoïques des feuilles et des écorces	101
III. 2. 3 Activité antioxydant	102
III. 2. 4 Activité antibactérienne	104
III. 2. 5 Activité antihépatotoxique	107
Conclusion et perspectives	110
Références bibliographiques	112
Annexes	

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
Tabl. 1	Place du taxon selon APG III	7
Tabl. 2	Quelques plantes à activité hépatoprotectrice utilisées en Phytothérapie	26
Tabl. 3	Bilan des incendies dans les monts du Tessala	41
Tabl. 4	Identification de la charge en calcaire	46
Tabl. 5	Echelle de détermination de la teneur en matière organique	47
Tabl. 6	Composition (en %) des différents bains de déshydratation	51
Tabl. 7	Bains successifs de déparaffinage et de réhydratation	52
Tabl. 8	les antibiotiques commercialisés utilisés	59
Tabl. 9	Les antifongiques commercialisés utilisés	59
Tabl. 10	Classement des souches microbiennes selon leurs sensibilités	60
Tabl. 11	Résultat de l'analyse du sol	63
Tabl. 12	Relevée phytoécologique	66-67
Tabl. 13	Rendement des différentes fractions flavonoïques	74
Tabl. 14	Concentrations minimales inhibitrices 50 (CI ₅₀) des standards phénoliques et des extraits flavonoïques des feuilles de <i>R. alaternus</i> .	77
Tabl. 15	Diamètres moyens des zones d'inhibition en mm (Moyenne ± écart-type) et CMI (µg/ml) des extraits flavonoïques à partir des feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	78
Tabl. 16	Classement des extraits flavonoïques des feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L. selon leurs effets antibactérien et antifongique et des souches microbiennes selon leurs sensibilités	81
Tabl. 17	Diamètres moyens des zones d'inhibition en mm (moyenne ± écart-type) et sensibilité des souches microbiennes vis-à-vis des antibiotiques et antifongiques commercialisés	82
Tabl. 18	Rendement des différentes fractions flavonoïques	85
Tabl. 19	Concentrations minimales inhibitrices 50 (CI ₅₀) des standards phénoliques et des extraits flavonoïques des écorces de <i>R. alaternus</i> .	88
Tabl. 20	Diamètres moyens des zones d'inhibition en mm (Moyenne ± écart-type) des extraits flavonoïques à partir des écorces de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	89

Liste des tableaux

Tabl. 21	Classement des extraits flavonoïques des écorces de <i>Rhamnus alaternus</i> L. selon leurs effets antibactérien et antifongique et des souches microbiennes selon leurs sensibilités	92
Tabl. 22	Analyse de la variance à plusieurs critères de classification : Teneur de l'extrait flavonoïques des deux organes végétatifs en flavonoïdes totaux	93
Tabl. 23	Analyse de la variance à plusieurs critères de classification : effet de l'extrait flavonoïques des deux organes végétatifs sur l'activité antioxydant	94
Tabl. 24	Analyse de la variance à plusieurs critères de classification : effet de l'extrait flavonoïques, du type de la souche microbienne et l'organe végétatif sur le pouvoir antimicrobien	95
Tabl. 25	Effet des extraits lyophilisés des feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L. (Rhamnaceae) sur les paramètres biochimiques enzymatiques des groupe contrôle normal, contrôle intoxiqué et des groupes tests (intoxiqués et traités)	96
Tabl. 26	Comparaison des effets antihépatotoxique des extraits étudiés au regard du pourcentage moyen de réduction de l'hépatotoxique (CCL4 ; 0,5 ml/ kg).	97
Tabl. 27	Comparaison des différentes groupes (Normal, normale intoxiqué, groupe test) avec les différentes paramètres biochimiques (TGP/TGO, ALP, DBil) en utilisant test de Tukey	97

Liste des figures

N°	Tite	Page
Fig. 1	Répartition des <i>Rhamnaceae</i> dans le monde	4
Fig. 2	Classification selon APG III	6
Fig. 3	Différentes organe végétatifs de l'espèce <i>Rhamnus alaternus</i> L.	9
Fig. 4	Répartition de l'espèce <i>Rhamnus alaternus</i> en Algérie	10
Fig. 5	Répartition de l'espèce <i>Rhamnus alaternus</i> L. en France	11
Fig. 6	Principaux acides hydroxycinnamiques	15
Fig. 7	Principaux acides hydroxybenzoïques	15
Fig. 8	Principaux types de coumarines	15
Fig. 9	Structure chimique de base des flavonoïdes	16
Fig. 10	les systèmes de défense contre les radicaux libres	21
Fig. 11	Position géographique des monts de Tessala	27
Fig. 12	Carte des principales unités pédologiques de la commune de Tessala	29
Fig. 13	Profil topographique des monts de Tessala	30
Fig. 14	Carte des pentes de la commune de Tessala	31
Fig. 15	Variation des précipitations moyennes mensuelles	33
Fig. 16	Variation interannuelles des précipitations moyennes annuelles	34
Fig. 17	Variation des températures moyennes mensuelles minimales et maximales (1980 – 2010)	35
Fig. 18	Moyenne mensuelle du taux d'humidité relative entre 1980 – 2010	35
Fig. 19	Diagramme ombrothermique (P=2T) de la station de Tessala de la période (1913-1936)	37
Fig. 20	Diagramme Ombrothérmiqme de la station de Tessala (1980 - 2010)	37
Fig. 21	Représentation graphique du régime saisonnier	39
Fig. 22	Carte de l'occupation du sol	40
Fig. 23	Triangle de la texture selon « Department of Crop and Soil Sciences »	44

Liste des figures

Fig. 24	Echelle de salure en fonction de la conductivité	45
Fig. 25	Répartition des familles	64
Fig. 26	Distribution des types biologiques	65
Fig. 27	Distribution des types morphologiques	65
Fig. 28	Répartition des espèces par types biogéographiques	66
Fig. 29	Teneur en flavonoïdes totaux pour les cinq extraits des feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	75
Fig. 30	Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration des standards	76
Fig. 31	Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration des extraits flavonoïques des feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	76
Fig. 32	Teneur en flavonoïdes totaux pour les cinq extraits des écorces de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	86
Fig. 33	Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration des standards	87
Fig. 34	Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration des extraits flavonoïques des écorces de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	87

Liste des planches

N°	Titre	Page
Pl. I	Quelques espèces présentent au niveau du mont	69
Pl. II	Coupe transversale sériée réalisées au microtome coloré par l'hématoxyline-éosine	71
Pl. III	Coupes transversales sériées au niveau d'une tige, colorées à l'hématoxyline-éosine	72
Pl. IV	Coupes transversales sériées au niveau d'une fleur, colorées à l'hématoxyline-éosine	73
Pl. V	Effet inhibiteur de quelques extraits flavonoïques des feuilles de <i>Rhamnus alaternus</i> L. vis à vis les souches bactériennes	79
Pl. VI	Effet inhibiteur des antibiotiques et antifongiques commercialisées vis-à-vis d' <i>Aspergillus brasiliensis</i> , <i>Proteus mirabilis</i> .	84
Pl. VII	Effet inhibiteur de quelques extraits flavonoïques des écorces de <i>Rhamnus alaternus</i> L. vis à vis les souches bactériennes	90
Pl. VIII	Différentes étapes de la dissection de l'animal	98

Liste des abréviations

Abréviation

R. alaternus

E. Coli

P. mirabilis

B. cereus

C. albicans

A. brasiliensis

cm

Fig.

Tabl.

Pl.

APG

L

m

pH

%

mg/Kg

CI 50

mm

g

PS

PH

S

mg EC

Ex. Br

Ex. Hélix

Ex. Chl

Ex. Ac

Ex. Aq

DPPH

P/V

CMI

MH

OGA

DMF

ATCC

CCl4

TGO

TGP

PAL

UI/L

Signification

Rhamnus alaternus L.

Escheriachia coli

Proteus mirabilis

Bacillus cereus

Candida albicans

Aspergillus brasiliensis

Centimètre

Figure

Tableau

Planche

Angisperm Phylogeny Group

Linné

Mètre

Potentiel hydrique

Pourcentage

milligramme par kilogramme

Concentration inhibitrice 50

Millimètre

Gramme

Période sèche

Période humide

Station

milligramme équivalent
catéchique

Extrait brut

Extrait hélianique

Extrait chloroformique

Extrait acétatique

Extrait aqueux

2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

Poids par volume

Concentration minimale
inhibitrice

Muller Hinton

Oxytétracycline Glucose Agar

Diméthylformamide

American Type Culture Collection

Tétrachlorure de carbone

Glutamopyruvate Transférase

Glutamoxaloacétate Transférase

Phosphatase alcaline

Unité internationale par litre

Phyto-écologie et étude biochimique des composants phénoliques (traitement in vivo contre hépatite) de *Rhamnus alaternus* L. des monts de Tessala wilaya de Sidi-Bel Abbas.

Résumé

Les monts de Tessala constituent un remarquable site de biodiversité végétale, caractérisés par des espèces médicinales utilisés par la population locale comme agents thérapeutiques. *Rhamnus alaternus* L., objet de notre étude est parmi les plantes peuplant ces monts, c'est une hémicryptophyte vivace appartenant à la famille des *Rhamnaceae*.

Etude phytoécologique portant les caractéristique édaphiques et floristiques de la station d'échantillonnage où prospère notre espèce d'étude, a fait ressortir que cette espèce est caractéristique des garrigues.

L'anatomie et l'histologie des feuilles, des tiges et des fleurs nous ont permis d'identifier les différentes tissus formant ces organes caractérisé par la présence de grosse macles d'oxalates de calcium et un nombre important de graine d'amidon ainsi que de gaine périfasciculaire.

L'extraction des flavonoïdes et le dosage des flavonoïdes totaux montrent une variation dans leurs concentrations moyennes en fonction de l'organe végétatif utilisé. En effet, nous avons noté que les concentrations moyennes en flavonoïdes totaux sont beaucoup plus importantes dans les écorces que par celles évaluées dans les feuilles.

L'évaluation du pouvoir antibactérien et antifongique des extraits flavonoïques des feuilles et des écorces vis-à-vis des trois souches bactériennes (*Escherichia coli* ATTC 25922, *Bacillus cereus* ATTC 10876, *Proteus mirabilis* ATTC 35659) et deux souches fongiques (*Candida albicans* ATTC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATTC 16404) a révélé la présence d'un remarquable effet anti fongistatique et une activité antimicrobienne faible à modérée.

Le test de piégeage du radical libre, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyle (DPPH), montre que les activités antioxydantes des extraits flavonoïques obtenus des feuilles et des écorces de *Rhamnus alaternus* enregistrent des concentrations d'inhibitions 50 (CI₅₀) varient de 1,78 à 74, 16 mg/ml et loin à celles enregistrées par les standards phénoliques commercialisés.

L'action pharmacologique antihépatotoxique des deux extraits est exprimé par le pourcentage de réduction des marqueurs biochimiques enzymatiques notamment les transaminases (ASAT/GOT ; ALAT/GPT), la phosphatase alcaline (PAL) et la bilirubine direct (DBil) comparé à la silymarine qui est produit de référence antihépatotoxique.

Mots clés : *Rhamnus alaternus* L., Monts de Tessala, Phytoécologie, Anatomie, Antioxydant, Antibactérien, Antihépatotoxique.

البيئة النباتية ودراسة الكيمياء الحيوية للمركبات الفينولية (علاج التهاب الكبد في الجسم (*Rhamnus alaternus L.* بجبال تسالة، منطقة سيدي بلعباس.

_____:

يتميز موقع جبال تسالة بتنوعه البيولوجي النباتي وباحتوائه على نباتات طبية تستعمل من طرف السكان المحليين كوسائل للمداوات والمعالجة التقليدية. نبتة *Rhamnus alaternus L.* محل دراستنا هي من بين النباتات المتواجدة في هذه الجبال، نبات عشبي معمر، ينتمي إلى عائلة السدرينات.

دراسة البيئة النباتية بمميزاتها النباتية والترابية على مستوى المحطة الموجودة بها النبتة المراد دراستها، أبرزت أن هذه البيئة الخاصة بـ: les garrigues.

الدراسة التشريحية والنسجية للأوراق السيقان والزهور مكنتنا من التعرف على الأنسجة المختلفة التي تكون هذه الأعضاء بما فيها: نشا البذور البذور المحيطة بالحزمة.

استخلاص فلافونويدات والتقييم الكمي للفلافونويدات الكلية أظهر تواجدا متباينا من حيث التركيز المتوسط وهذا اعتمادا على العضو النباتي، لقد سجلنا ارتفاع ملحوظ للتركيز المتوسط للفلافونويدات الكلية على

تقييم النشاط المضاد للبكتيريا والفطريات للمستخلصات الفلافونويدية بالنسبة للأوراق واللحاء ضد ثلاث سلالات بكتيرية، (*Bacillus cereus* ATTC 10876)، (*Escherichia coli* ATTC 25922)،

(*Proteus mirabilis* ATTC 35659) وسلالتين فطريتين، (*Candida albicans* ATTC 10231) (*Aspergillus brasiliensis* ATTC 16404) بين بأن هذه المستخلصات تتميز بنشاط مضاد للفطريات ملحوظ مقارنة بالنشاط المضاد للبكتيريا الذي يبقى ضعيف إلى متوسط.

النشاط المضاد للجذور الأكسجينية 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyle (DPPH) بين بأن قيم التراكيز (50 %) (CI₅₀) بين بأن المستخلصات الفلافونويدية على مستوى اللحاء والأوراق تتراوح ما بين

1,87 / 4.16

بعيدة كل البعد على التراكيز المسجلة على مستوى الفينولات المسوقة.

القياسات البيولوجية الخاصة بالنشاط المضاد للتسمم الكبدي بالنسبة للمستخلصين معبرة بنسبة الخفض في العلامات الحيوية الأنزيمية المتمثلة في (ASAT/GOT, ALAT/GPT) (PAL), (DBil) بالسليمارين التي تعتبر منتج مرجعي مميز لخاصية النشاط المضاد للتسمم الكبدي.

الكلمات المفتاحية:

Rhamnus alaternus L.، جبال تسالة، البيئة النباتية، الدراسة النسجية، النشاط المضاد للبكتيريا والفطريات، النشاط المضاد للجذور الأكسجينية، النشاط المضاد للتسمم الكبدي.

Phytoecology and biochemical study of phenolic components (in vivo treatment against hepatitis) of *Rhamnus alaternus* L. in the Tessala mountains of Sidi Bel Abbas

Summary

The Tessala Mountains constitutes a remarkable site of vegetable biodiversity, characterized by medicinal species used by local population, like therapeutic agents. *Rhamnus alaternus* L., the object of our study is among plants populating this mountain, it's a vivacious hemicryptophyte that belongs to the family of *Rhamnaceae*.

The phytoecologic study carries the edaphic and floristic characteristics of the sampling station where our studied species prosper, have revealed that this specie is characteristic of scrubland.

The anatomy and histology of leaves, stems and flowers had allowed identifying the different tissues forming these organs characterized by the presence of big twins of calcium oxalate and an important number of starch seeds as well as perivascular seeds.

The extraction of flavonoids and the dosage of total flavonoids show a variation in mean concentrations in relation to the used vegetative organ.

Indeed, we have noted that the mean concentrations of total flavonoids are lot more important in barks than evaluated in leaves.

The evaluation of the antibacterial and antifungal power of flavonoidic extracts of leaves and barks towards the three strains (*Escherichia coli* ATTC 25922, *Bacillus cereus* ATTC 10876, *Proteus mirabilis* ATTC 35659) and two fungal strains (*Candida albicans* ATTC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATTC 16404) had revealed the presence of a remarkable antifungal effect and low to moderate antimicrobial activity.

The free radical scavenging test 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) shows that the antioxidant activity of flavonoidic extracts obtained from leaves and barks of *Rhamnus alaternus* L. register inhibition concentration (IC₅₀) vary from 1,78 to 74,16 mg/ml and far from registered by phenolic standards.

The antihepatotoxic pharmacological action of the two extracts is expressed by the reduction percentage of biochemical enzymatic markers notably transaminases (ASAT/GOT), the alkaline phosphatase (ALP) and direct bilirubin (DBil) compared to the silymarin that is an antihepatotoxic product of reference.

Key words: *Rhamnus alaternus* L., Mountains of Tessala, Phytoecology, Anatomy, Antioxidant, Antihepatotoxic.

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales ont été une source inépuisable de médicaments pour les tradipraticiens pour guérir certaines pathologies souvent mortelles, sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques administrés soit par friction, inhalations, cataplasmes, massages ou encore par voie orale (Lee, 2004). Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaire à la mise au point de future médicaments (Maurice, 1997). Actuellement, l'ethnopharmacologie s'emploie à recenser partout dans le monde des plantes réputées actives et dont il appartient à la recherche moderne, de préciser les propriétés et valider les usages car on estime qu'environ 80% des habitants de la planète ont recours aux médicaments traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire (Fleurentin et Pelt, 1990).

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante de molécules bioactives. Parmi les 250 000 à 300 000 espèces inventoriées de plantes qu'on trouve sur terre seulement 5% à 15% ont fait l'objet de recherche de molécules bioactives, représentant un réservoir immense de nouveaux composés médicinaux potentiels (Balandrin, 1993 ; Culter et Culter, 2000 ; Larson et *al.*, 2007) et 6% pour leurs activités biologiques (Verpoorte, 2002).

Le bassin méditerranéen est très diversifié en espèces végétale et représente un grand intérêt pour toute étude scientifique. Sa grande richesse floristique est liée à l'hétérogénéité des facteurs paléogéographiques, géologiques et écologiques (Quezel et *al.*, 1988). Sur le plan biogéographique. Les travaux récents affirment que à cette richesse floristique est associée une originalité sur le plan systématique (nombreuses plantes endémiques), sur le plan phytochimique (spécificité des substances biosynthétisées) et aussi sur le plan pharmacologique. L'Algérie occupe une situation privilège qui lui confère une flore très diversifié représenté par environ 3000 plantes vasculaires inventoriées répartie en 123 familles botaniques (Tlili-Ait Kaki et *al.*, 2013).

Pour notre part, notre choix s'est porté sur l'espèce *Rhamnus alaternus* L. qui est une espèce caractéristique de notre région (Algérie occidentale), c'est une hémicryptophyte vivace qui pousse presque dans toute la région (Quezel et Santa, 1963). Cette plante est traditionnellement utilisée dans nombreuse pays du monde. En Algérie, le fruit est utilisé comme purgatif, les feuilles sont employées également en gargarisme contre les maux de

gorge. L'écorce permet de soulager la constipation. Sur le plan chimique, les feuilles contiennent des flavonoïdes et des tanins (Marzouki et *al.*, 1990) ; trois types de flavonoïdes ont été isolés à partir des feuilles ((Bhourri et *al.*, 2011), ont lui reconnaît des propriétés antibactériennes et antioxydantes (Ammar et *al.*, 2009). Par ailleurs, en raison de sa distribution importante et sa représentation comme étant une espèce abondante et assez commune en Algérie, cette plante a été négligée par rapport aux autres plantes beaucoup moins fréquentes, ainsi donc ses effets sur les diverses pathologies nous ont poussés à valoriser cette espèce végétale et à démontrer les activités biologiques de ces principes actifs. Pour ce faire nous avons structuré notre travail comme suit :

Dans un premier temps, notre travail englobe une synthèse bibliographique portant sur deux chapitres :

Chapitre I : *Rhamnus alaternus* L. Caractéristiques et propriétés.

Dans ce chapitre on a représenté les caractéristiques (botanique, phytochimique et pharmacologique) et quelque travaux antérieurs sur l'espèce étudiée.

Chapitre II : Composés phénoliques et activités biologiques.

Le chapitre est consacré à l'étude des classes de polyphénols (flavonoïdes et tanins) du point de vue structure, classification et propriétés pharmacologiques et un rappel de quelques généralités sur les activités biologiques notamment (antioxydante, antimicrobienne et antihépatotoxique).

La partie expérimentale est subdivisée en trois chapitres.

Chapitre I : Présentation du site d'étude.

Une seule station d'échantillonnage choisie au niveau du mont de Tessala, suivie d'une étude pédologique, climatique et de formation végétale (étude phytoécologique).

Chapitre II : Matériels biologiques et méthodes d'étude.

Dans le quel nous développons les matériels et méthodes utilisées pour la réalisation des objectifs fixés, à savoir :

- Phy-écologie de l'espèce *R. alaternus* L. au niveau des monts de Tessala.
- Etude anatomique et histologique des différents organes végétatifs (feuilles, rameaux) et l'organe de reproduction (fleurs) du l'espèce *R. alaternus* du mont de Tessala.

- Extraction des flavonoïdes par des différents solvants à partir des feuilles et des écorces de la même espèce étudiée.
- Variation quantitative en flavonoïdes totaux des extraits flavonoïques dans les organes (feuilles et écorces) de *R. alaternus*.
- Le pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits flavonoïques dans les différents organes (feuilles et écorces) de *R. alaternus*.
- L'activité antihépatotoxique sera traitée à travers quelques paramètres biochimiques enzymatiques à partir des feuilles de *R. alaternus*.

Chapitre III : Résultats et discussion.

Dans ce volet, et par ordre de travail expérimental, on représente les résultats obtenus de chaque expérience et test suivies par une série de discussion et de comparaison avec des travaux similaires.

En fin une conclusion présentant une synthèse des principaux résultats obtenus.

PARTIE I :

Synthèse bibliographique

CHAPITRE I :

Rhamnus alaternus L.

Caractéristiques et propriétés

I. 1 Aperçut sur la famille des *Rhamnaceae*

I.1. 1 Généralités

La famille des *Rhamnacées* est une famille de plantes dicotylédones qui comprend selon Spichiger (2004) environ 900 espèces réparties en 55 genres. Les principaux sont : *Rhamnus* (150 ssp.), *Phytica* (150 ssp.), *Ziziphus* (100 ssp), *Gouania* (60 ssp) et *Ceanothus* (50 ssp).

Ce sont des arbres, des arbustes, souvent épineux ou lianes à vrilles, volubiles ou étayés par des branches axillaires parfois à nodules symbiotiques abritant des bractées fixatrices d'azotes. Se sont des plantes herbacées, souvent avec la fonction chlorophyllienne transférée aux tiges. C'est une famille largement répandue, quasi cosmopolite, mais particulièrement diversifiée dans les régions tropicales (Fig. 1), caractéristiques des sols calcaires (Judd et *al.*, 2002).

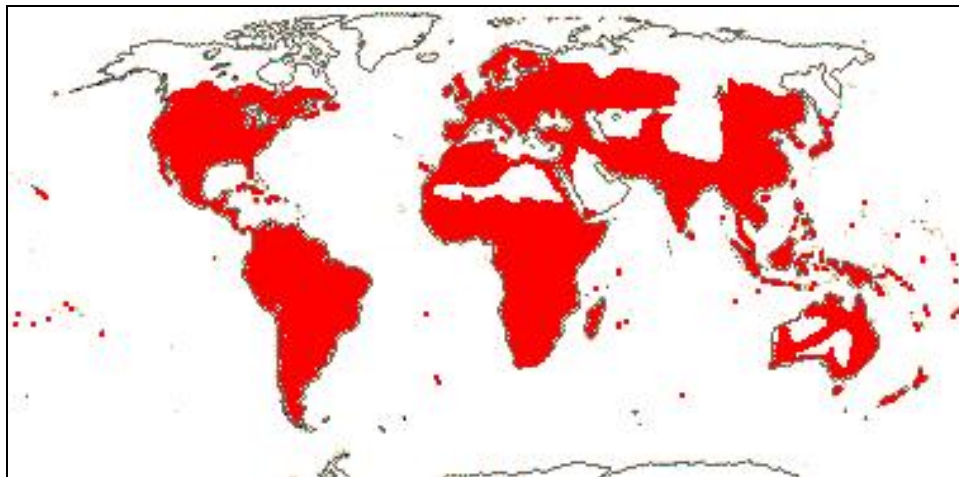


Figure 1 : Répartition des *Rhamnacées* dans le monde (Judd et *al.*, 2002)

Les *Rhamnacées* ont été étudiées morphologiquement, moléculairement et biochimiquement, cependant, les différents types de caractères ont mené à constater les descriptions systématiques suivantes (Spichiger, 2004) :

Les feuilles : alternées, distiques parfois opposées simples, limbe parfois palmatinervuré à la base ou sur toute la longueur, stipules parfois modifiées en épines.

L'inflorescence : axillaire, cyme ou panicule souvent sessile.

Les fleurs : petites, cycliques, hétérochlamyde, dialypétales, pentamères, actinomorphes, discifère, isostémone, péri-, hypo- ou épigynes, bisexués. Pétales valvaires souvent caducs et plus petits que les sépales hypanthium. Les étamines sont opposées aux pétales, anthère à déhiscence longitudinale avec le disque intrastaminale.

L'ovaire généralement pluriloculaire, style terminal, placentation axile, un ovule par loge, anatrope et bitégumenté.

Le fruit : souvent drupe ou schizocarpe caractérisé par des graines avec un grand embryon et peu d'albumen.

I. 1. 2 Position des *Rhamnaceae* dans les différents systèmes de classification

La classification classique des Angiospermes place généralement la famille des *Rhamnaceae* dans l'ordre des *Rhamnales* avec *Vitaceae* et *Leeaceae* (Engler et Prantl, 1953), ou dans *Malviflorae-Malvales* (Dahlgren, 1985), ou *Malvanae-Rhamnales* (Thorne, 1992). Selon Cronquist (1988), cette famille appartient à l'ordre des *Rosidae-Rhamnales*.

Une étude des données a appuyé l'inclusion des *Rhamnaceae* dans l'ordre des Rosales. L'ordre est fort hétérogène quant à sa morphologie, mais la réduction (ou l'absence) d'albumen pourrait être une synapomorphie de ces familles. La présence d'un hypanthium pourrait aussi être synapomorphique, cet organe se rencontre dans les *Rosaceae*, *Rhamnaceae* et *Ulmaceae* (Richardson et al., 2000).

Le monophylétisme des *Rhamnaceae* est confirmé par la morphologie et les séquences rbcL et trnL-F. La famille pourrait être étroitement apparentée aux *Rosaceae*, comme l'indique l'hypanthium bien développée, à surface interne nectarifère et les feuilles stipulées.

Chase et al., (1993), suggèrent un rapprochement étroit avec les *Urticineae* : les deux groupes frères montrent en effet une réduction du nombre (des étamines) à un verticille au moins. Les relations phylogénétiques à l'intérieur de la famille ont été étudiées par Richardson et al. (2000) ; la délimitation des genres reste souvent difficile (Judd et al., 2002).

Cependant, APG I (1998) classe les *Rhamnaceae* dans le groupe des Eurosidiées I, puis Spishier et al.,(2004) inclut cette famille en Rosidiées I qui définit des familles hypogines dialycarpyques. APG III (2009), il place la famille des *Rhamnaceae* dans le superordre des *Fabids* (Fig. 2), (Tab. 1).

Les fleurs généralement de petites tailles sont visitées par des mouches, des abeilles, des guêpes et des coléoptères, elles peuvent être allogames. Les graines de genre à fruits charnus comme *Rhamnus*, *Berchemia* et *Reynosia* sont généralement disséminées par les oiseaux et/ou les mammifères.

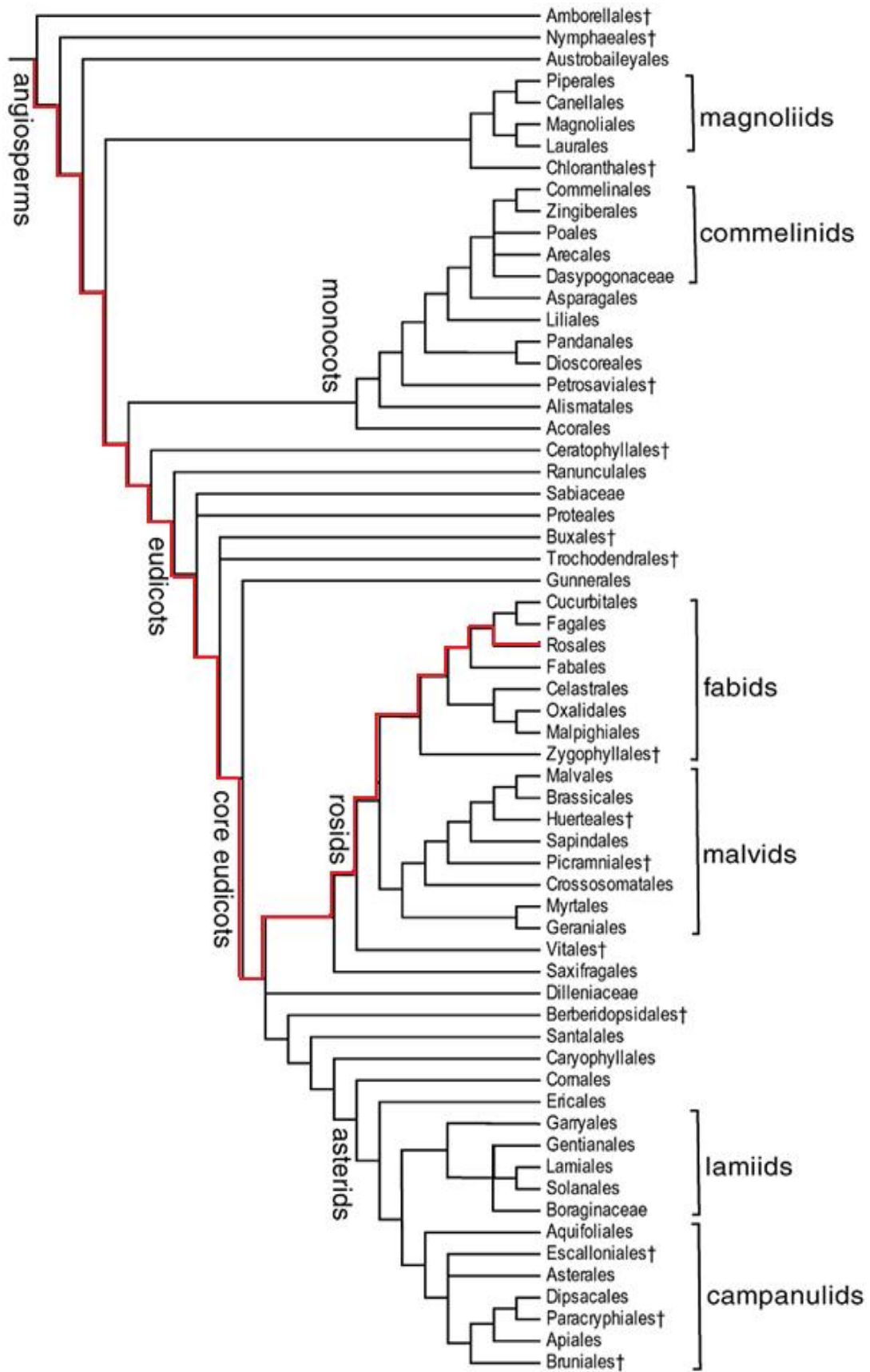


Figure 2 : Classification selon APG III (Chase et al., 2009)

Tableau 1 : Place du taxon selon APG III

Rang	Nom scientifique
Cladus	Spermatophytes
Cladus	Angiospermes
Cladus	Dicotyledones Vraies
Cladus	Dicotyledones Vraies Superieures
Cladus	Rosidees
Cladus	Fabidees
Ordre	Rosales
Famille	Rhamnaceae
Genre	Rhamnus
Espèce	<i>Rhamnus alaternus</i>
Sous-espèce	<i>Rhamnus alaternus</i> subsp. <i>alaternus</i>
Sous-espèce	<i>Rhamnus alaternus</i> subsp. <i>myrtifolia</i>

(Chase et *al.*, 2009)

I. 2 Aperçu sur le genre

I. 2. 1 Caractéristiques morphologiques et botaniques du genre *Rhamnus*

Le Neprun (*Rhamnus*) est un arbuste ou arbrisseau à stipules herbacées caduques à feuilles persistantes, luisantes en dessus, et glauques en dessous, très glabres possédant un calice à tube urcéolé avec des fleurs en général dioïques. Le fruit est du genre drupiforme à 2-4 noyaux.

I. 2. 2 Les espèces du genre *Rhamnus* en Algérie

En Algérie, 9 espèces végétales appartenant à 3 genres sont répertoriées dans diverses régions et classées selon leurs caractéristiques morphologiques. On cite à titre d'exemple :

- ❖ *R. Alaternus* L. pousse dans les forêts, rocailles - |Méd.] - « Qaced ». *ssp. eu-Alaternus* Maire CC: dans toute l'Algérie. *ssp. myrtifolia* (Willk.) Maire Rochers des montagnes - AR: K1-2, C1, AS1-2-3, O3.
- ❖ *R. lycioides* L. Forêts claires, rocailles- AC: dans toute l'Algérie, jusqu'au au S de l'Atlas saharien: *ssp. oleoides* (L) Jah. et Maire - |W. Méd.]

- ❖ *R. Frangula* L. Forêts humides RR: La Calle au lac des Sebaa - |*Eur. As.*/ - « *Ahmerai* ».
- ❖ *R. Cathartica* L. Rochers calcaires des hautes montagnes RR: KI: Djurdjura, K2: Tababort, AS3: Refaa |*Euras.*/
- ❖ *R. alpina* L. Rochers calcaires des hautes montagnes AR: KI-2, Cl, AS3 -|*Oro. W. Méd.*/ (Quezel et Santa, 1963).

I. 3 Présentation de l'espèce *Rhamnus alaternus* L.

I. 3. 1 Description générale

C'est un arbrisseau de 1 à 5 mètres ou sous-arbrisseau peu élevé, à rameaux alternes, non épineux, glabres, feuilles persistantes, très coriaces, de forme et de taille très variables (arrondies à étroitement lancéolées mesurant ordinairement entre 2 et 5 cm), bordées d'une marge cartilagineuse étroite, translucide et lâchement dentées plus au moins piquantes, parfois entières ; 4 à 6 nervures peu saillantes. Les fleurs dioïques, jaunâtres, en petites grappes multiflores bractéolées avec un calice à 5 lobes lancéolés. Le style bi-trifide et les graines à sillon dorsal ouvert. (Fig. 3) (Battandier et *al.*, 1988).

I. 3. 2 Nomenclature

En arabe : Am'lile'ce, Oud El-khir ou bien Safir. **En Kabyl** : Mélilés (Bhourri et *al.*, 2012; Debeaux, 1984). **En anglais** : Buckthorn. **En Français** : Nerprun, **En Allemand** : Kreülzdorn. **En Espagnol** : Aladierna, Cosco Unia, Sanguino de Andalucia. **En Italien** : Alaterno, Legno Puzzo (Gubb, 1913).

I. 3. 3 Écologie

Cet arbrisseau est caractéristique de la zone littorale et uni aux lentisques, à l'arbousier, au myrte et à d'autres plantes à feuilles persistantes. Il joue un rôle important dans la composition des maquis qui couvrent une bonne partie du littoral et des îles de la Méditerranée. En France, il se trouve encore dans l'Isère, l'Ardèche, l'Aveyron, le Lot, la Vienne, le Maine-et-Loire et en Bretagne (Penzig, 1902). *R. alaternus* habite les coteaux secs et calcaires du Sud de la France, de la Corse, de l'Algérie, du Nord de la Tunisie (Ben Ammar et *al.*, 2008; Chancerel, 1920). (Annexe 1). Sa fructification est en octobre à novembre.

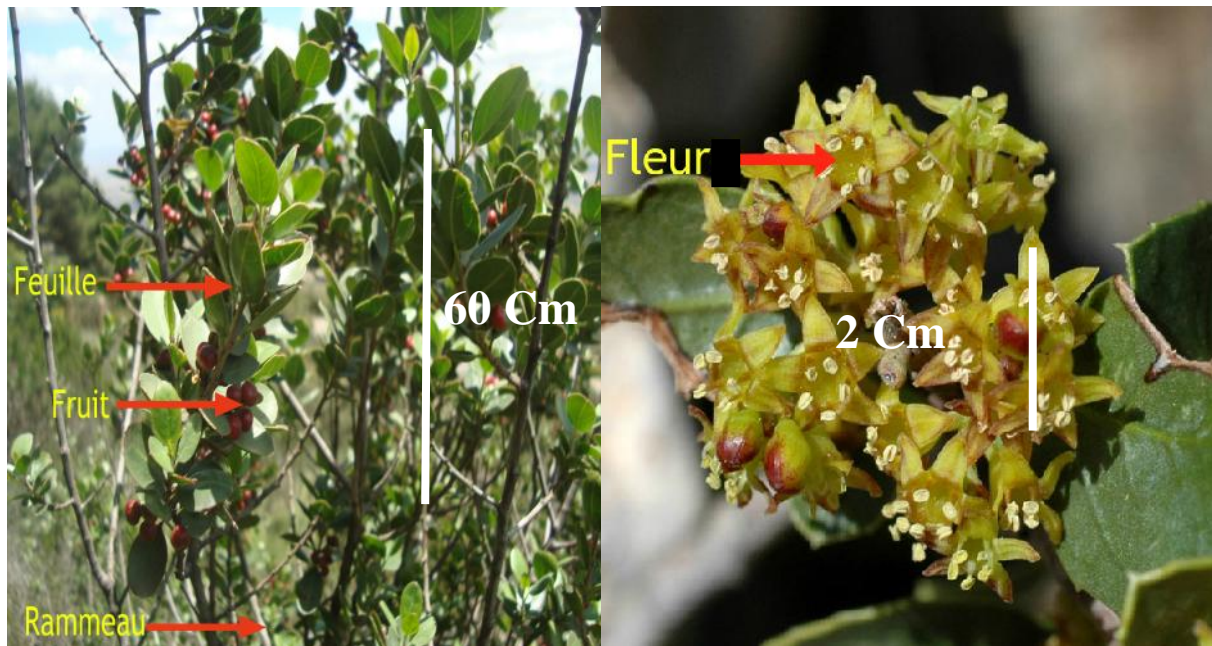


Figure 3 : Différents organes végétatifs de l'espèce *Rhamnus alaternus* L.
(Clichés, BENCHIHA 2014)

I. 3. 4. 1 Répartition phytogéographiques du *Rhamnus alaternus* L. en Algérie

L'Algérie est découpée en 1963 par Quezel et Santa en 20 divisions ou secteurs phytogéographiques, dont 15 pour l'Algérie du nord et 5 pour l'Algérie du sud (Fig. 4).

Le Nord est découpé en :

O1 : Sahels littoraux oranais ; **O2** : Plaines littorales oranaises ; **O3** : l'Atlas tellien oranais (Monts de Tlemcen) ; **A1** : littoral Algérois ; **A2** : l'Atlas tellien algérois ; **K1** : la grande Kabylie ; **K2** : la petite Kabylie ; **K3** : la Numidie ; **C1** : Tell Constantinois ; **H1** : Haut-plateaux Algérois et Oranais ; **H2** : Haut-plateaux Constantinois ; **Hd** : Hodna ; **AS1** : l'Atlas saharien Oranais ; **AS2** : l'Atlas saharien Algérois ; **AS3** : l'Atlas saharien Constantinois.

Tandis que le Sud Algérien est découpé en 5 secteurs :

SS1: Sahara Septentrional occidental ; **SS2**: Sahara Septentrional oriental ; **SO**: Sahara occidental ; **SC**: Sahara central ; **SM**: Sahara méridional.

De récents travaux réalisés par Leutrech-Belarouci *et al.*, (2009) sur la diversité floristique des subéraies du parc national de Tlemcen et ceci de l'année 2004 à 2008 ont permis de caractériser le type biologique, l'abondance et la répartition géographique des différents taxons présents dans cette zone d'étude. Parmi ces taxons notre espèce « *Rhamnus alaternus* L. »

Les résultats apportés par ces travaux montrent que notre espèce est considérée comme hémicryptophyte (type biologique) commune de l'ensemble territoire Algérien (abondance globale) et elle est présente au niveau des 15 secteurs phytogéographiques de l'Algérie du Nord, tandis qu'elle est quasiment absente au Sud de l'Algérie. Les secteurs où prospère *Rhamnus alaternus* L. sont représentés par le découpage établi par Quezel et Santa (1963)

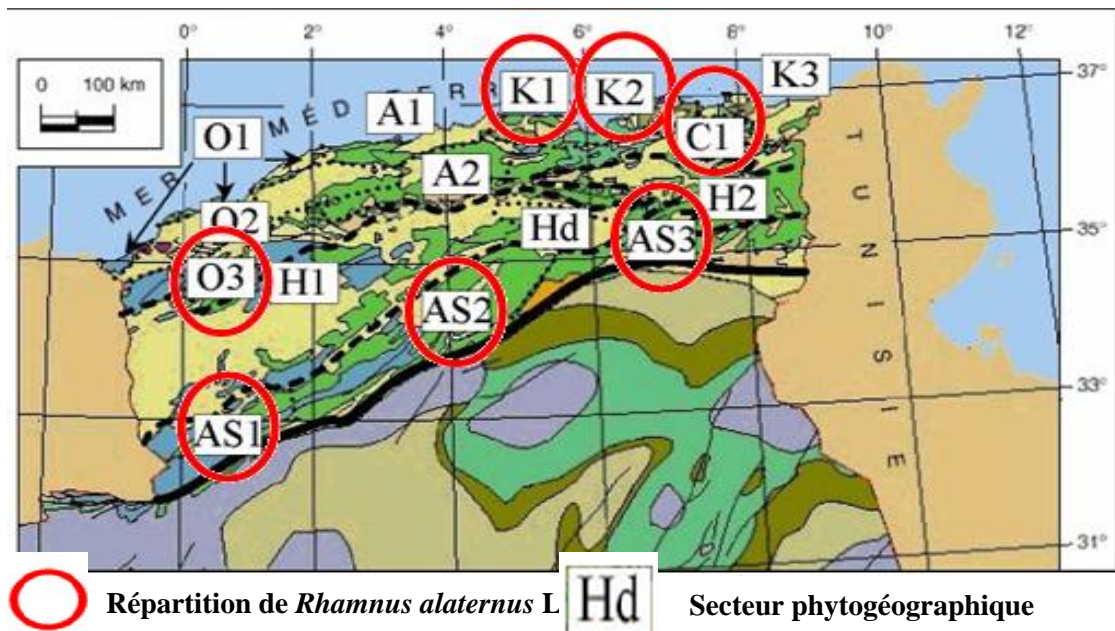


Figure 4 : Répartition de l'espèce *Rhamnus alaternus* L. en Algérie (Quézel et Santa 1963).

I. 3. 4. 2 Répartition du *Rhamnus alaternus* L. en France

Ce Nerprun, que les latins désignaient déjà par alaternus (origine inconnu), accompagne le chêne vert dans toute l'étendue de son aire française. Abondant dans l'optimum climatique de l'Yeuse, dans la région méditerranéenne proprement dite (en Corse), commun dans le Sud-Ouest, il remonte à l'est jusque dans l'Isère, à l'Ouest jusqu'en Vendée (Noirmoutier). On l'a signalé dans le Maine-et Loire (Fig. 5). Ce fort bel arbrisseau, parfois arbuste et même petit arbre de 6-8 m sur 1m et plus de circonférence, est souvent confondu avec ses compagnons toujours les chênes verts et les filaires.

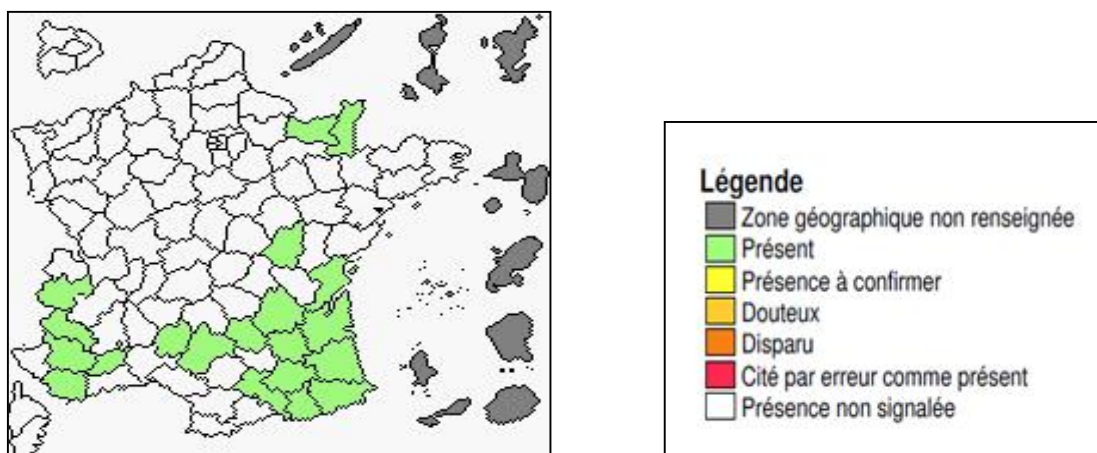


Figure 5 : Répartition de l'espèce *Rhamnus alaternus* L. en France (I.N.P.N 2010).

I. 4. Les études antérieures sur l'espèce *Rhamnus alaternus* L.

Le genre *Rhamnus* (Rhamnacée), que l'on rencontre à la fois dans les régions tempérées et dans les pays tropicaux et largement présenté dans la région méditerranéenne comprend des espèces bien connues comme des médicaments ayant des propriétés biologiques différentes (Mai et al, 2001). En général, les espèces du genre *Rhamnus* contiennent des anthraquinones telles que l'émodine (Wei et al, 1992) ou chrysophanol (Alemayu et al, 1993), tandis que d'autres contiennent des flavonoïdes et des tanins (Coskun et al., 1990 ; Lin et Wei, 1994 ; Marzouki et al., 1999).

I. 4. 1 Les flavonoïdes

Trois types de flavonoïdes ont été isolés à partir des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. dans les travaux de (Bhourri et al, 2011) et (Ammar et al, 2009) il s'agit de :

- ❖ Kaempferol 3O-isorhamminoside (K3O-ir)
- ❖ Rhamnocitrin 3O-isorhamminoside (R3O-ir)
- ❖ Rhamnetin 3O-isorhamminoside

I. 4. 2 Essais pharmacologiques

L'espèce « *Rhamnus alaternus* » se trouve en Afrique du Nord, au Moyen-Orient et au sud de l'Europe. En Algérie, elle pousse dans les garrigues et les coteaux calcaires bien ensoleillés. En Algérie, le fruit était utilisé comme purgatif. Les feuilles sont employées également en gargarisme contre les maux de gorge. L'écorce permet de soulager la constipation.

De nombreux travaux ont été effectués sur *Rhamnus alaternus* L. dans certains pays afin de connaître le pouvoir des diverses excréments de cette plante sur les microorganismes pathogènes.

Ben Ammar et *al.*, (2006) ainsi que les travaux effectués par le laboratoire Tunisien *Pharmacognosie et Biologie Moléculaire* ont porté sur la capacité des extraits des feuilles de trois espèces de *Rhamnus alaternus* L. pour évaluer les effets des gènes d'expression et de l'antigénotoxique ont été respectivement étudié sur un système d'essai bactérien, le chromotest SOS avec *Escherichia coli* PQ37 et sur les cellules lymphoblastes humaines K562.

L'analyse a révélé que les gènes SOD1, AOE 372 et TXN impliqués dans le système de défense antioxydant et les gènes XPC, LIG4, POLD2, PCNA impliqués dans le système de réparation de l'ADN ont été parmi ceux les plus exprimés en présence des extraits testés. Ces résultats étaient conformes à ceux obtenus avec les testés sur les effets antigénotoxique et antioxydant des mêmes extraits avec, respectivement le chromotest SOS et le système de dosage enzymatique xanthine oxydase/xanthine.

Une autre étude du même auteur et même laboratoire en (2008) a porté sur l'étude de l'activité antioxydante des extraits de *Rhamnus alaternus* L. par l'inhibition de l'aflatoxineB1-, nifuroxazide-, et la mutagénicité induite par l'azoture de sodium. L'effet des extraits obtenus à partir des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. sur la génotoxicité et la réponse du SOS induite par l'aflatoxine B1 ainsi que nifuroxazide était étudié dans un système d'analyse bactérien (le chromotest SOS avec *Escherichia coli* PQ37). L'évaluation des actions mutagènes et antimutagène des mêmes extraits contre la mutagénicité induite par l'azoture de sodium a été analysée en utilisant le système de dosage de *Salmonella typhimurium*.

Wissem Bhourri (2011) à étudié quant à elle l'évaluation de l'activité antioxydante et antigénotoxique de deux flavonoïdes de *Rhamnus alaternus* L.: Kaempferol3Ob-isorhamninoside et rhamnocitrin3Ob-isorhamninoside. L'activité antioxydante de ces flavonoïdes isolés à partir des feuilles de *Rhamnus alaternus* L., a été déterminée par la capacité de chaque composé à inhiber la photoréduction NBT et à piéger les radicaux libres ABTS+. De plus les activités génotoxiques et antigénotoxique ont été évalués en utilisant le chromotest SOS. Les résultats montrent que ces deux composés présentent une activité inhibitrice contre la génotoxicité induite par lanitrofurantoïne et l'aflatoxine B1 en utilisant le système d'essai bactérien chromotest SOS en présence d'*Escherichia coli* de souche PQ37.

Les flavonoïdes de *Rhamnus alaternus* L. (Kaempferol3-O-isorhamninoside et rhamnocitrin3-O-isorhamninoside) protègent contre les dommages de l'ADN dans les cellules lymphoblastoïdes humaines et améliorent l'activité antioxydant selon le même auteur. Ces deux composés ont été isolés à partir des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. Les propriétés génotoxiques et antigénotoxique de ces composés ont été étudiées par l'évaluation de l'induction et l'inhibition de la génotoxicité induite par l'action directe de mutagène le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), en utilisant le "test des comètes." K3O-ir et R3O-ir, montrant ainsi un effet préventif contre H₂O₂ provoquant les dommages de l'ADN dans les cellules humaines lymphoblastoïdes TK6. Ces deux flavonoïdes, également étudiés pour leurs capacités antioxydantes, en utilisant différents tests d'antioxydants, tels que: (Cuprac et Frap) ont révélé une activité significative dans leurs capacités à transférer des électrons.

Le fractionnement des extraits méthanoliques et les oligomères des flavonoïdes totaux à partir des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. conduit à l'isolement de trois flavonoïdes: kaempférol3-O-isorhamninoside (1), rhamnocitrin-3-O-isorhamninoside (2) et rhamnétine-3-O-isorhamninoside (3), ainsi que l'apigénine, la kaempférol et quercétine. Les structures ont été déterminées en utilisant les données obtenues à partir des spectres FAB-MS, RMN 1H et 13C, ainsi que par les différentes expériences de corrélation (COSY, HMQC et HMBC). Les activités antioxydantes des composés isolés ont été évaluées en mesurant leur capacité à piéger le radical libre DPPH et les anions superoxydes, pour inhiber le H₂O₂ provoquant la peroxydation lipidique dans les cellules humaines K562 et pour inhiber l'activité de laxanthineoxydase. Le composé 3 (rhamnétine-3-O-isorhamninoside) a une forte capacité à piéger le DPPH et les anions superoxydes et un puissant inhibiteur de H₂O₂ causant la peroxydation lipidique, tandis que le composé 1 (kaempférol3-O-isorhamninoside) a montré la meilleure activité dans l'inhibition de l'activité de la xanthine oxydase montrant des relations structure-activité.

CHAPITRE II :

Composés phénoliques et activités biologiques

II. 1 Généralité

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement.

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (Urquiaga et Leighton, 2000).

Les composés phénoliques peuvent constituer des signaux de reconnaissance entre les plantes, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel, d'un point de vue thérapeutique, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales (Macheix et *al.*, 2005).

II. 2 Principales classes des polyphénols

II. 2.1 les acides phénoliques simples

II. 2. 1. 1 Acides hydroxycinnamiques

Dérivent de l'acide cinnamique et ont une structure générale de base de type (C6-C3). Existents souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent une réactivité chimique importante de ces molécules (Fig. 6).

II. 2. 1. 2 Acides hydroxybenzoïques

Sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure générale de base de type (C6-C1). Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides. Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans la figure (7).

II. 2. 1. 3 Coumarines

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique (Fig. 8).

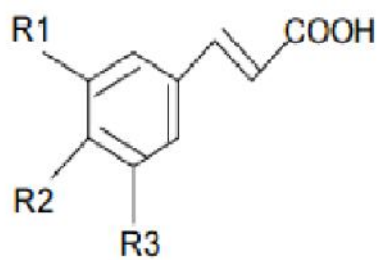
	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

Figure 6 : Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

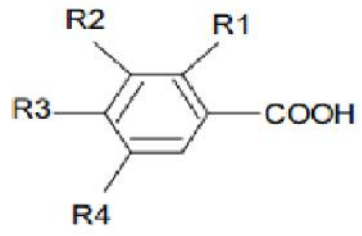
	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
OH	H	H	OH	Acide gentisique	

Figure 7 : Principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

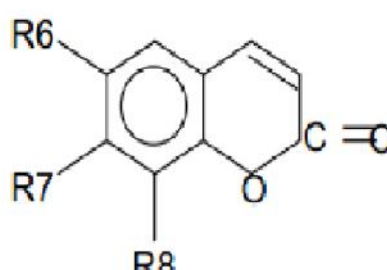
	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH3	OH	H	Scopolétol
	OCH3	OH	OH	Fraxétol
	H	OH	OH	Daphnéol

Figure 8 : Principaux types de coumarines (Macheix et al., 2005).

II. 1. 1 Les flavonoïdes

II. 1. 1. 1 Généralités

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

Les flavonoïdes ont été désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes (Nijveldt et *al.*, 2001).

Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "french paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées, Près de 4000 flavonoïdes ont été décrits (Ghedira, 2005).

II. 1. 1. 2 Structure chimique et classification

La structure de base des flavonoïdes est le noyau du flavone (2-phenyl-benzo- -pyrane) mais de point de vue classification, le groupe des flavonoïdes peut être divisé en plusieurs catégories. Cette division dépend de l'hydroxylation du noyau du flavonoïde aussi bien que du sucre lié.

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, et de ce fait, possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement phenyl-2 chromane. (Fig. 9) Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation de noyau pyranique central (Krishna et *al.*, 2001).

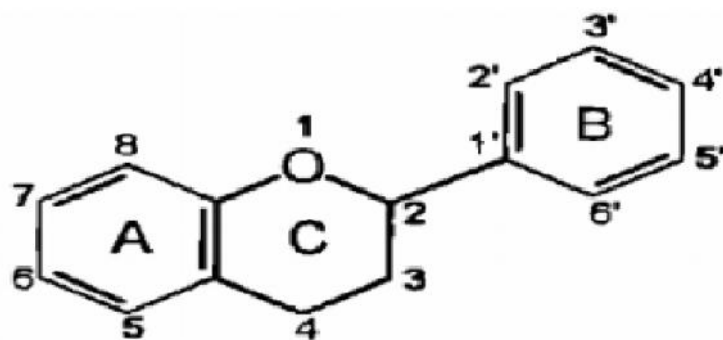


Figure 9 : Structure chimique de base des flavonoïdes (Krishna et *al.*, 2001).

II. 1. 1. 3 Localisation et distribution des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal. On signale environ 2% de la proportion du carbone photosynthétique global incorporé dans la biosynthèse flavonique. Ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs. De plus, leur localisation au sein de la plante est caractéristique. En effet, les flavonoïdes sont omniprésents dans les organes aériens jeunes où ils sont localisés dans les tissus superficiels (Remsy et *al.*, 1996).

Au niveau cellulaire, on a observé que les flavonoïdes, sous forme d'hétérosides, sont dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux. Lorsque les flavonoïdes sont présents dans la cuticule foliaire, il s'agit presque toujours de génines libres dont la lipophilie est accrue par la méthylation partielle ou totale des groupes hydroxyles (Bruneton, 1993).

En définitive, les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal. Ils sont largement abondants dans les légumes feuillés (salade, choux, épinards, etc.), ainsi que dans les téguments externes des fruits. On les trouve principalement dans les agrumes : citrons, orange, pamplemousses et dans une moindre mesure : abricots, cerises, mûres, raisins, papayes, tomates et sarrasin. On en trouve également en quantité importante dans nombreuses plantes médicinales et très spécifiquement dans les herbes aromatiques comme le thym, le persil, le romarin et le céleri (Bronner et Beecher, 1995).

II. 1. 1. 4 Biodisponibilités des flavonoïdes

Les effets des flavonoïdes sur la santé ne dépendent pas seulement de leurs niveaux de consommation mais aussi de leur biodisponibilité. Peu d'études systématiques ont été menées sur la pharmacocinétique des flavonoïdes chez l'homme. Toutefois, d'après des expériences menées sur des flavonoïdes provenant de l'alimentation, il apparaît que seuls les flavonoïdes sous forme de génines (ou aglycones) sont susceptibles d'être absorbés. L'hydrolyse des liaisons hétérosidiques (reliant la génine à la chaîne sucrée) n'intervient que dans le côlon où les micro-organismes dégradent simultanément les flavonoïdes d'origine alimentaire. Le foie est largement impliqué dans le métabolisme des flavonoïdes absorbés, Une meilleure connaissance de la biodisponibilité des flavonoïdes est indispensable pour expliquer leurs effets protecteurs sur la santé (Walle, 2004).

II. 1. 1. 5 Quelques propriétés des flavonoïdes

Les flavonoïdes protègent les plantes contre les radiations UV, elles sont également impliquées dans les processus de défense de la plante contre les infections bactériennes et

virales. Agissent comme des pigments ou des co-pigments. Peuvent moduler la distribution d'auxine, comme elles fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire. Agis sur la régulation de l'élongation des tiges et interviennent dans la maturité des fruits. Sont à l'origine des goûts amers et astringents afin de repousser les animaux herbivores (Subramanian et *al.*, 2007).

II. 1. 2 Les tanins

II. 1. 2. 1 Généralités

Les tannins sont des composés phénoliques très abondants chez les angiospermes, les gymnospermes (tannins condensés) et les dicotylédones (tannins hydrolysables). Ces composés ont la capacité de se combiner et de précipiter les protéines. Ces combinaisons varient d'une protéine à une autre selon les degrés d'affinités (Harborne, 1997).

Le terme tannin vient de la source de tannins utilisée pour le tannage des peaux d'animaux en cuir. Dans ce processus, les molécules de tannins se lient aux protéines par des liaisons résistantes aux attaques fongiques et bactériennes. Le poids moléculaire des tannins varie entre 500 et 2000 K Da (3000 pour les structures les plus complexes) (Hagerman et Butler, 1981).

Dans notre alimentation, l'astringence est la qualité organoleptique qui indique la présence des tannins. Elle a un rôle important dans le choix des aliments (corrélation inverse entre les espèces végétales choisies et leur teneur en tannins) (Larwence et *al.*, 1984).

Selon la structure, on a deux types de tannins : les tannins hydrolysables et les tannins condensés, dits aussi : proanthocyanidines.

II. 1. 2. 2 Les tannins hydrolysables

Sont formés par liaison de plusieurs acides galliques à un carbohydrate (généralement le glucose). On parle de gallotannins. Aussi des unités galloyles peuvent être ajoutées par liaisons esters, généralement en position C3 de l'acide gallique. Et les unités d'acide gallique voisines s'accouplent formant les esters d'acide hexahydroxydiphénique, dits : ellagitannins.

Ces deux groupes, les gallotannins et les ellagitannins sont appelés tannins hydrolysables. Comme leur nom l'indique, ces composés peuvent être dégradés en fragments simples (acides phénols et sucres).

L'acide gallique provient de la -oxydation des composés C6-C3, comme l'acide coumarique ou les acides oxygénés correspondants. Mais, l'acide shikimique est considéré comme le meilleur précurseur (Seigler, 1998).

II. 1. 2. 2 Les tannins condensés

Ce sont des proanthocyanidines, composés phénoliques hétérogènes : dimères, oligomères ou polymères du flavanes, flavan-3-ols, 5-flavanols, 5-deoxy-3-flavanols et flavan-3,4-diols (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Les deux groupes majeurs des proanthocyanidines sont les procyanidines et les prodelphinidines. Les monomères constitutifs des procyanidines sont la catéchine et l'épicatéchine qui peuvent être substituées par l'acide gallique ou des sucres, généralement en position 3 ou plus rarement en position 7. Ces monomères de prodelphinidines sont la gallocatéchine et l'épigallocatéchine, mais on distingue également des monomères de quercétine et de myricétine (Andersen et Markham, 2006).

En s'hydrolysant, les tannins condensés ne donnent pas de composés simples comme le glucose ou les acides phénols comme c'est le cas pour les tannins hydrolysables, mais plutôt des anthocyanidines (Andersen et Markham, 2006).

II. 1. 2. 3 Propriétés pharmacologiques des tannins

Plusieurs observations, chez les humains comme chez les animaux de laboratoires suggèrent que les tannins exhibent un large spectre de propriétés pharmaceutiques, thérapeutiques et chimioprotectrices dues à leur propriété antiradicalaire (Tohge et *al.*, 2005).

En effet, les tannins protègent contre les toxicités induites par différents agents (hydrogène peroxyde, acétaminophène, extraits contenus dans la fumée du tabac...), contre l'hypercholestérolémie et les changements de la formule sanguine (ALT, BUN et CK). Ils jouent aussi un rôle dans la prévention contre les deux formes de mort cellulaire connues, apoptose et nécrose, diminuant ainsi les dommages causés dans l'ADN lors de ces deux dernières. L'action cytoprotectrice des proanthocyanidines est supérieure à celle des vitamines C, B et bêta-carotène (Ray et *al.*, 2000).

II. 2 Activités biologiques

II. 2.1 Activité antioxydant

De nos jours, il existe un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques

associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire (Guinebert et *al.*, 2005).

II. 2. 1. 1 Définition d'un radical libre

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique (Dacosta, 2003).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux libres primaires, qui dérivent directement de l'oxygène. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires (radical peroxyde ROO•, radical alkoxyde RO•), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Novelli, 1997).

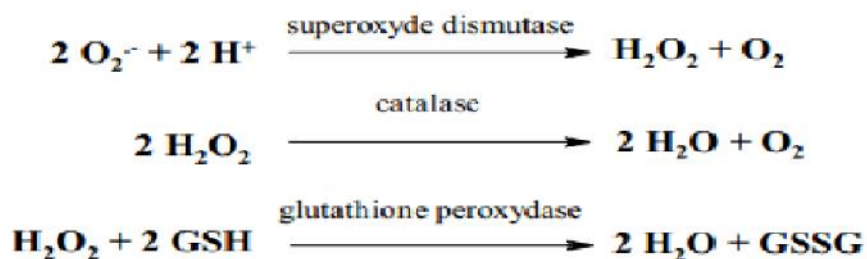
L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (ROS). Cette appellation n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde O₂•⁻, radical hydroxyl OH•, monoxyde d'azote NO•, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singulet ¹O₂, peroxyde d'hydrogène H₂O₂, peroxydinitrite ONOO⁻ (Favier, 2003).

II. 2. 1. 2 Les antioxydants

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS. Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (Favier, 2003).

II. 2. 1. 2. 1 Les antioxydants primaires

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydants qui sont des systèmes de défense très efficaces. Cette ligne de défense est constituée de superoxyde dismutase (SOD), de catalase et de peroxydase (glutathion et ascorbate) (Favier, 2006). Ces enzymes antioxydants permettent l'élimination des radicaux libres primaires, selon les réactions suivantes :



De ce fait elles préviennent la formation de radicaux libres organiques à partir des lipides membranaires notamment et contribuent donc à la protection des membranes de la peroxydation lipidique (Dacosta, 2003).

II. 2. 1. 2. 2 Les antioxydants secondaires

Ce sont des molécules exogènes. Contrairement aux enzymes antioxydantes, une molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée par d'autres systèmes (Fig. 10) (Dacosta, 2003).

Plusieurs substances pouvant agir en tant qu'antioxydants in vivo ont été proposés. Elles incluent : la vitamine E, l'acide ascorbique, le β -carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques,...etc. (Kohen et Nyska, 2002)

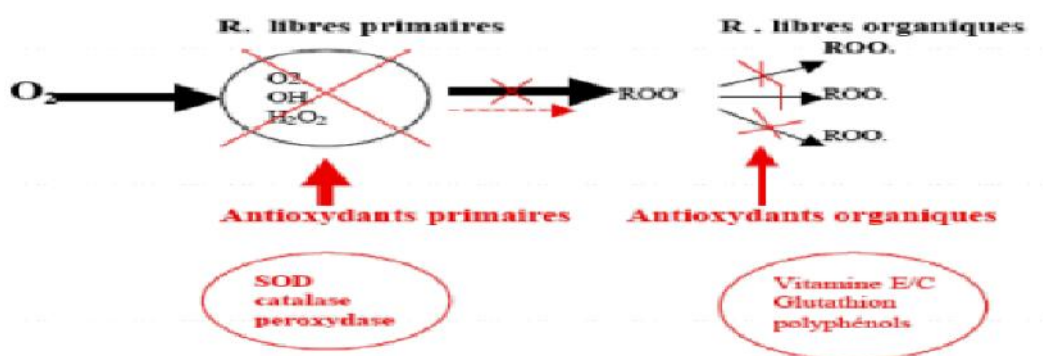


Figure 10 : les systèmes de défense contre les radicaux libres (Kohen et Nyska, 2002).

II. 2. 1. 3 Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (Favier, 2006).

II. 2. 2 Activité antimicrobienne

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux. Pour résister à ces micro-organismes 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 (Kaufmann, 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 multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (Billing et Sherman, 1998).

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrolases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhesines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

II. 2. 2. 1 Les principales substances antimicrobiennes

II. 2. 2. 1. 1. Les antibiotiques

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques (Bergogne-Berezin et Dellamonica, 1995).

II. 2. 2. 1. 2 Les composés phénoliques

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobienne des polyphénols. A l'heure actuelle, cet effet est certain et démontré par de nombreuses recherches expérimentales. Les études du pouvoir inhibiteur des flavonoïdes sur la croissance bactérienne ont démontré que de nombreux composés flavonoïques (apigénine, kaempferol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif (*Escherichia coli*) et Gram positif (*Staphylococcus aureus*) (Ulanowska et al., 2007).

Des flavonoïdes, une flavone et une flavanone, respectivement isolés des fruits de *Terminalia bellerica* et de l'arbuste *Eysenhardtia texana* ont été montré comme possédant l'activité contre le microbe pathogène opportuniste *Candida albicans* (Wächter et al., 1999). Deux autres flavones isolés de la plante *Artemisia giraldi* ont été rapportés exhiber une activité contre l'espèce *Aspergillus flavus* une espèce de mycète qui cause la maladie envahissante chez les patients immunosuppresseurs (Valsaraj et al., 1997).

II. 2. 2. 2 Micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiens

II. 2. 2.2.1 *Escherichia coli*

C'est une bactérie à Gram négatif, commensal du tube digestif de l'homme et de l'animal, (Kaper et al., 2004), de forme non sporulée, de type aérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm, *E. coli* représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës d'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été, diarrhée infantile et les intoxications alimentaires (Percival, 2004).

II. 2. 2. 2. 2 *Staphylococcus aureus*

Ce sont des cocci Gram positif avec un diamètre de 0,5 à 1,5 µm, de forme non sporulée, qui tendent à se grouper en paires, petites chaînes, elles sont habituellement non capsulée, ou possédant des capsules limitées, elles sont anaérobies facultatives. *Staphylococcus aureus* représente l'agent commun des infections postopératoires de blessures, endocardite aiguë, intoxication alimentaire (Dworkin et Falkow, 2006).

II. 2. 2. 2. 3 *Pseudomonas aeruginosa*

Ce sont des bacilles Gram négatif, de forme non sporulée, elles sont aérobies, mobiles grâce à la présence de 1 à 2 flagelles, ce type de bactérie synthétise de types principaux de pigments pyocyanine : bleue phénazine, pyoverdine: jaune vert, il s'agit de bactéries résistantes pour plusieurs antibiotiques (Percival, 2004). *Pseudomonas aeruginosa* est responsable de 16% des cas de pneumonie nosocomiale, 12% des infections urinaires, 8 % des infections suites aux blessures chirurgicales (Van Delden et Iglewski, 1998).

II. 2. 2. 2. 4 *Candida albicans*

Actuellement, le genre *Candida* comprend 81 espèces de champignons levuriformes. *Candida albicans* est la plus souvent à l'origine de la plupart des manifestations pathologiques chez l'homme. On la rencontre habituellement, à l'état saprophytique, dans le tube digestif de l'homme et, par contiguïté, elle peut être retrouvée au niveau de la muqueuse vulvo- vaginal,

(ou de la bouche). Mais on ne retrouve qu'exceptionnellement *Candida albicans* au niveau de la peau. Cette espèce est responsable de plus de 80 % des infections connues sous le terme de candidose, comme les infections superficielles cutanées, infections superficielles muco-cutanées (Delorme et Robert, 1997).

II. 2. 2. 2. 5. *Aspergillus sp*

Aspergillus sp. sont les espèces fongiques les plus communes qui sont capables de produire des mycotoxines dans les produits alimentaires. Les mycotoxines sont connues pour être une cause puissante capable de produire un cancer hépatique chez les animaux et les humains. La présence et la croissance des champignons peuvent entraîner la détérioration et la réduction de la qualité et la quantité des aliments (Rasooli et Abyaneh, 2004).

Dans différentes parties du monde, il y a une inquiétude croissante au sujet de la contamination des aliments, l'exposition environnementale et professionnelle aux spores fongiques de différentes espèces, en particulier à l'aflatoxine produit par ces espèces fongiques comme le cas d'*A. flavus* et *A. niger* (Takahashi et al., 2004) ; qui sont des *ascomycète* filamenteux qui ont une distribution ubiquitaire dans l'environnement. Ils sont connus par ses implications dans les infections opportunistes humaines. Le mode de la transmission principal aux humains est par l'inhalation des conidies (Desai et Ghosh, 2003). En plus de l'inhalation, une voie secondaire de transmission a été rapportée soit par contact avec la peau ou à travers une blessure (Krishnan et al., 2009).

II. 2. 3 Notion de pathologies hépatiques

II. 2. 3. 1 Les causes de la pathologie hépatique

Les causes sont multiples. Elles peuvent être virales, bactériennes, vasculaires, toxiques, médicamenteuses, auto-immunes c'est à dire la cellule hépatique (l'hépatocyte) est détruite par les anticorps de l'organisme lui-même (Tab. 2).

- **Les hépatites virales :**

Ce sont des infections de l'organisme, par les virus qui ont la particularité de toucher plus particulièrement le foie et détruisant les hépatocytes. Nous décrivons le plus souvent les hépatites A, B, C, D, E et G. Ces hépatites sont plus ou moins aiguës et graves, celles posant statistiquement le plus de problèmes étant les hépatites B et C. La plus connue est celle de A, elle passe le plus souvent inaperçue, ce virus se trouve essentiellement dans les aliments souillés. Plus l'alimentation est « stérilisée », moins cette affection est constatée.

- **Les hépatites bactériennes :**

Pratiquement toutes les affections bactériennes peuvent donner des hépatites (tuberculose, syphilis, brucellose, légionellose, staphylococcies, affection à clostridium...). Ces hépatites font rarement le pronostic (grave ou bénin) de la maladie, hormis pour la leptospirose.

- **Les hépatites vasculaires :**

Elles correspondent soit à des infarctus du foie, soit à des stases veineuses, c'est à dire des blocages de la circulation en aval du foie. Cela peut engendrer à une insuffisance cardiaque, une thrombose portale (obstruction par un caillot de la veine qui va du foie au cœur) ou une compression de cette veine avec blocage du flux sanguin dans le foie.

- **Les hépatites toxiques :**

Elles peuvent être liées à des empoisonnements. Le plus connu est celui par l'amanite phalloïde. La plus fréquente est l'intoxication alcoolique. Les solvants sont aussi en cause (tétrachlorure d'éthylène, tétrachlorure de carbone, chloroforme...). Le phosphore et le chlorure de vinyle sont également dangereux.

- **Les hépatites médicamenteuses :**

Elles s'apparentent aux hépatites toxiques. Beaucoup de médicaments peuvent induire des hépatites en cas de surdosage, c'est le cas du paracétamol. Les chimiothérapies anticancéreuses induisent régulièrement des hépatites passagères et réversibles. (Toukara, 2006).

Tableau 2 : Quelques plantes à activité hépatoprotectrice utilisées en Phytothérapie (Valnet, 2001).

Familles, Genres et Espèces	Noms en Français	Parties utilisées	Indications	Propriétés
<i>Silybum marianum</i> L.	Chardon marie	Feuilles	Hépatique	Diurétique
			Cancer	Dépuratif
			ictère	Anticancéreux
			Cirrhose	Cholérétiques
			Affections hépatiques	Anti-inflammatoire
			Affections vasculaires	
			Lithiases biliaires	
<i>Convolvulus sepium</i> L.	Liseron	Feuilles	Insuffisance hépatiques	Purgatif
		Racines	Cirrhose	
		Résines		
<i>Fumaria officinalis</i> L.	Fumeterre	plante entière	Congestion hépatique	Digestif
			Faiblesse	Tonique
			Anémie	Régulateur
			Paresse digestive	
<i>Triticum repens</i> L.	Chiendent	Rhizome	Lithiase biliaire	Emollient
			Lithiase urinaire	Diurétique
			Hépatisme	Dépuratif
<i>Marrubium vulgare</i> L.	Marrube blanc	Feuilles	Digestion	Antitoxique
			Insuffisance biliaire	Dépuratif
			Insuffisance rénale	Déchlorurant
			Cholestérol	Uricolytique
<i>Rhamnus frangula</i> L.	Bourdaïne	Ecore	Insuffisance biliaire	Laxatif
			Constipation	Cicatrisant

Il ressort de ce tableau que la prise en charge des affections hépatiques fait intervenir une large gamme de classe thérapeutique.

PARTIE II :

Partie expérimentale

CHAPITRE I :

Présentation du site d'étude

I. 1. Contexte local du site d'étude

Les Monts de Tessala sont une des chaînes importantes de l'Atlas tellien d'Algérie au Sud et au Sud-ouest d'Oran. Allongés sur une centaine de kilomètres du sud-ouest vers le nord-est, ils se dressent au-dessus des collines d'Ain Temouchent et de la plaine de la Sebkhha d'Oran (la Mléta) au Nord, le cours du bas Isser et la plaine de Sidi-bel-Abbès au Sud. Ils donnent des reliefs assez modestes, de 500 à 1000 mètres d'altitude, où les formes molles et aplanies de la plupart des sommets et des croupes contrastent avec la jeunesse de certaines vallées et les éboulements et les ravinements de certains versants. C'est à l'Est du djebel Tessala, le point culminant (1061 m) que la chaîne présente l'aspect le plus montagneux (Fig. 11). La structure plissée ne semble guère révélée que par la direction d'ensemble du massif et celle des principales lignes de faîte. (Pouquet, 1952).

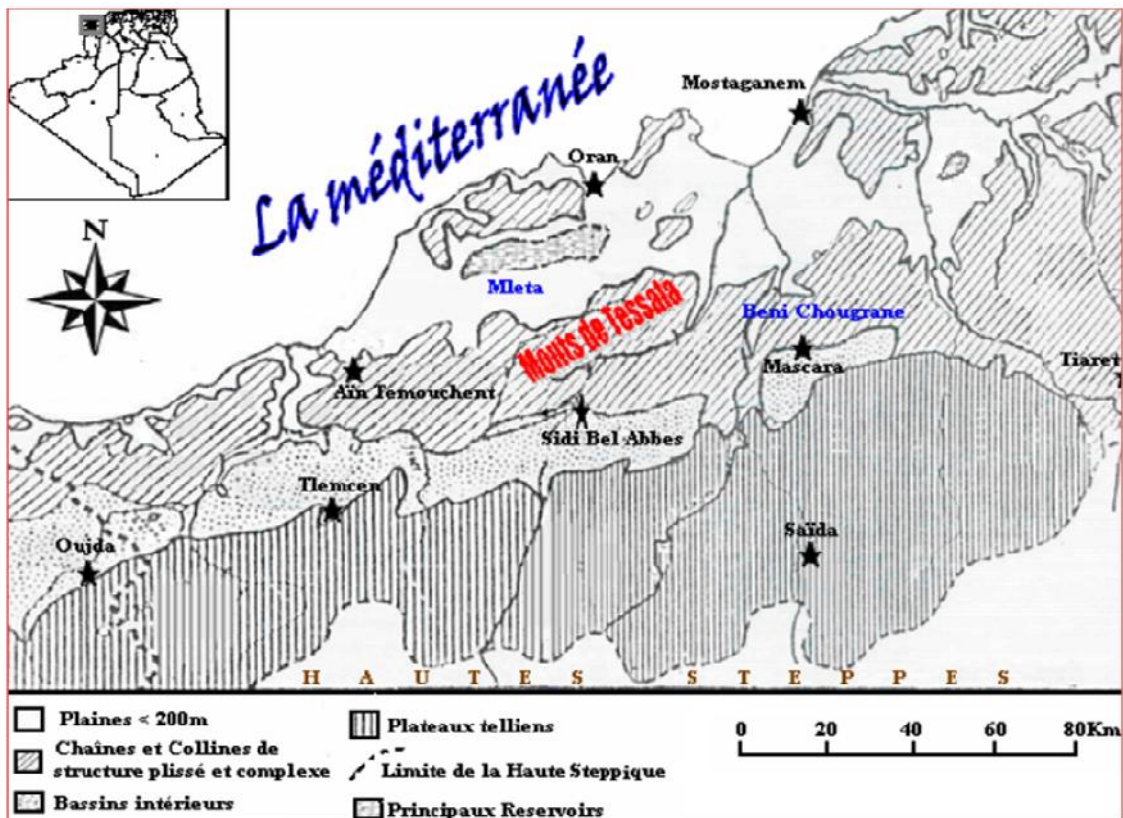


Figure 11 : Position géographique des monts de Tessala (in Charif, 2001).

I. 2 Pédologie

I. 2. 1 Caractères spécifiques des sols en montagne

Les différents types de sols qui constituent les zones de montagnes sont des sols pauvres à affleurement rocheux, de profondeur faible, leur texture est fine. Par ailleurs, les lithosols et les rigosols se localisent sur les versants pointus. Selon Pouquet (1952), les différents types de sols dans la zone d'étude sont :

- **les sols à sesquioxydes de fer** : ce sont des sols rouges ou bruns rouges, leur texture est en générale équilibrée et leur structure grumeleuse ; ce sont des sols qui sont peu affectés par l'érosion et essentiellement touchés par le décapage,
- **les sols bruns calcaires** : leur profondeur est inférieure à 50 cm, de texture lourde et à structure polyédrique fine. L'horizon superficiel de ces sols est très lessivées ; les pierres de surface y sont nombreuses mais constituent essentiellement des débris de croûtes,
- **les vertisols** : ce sont des sols à couleur noirâtre ou brun foncé, leur texture limono argileuse est de structure généralement grumeleuse, leur profondeur varie entre 30 et 50 cm ; parfois ils dépassent les 50 cm quand ils sont localisés au bas des versants.

I. 2. 2 Principaux types de sols

Dans la commune de Tessala les sols revêtent un caractère important puisque la zone est de prévalence agricole. (Fig. 12). On y trouve selon Kiekken (1962) :

- **Les hauts versants** : on trouve les lithosols et les régosols et quelques rendzines. Les sols bruns sont peu représentés ainsi que les sols minéraux bruts dans les zones les plus touchées par l'érosion.
- **Les versants médians** : présence de relief élevé, avec une texture très argileuse et une roche mère marno-calcaire.
- **Les bas versants et les collines** : les sols calcaires dominent en parallèle avec les sols bruns rouges et se localisent surtout dans les collines ou dans la plaine et remontent en quelques endroits jusqu'au sommet des monts de Tessala.

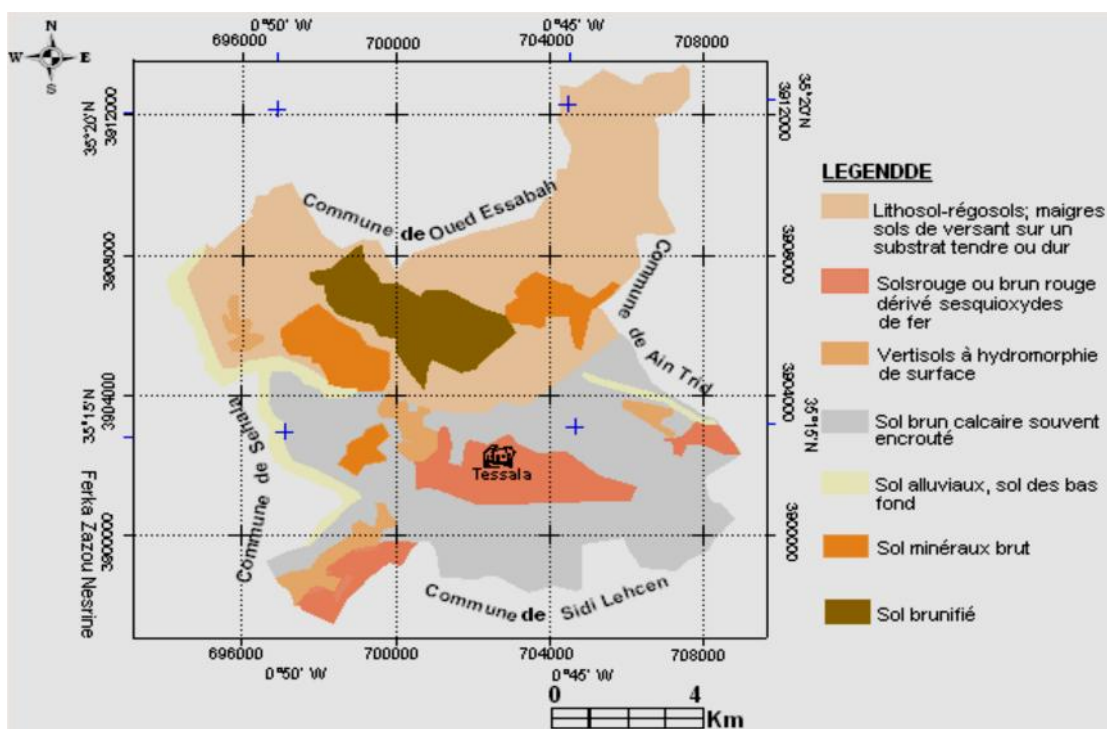


Figure 12 : Carte des principales unités pédologiques de la commune de Tessala (Ferka Zazou, 2006)

I. 3 Géomorphologie

La géomorphologie est l'un des éléments les plus précieux de l'analyse cartographique dans les études de reconnaissance (Tricart, 1978). C'est la science qui a pour objet la description et l'explication du relief terrestre, continental et sous-marin (Coque, 1977).

Selon Cornet (2002) les formes du relief ne sont jamais figées. Trois facteurs régissent et façonnent le relief : la tectonique, l'érosion et la lithologie. Il explique aussi que ces formes évoluent souvent de manière imperceptible (surrection, subsidence, certaines formes d'érosions), mais parfois aussi brutalement (séismes générant des escarpements de faille, certains processus d'érosion comme les glissements de terrains).

I. 3. 1 Altitude

La commune de Tessala est constituée d'unités topographiques hétérogènes. Les côtes varient selon que l'on est en plaine, en piémont ou en montagne. L'altitude progresse, elle varie entre 500 et 1060 m imposant un relief relativement accidenté (Fig. 13). Les monts de Tessala faisant partie de l'Atlas Tellien s'étirent du sud – ouest au nord – est sur 50 – 60 km (Becagrom, 2008).

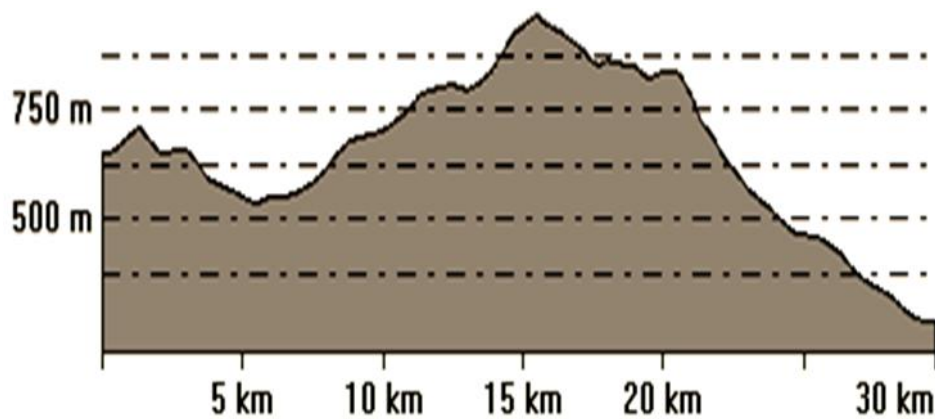


Figure 13 : Profil topographique des monts de Tessala.

I. 3. 2 Expositions

Conjuguée à une altitude importante du point de vue impact sur les précipitations et la brise marine, l'exposition a un effet sur les conditions écologiques de la commune de Tessala. Le versant sud souffre d'une sécheresse prolongée (dépassant les 6 mois) et de sols relativement dégradés où dominent les argiles. Le versant nord bénéficie de conditions climatiques et édaphiques plus clémentes, une brise marine avec ses effets adoucissants en été, une faible évaporation, des sols relativement équilibrés et une pluviométrie intéressante (Ferka Zazou, 2006).

I. 3. 3 La pente

La morphologie des pentes est en fonction de la structure asymétrique des monts de Tessala. La pente au sud se caractérise par un relief doux avec les oueds et les ravins plus profonds et les lignes de crêtes. Tous ces oueds sont saisonniers. Par contre, vers le Nord, elle se caractérise par des vallées profondes, étroites et des oueds permanents ainsi que des entailles nettement visibles dans les ravins (Pouquet, 1952).

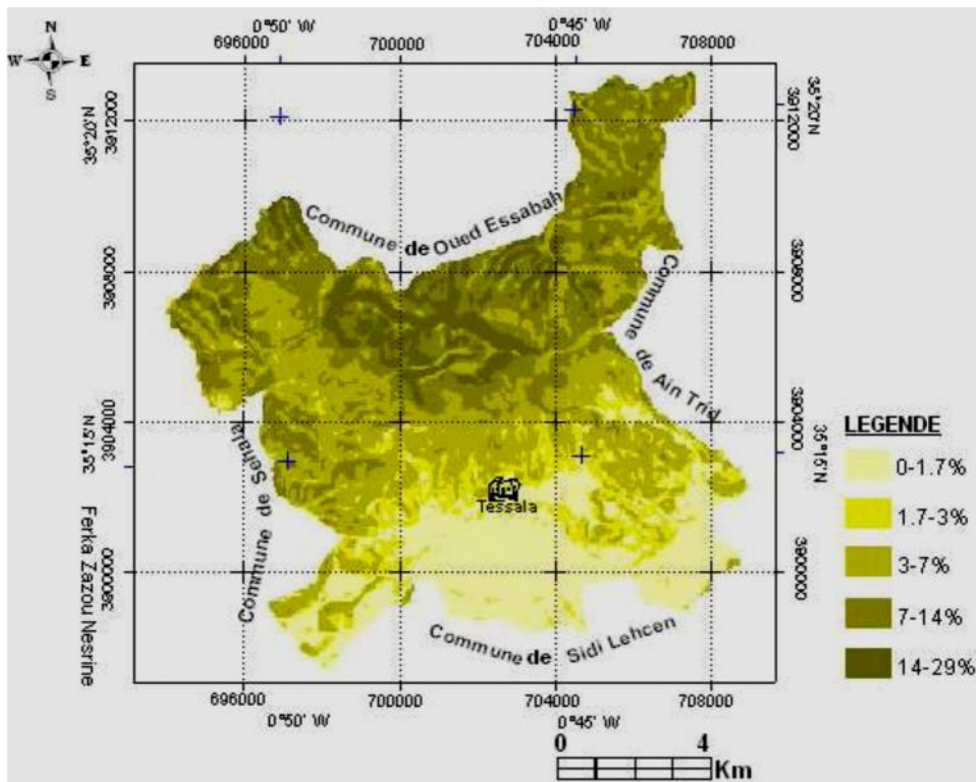


Figure 14 : Carte des pentes de la commune de Tessala (Ferka Zazou, 2006).

Selon Ferka Zazou (2006), il existe cinq (5) classes de pentes qui peuvent renseigner sur la déclivité de la zone. On distingue : la zone de montagne, la zone de piémonts et la zone de plaine.

- La classe 0-1.7% représente les pentes nulles à faibles, il s'agit de terrains situés sur les plaines, les zones d'épandages (oueds). Cette classe de pente est importante en surface.
- La classe 1.7-3% : pente faible, assez modérée. Ce sont en générale les pentes de plaine et de bas piémonts.
- La classe 3-7% : pente assez forte, sur collines et piémonts de montagnes.
- La classe 7-14% : forte pente, assez bien représentée dans la zone d'étude. Il s'agit de pente sur djebels et de zones accidentées.
- La classe 14-29% : pentes abruptes, raides, peu représentées situées surtout sur les sommets de montagne (Fig. 14).

I. 3. 4 Erosion et risques naturels

En Algérie, le phénomène d'érosion a été pleinement étudié par (Saccardyl, 1949; Putod, 1962; Greco, 1966; Roose et *al.*, 1998).

Dans la commune de Tessala, les types d'érosion qui prédominent sont : l'érosion en nappe, l'érosion en griffe et le ravinement.

Cependant, d'après Charif (2001), il a été possible de classer les différentes catégories de sensibilité à l'érosion à base de quatre critères distincts : la pente, le substrat, le couvert végétal et l'action anthropique.

En effet, environ 80% des surfaces sont soumises à une érosion intense. Ces caractéristiques peuvent aussi constituer un risque de glissement de terrains ou d'effondrement et de chutes de rochers (PDAU, 2005).

I. 4 Caractéristiques climatiques et bioclimatiques

On sait au moins depuis Humboldt (1807) que le climat joue un rôle essentiel dans les déterminismes de la répartition des plantes. Emberger (1930, 1971) a particulièrement souligné ce rôle en ce qui concerne la végétation méditerranéenne.

La pluie et la température sont la charnière du climat (Bary-Lengeretal., 1979). Selon Halimi (1980), la connaissance des végétaux dépend de deux facteurs essentiels : l'intensité et la durée du froid (dormance hivernale) et la durée de la sécheresse estivale.

D'après les services de l'ONM de la wilaya de Sidi Bel Abbes, le climat est sec et froid en hiver où les températures minimales atteignent parfois $-7,8^{\circ}\text{C}$ (température record). La région est sous gelée le mois d'octobre, novembre, décembre, janvier et février.

Les précipitations sont faibles et irrégulières, parfois des périodes pluvieuses telles que celles de 2008 où on a enregistré 421,5 mm. Le climat est dur en été avec des températures atteignant 47°C en juillet et août. Les journées d'été sont chaudes et sèches (température $> 40^{\circ}\text{C}$, humidité $< 30\%$).

Les vents soufflent le plus souvent de direction Nord Nord – ouest à Sud Sud – ouest et à vitesse de 2 à 4 m/s mais atteignant parfois 120 à 150 km/h causant ainsi des dégâts non négligeables. Ces dernières années, on a constaté un réchauffement où la température a augmenté de 2°C (réchauffement climatique constaté à travers la planète).

Compte tenu des données disponibles nous analyserons les caractéristiques des principales variables climatiques (précipitation, températures) sur une période allant de 1980 jusqu'à 2010.

I. 4. 1 Les précipitations

Les précipitations se distinguent dans la zone par leur hétérogénéité et leurs fluctuations selon les années. Après la période sèche (été), les pluies d'automne sont soudaines et violentes surtout en altitude. Une diminution des pluies est perceptible d'ouest en est (Ferka Zazou, 2006).

La courbe ci-dessous illustre la pluviométrie moyenne mensuelle selon les travaux de Seltzer (1946) sur une période de 25 ans (1913 – 1938), à une altitude de 585m. Ainsi que les données de l'ONM (2011), sur une période de 31 ans (1980 – 2010). Disposant de ces données anciennes et récentes, il est important voir même intéressant de les comparer.

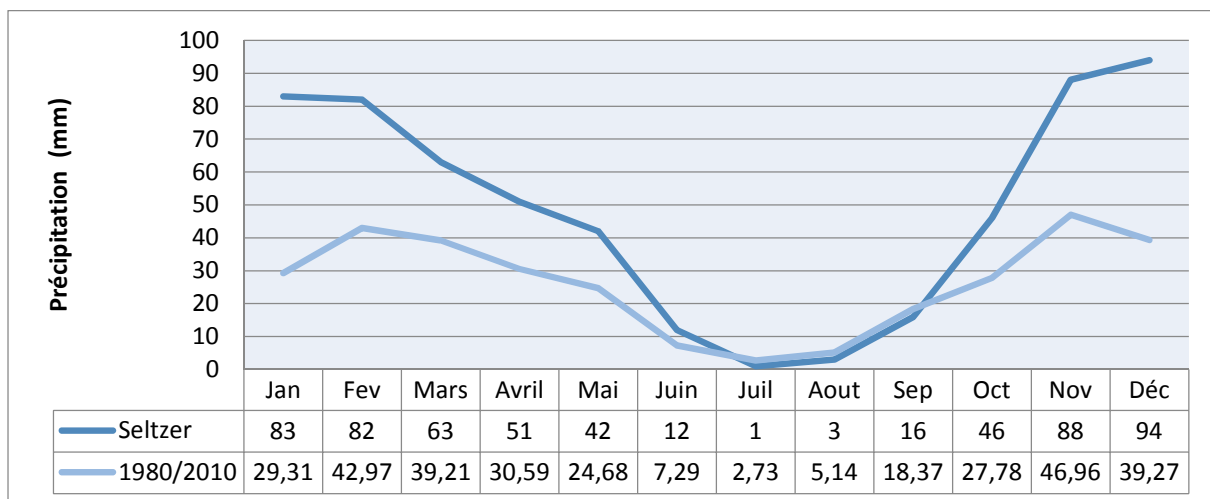


Figure 15 : Variation des précipitations moyennes mensuelles.

La comparaison montre une nette différence ; selon Seltzer sur 25 ans un total de précipitations moyennes mensuelles est de 581mm, en revanche, entre 1980 – 2010 l'intensité des pluviométries ont clairement baissée en enregistrant seulement 314,3mm.

Les deux courbes prennent une allure semblable, mais les quantités enregistrées entre 1980 – 2010 s'avèrent beaucoup plus réduites que celle de Seltzer. Elles révèlent en effet un maximum en Février et Novembre (42,97mm - 46,96mm). Le minimum correspond aux mois de Juillet et Août avec des moyennes mensuelles respectives de 2,73 et 5,14mm.

La hauteur moyenne des pluies est relativement assez faible dans notre zone d'étude, elle n'excède qu'exceptionnellement les 400 mm par an. Ainsi sur une période de 31 ans, seuls

sept ans ont enregistré un cumul dépassant les 400 mm. Les calculs révèlent que la moyenne interannuelle des pluies entre 1980 – 2010 est de 323,74 (Fig. 16).

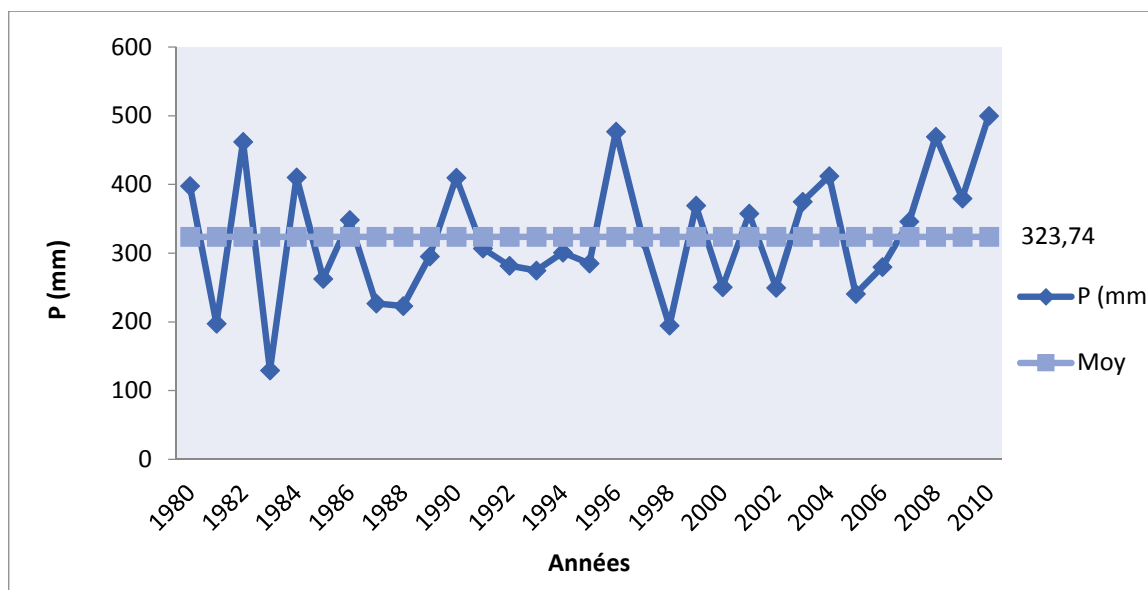


Figure 16 : Variation interannuelles des précipitations moyennes annuelles (1980 – 2010).

Cependant, l'analyse du graphe indique que les précipitations durant cette période sont irrégulières d'une année à l'autre et révèle une variation régressive dans son ensemble avec le temps.

I. 4. 2 Température

La température est également un élément écologique fondamental en tant que facteur climatique vital et déterminant dans la vie des végétaux. Elle conditionne en effet la durée de la période de végétation, ainsi que la répartition géographique des espèces. Cette température dépend de la latitude, de l'altitude, des masses d'air, de la couverture végétale (Emberger, 1955). Elle dépend aussi du type du sol (sol chaud et froid, sol clair et sombre).

Les températures moyennes enregistrent durant la période 1980 – 2010 (ONM, 2011) un maximum de 26,3°C au mois d'Août et un minimum de 9,5°C au mois de Janvier (Fig. 17). Quant aux températures extrêmes enregistrées, elles évoluent dans le même sens avec des maxima en Août qui reste le mois le plus chaud, soit 35,3°C et 17,5°C (M/m) et des minima en Janvier avec 16,02°C et 3,1°C (M/m) et qui s'avère le mois le plus froid de l'année.

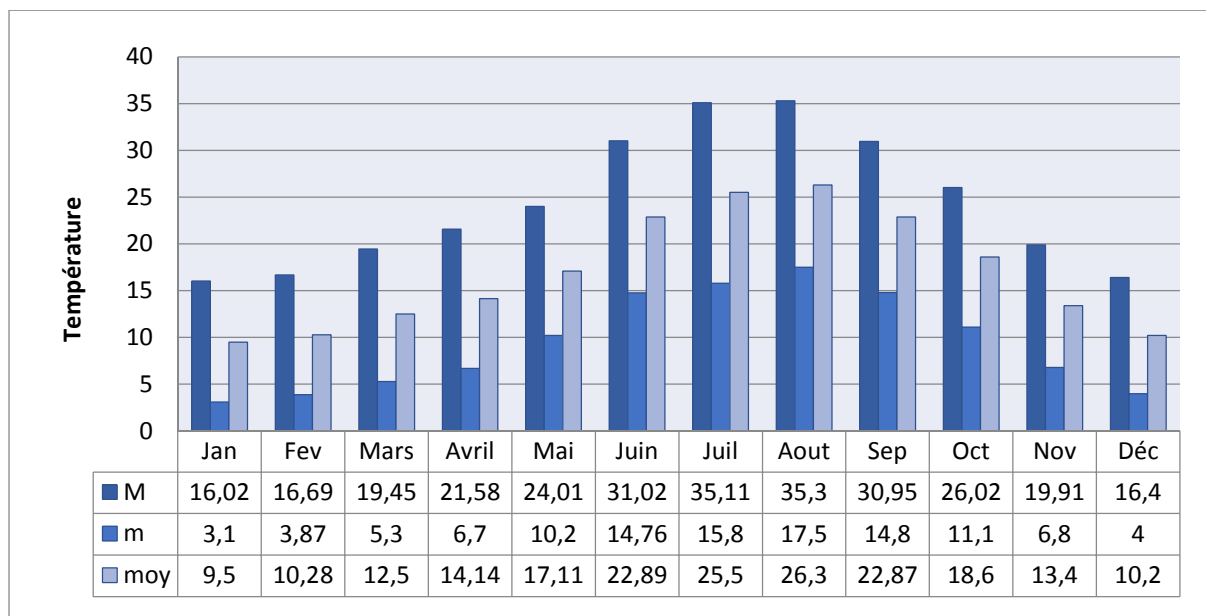


Figure 17 : Variation des températures moyennes mensuelles minimales et maximales (1980 – 2010).

I. 4. 3 L'humidité

L'humidité est supérieure à 70% sur les 6 mois de l'année et ceux à partir du mois d'Octobre. Le maximum est enregistré en saison hivernale (77%) plus exactement en mois de Décembre alors que le minimum (51%) est observé en juillet durant la saison sec (Fig. 18).

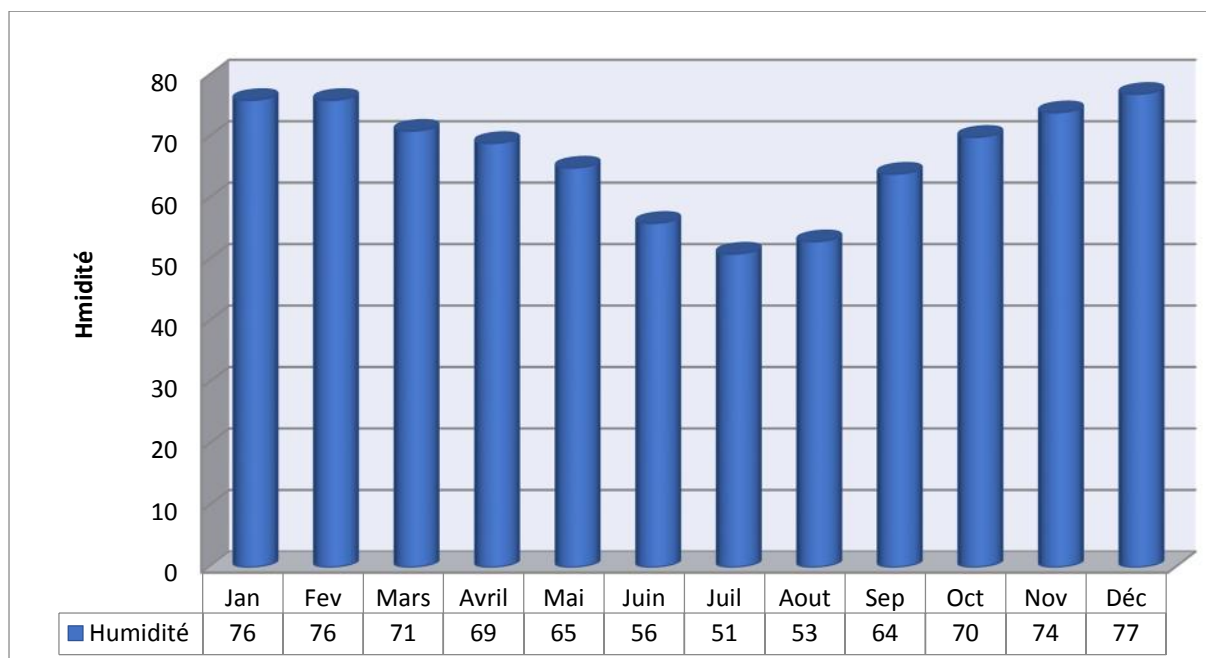


Figure 18 : Moyenne mensuelle du taux d'humidité relative entre 1980 – 2010.

I. 4. 4 Synthèse climatique

Cette synthèse met en évidence les différentes caractéristiques du climat méditerranéen. En effet ce dernier est caractérisé par un hiver modéré et un été relativement sec et chaud.

Cette différence chronologique entre l'alimentation en eau par les précipitations et la température est responsable de la période sèche de ce type de climat. Ce décalage est souvent dénommé Xérotheme c'est à dire long et sec (Faye, 1963).

➤ **Diagramme Ombrothermique de Bagnouls et Gausсен**

On doit à Bagnouls et Gausсен une méthode simple et efficace de discrimination entre la saison sèche et pluvieuse : le critère $P=2T$. Le diagramme Ombrothermique est représenté sur un repère où sont portées les courbes ombriques des périodes humides et sèches et les courbes thermiques correspondant à la période sèche.

Pour un mois sec, la courbe des températures passe au-dessus de la courbe des précipitations. Par ailleurs, pour un mois humide la courbe des précipitations passe au-dessus de la courbe des températures.

• **Diagramme ombrothermique de la période (1913-1936)**

Le diagramme ombrothermique de la période (1913-1936) illustré par la figure 19, nous montre :

- ✓ la saison humide s'étale sur une période d'environ huit mois,
- ✓ l'intersection des deux courbes permet d'évaluer la durée de la période sèche qui est accentuée durant les mois les plus chauds de l'année (été). Elle s'étend sur une période allant de la dernière semaine de Mai jusqu'à la première semaine d'Octobre.

• **Diagramme ombrothermique de la période (1980-2010)**

L'établissement du diagramme ombrothermique de la période (1980-2010), matérialisé par la figure 18, fait ressortir les caractéristiques suivantes :

- ✓ une période froide nettement rétrécie par rapport à l'ancienne période (1913-1936), s'étalant sur une période d'environ six mois,
- ✓ une importante période sèche s'étendant sur une période allant du mi-Mai jusqu'à la dernière semaine d'Octobre.

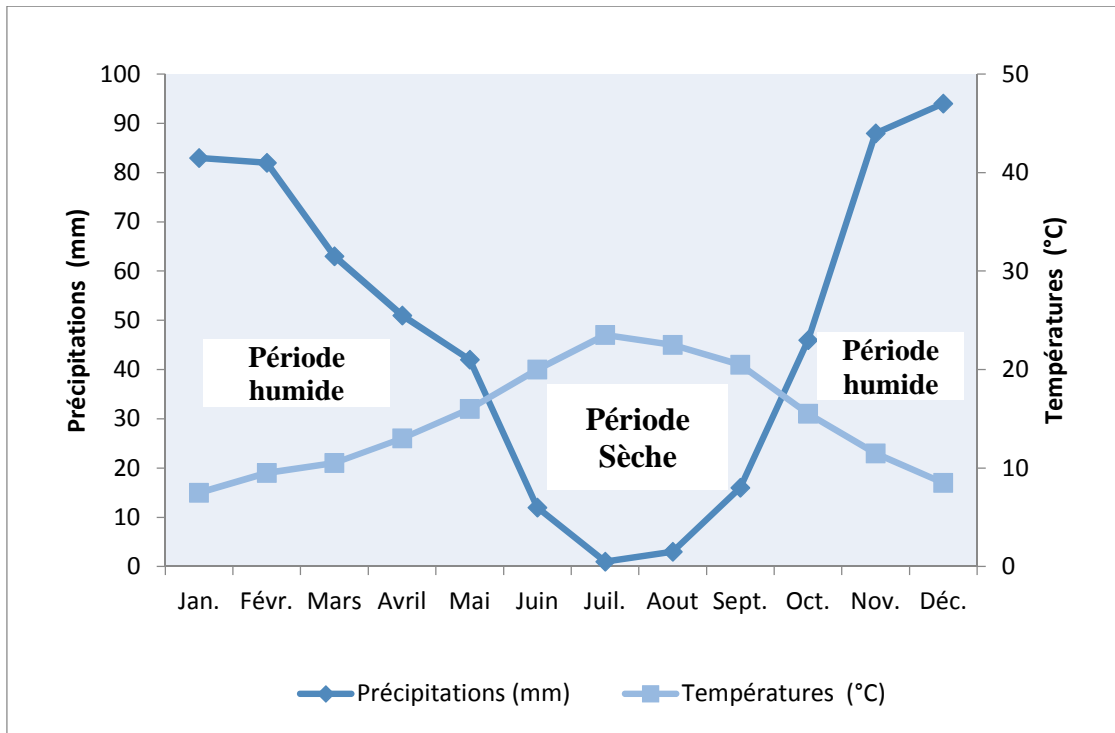


Figure 19 : Diagramme ombrothermique (P=2T) de la station de Tessala de la période (1913-1936).

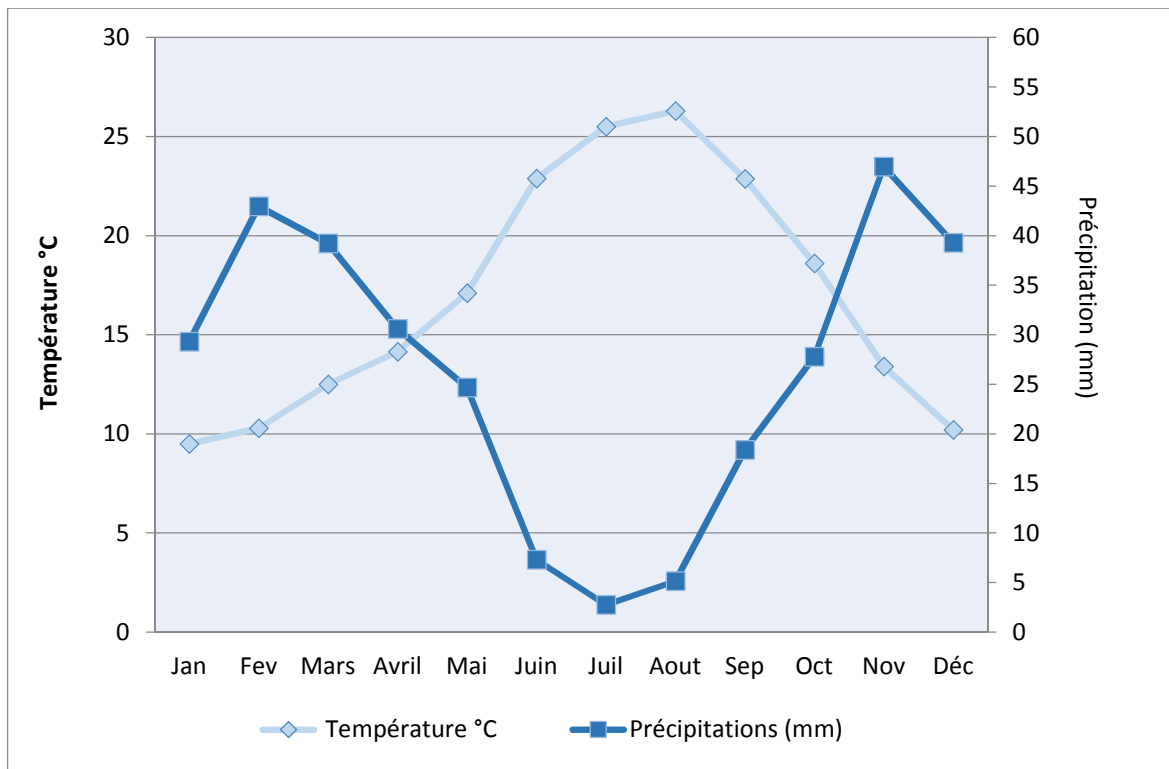


Figure 20 : Diagramme Ombrothermique de la station de Tessala (1980 - 2010).

➤ **L'indice d'aridité de « De Martone »**

Cet indice caractérise l'aridité du climat d'une région donnée. Il s'exprime comme suit :

$$I = P / (T + 10).$$

P : Précipitation moyenne annuelle en (mm).

T : Température moyenne annuelle en (°C).

Donc : $I = 323,74 / (16,94 + 10) = 12,01$

Pour :

$20 < I < 30$: Climat tempéré

$10 < I < 20$: Climat semi - aride

$7.5 < I < 10$: Climat steppique

$5 < I < 7.5$: Climat désertique

$I < 5$: Climat hyper - aride.

L'indice d'aridité est de l'ordre de 12,01 traduit pour la région de Tessala un climat semi-aride. Emberger (1955) s'intéressant aux extrêmes thermiques M et m entre les quelles se déroule la période végétative et qui peuvent constituer des seuils écologiques pour les différentes espèces végétales a défini la relation : $Q = 1000 P / 2(M+m/2) (M-m)$; ainsi il permet de classer la zone dans l'étage bioclimatique semi-aride inférieur à hiver frais.

➤ **La répartition saisonnière des pluies**

Dans la région de Tessala, cette répartition met en relief un rapport très marqué entre le régime thermique et le volume des pluies. Selon Seltzer (1946) sur une période de 25 ans, cette répartition détermine pour la région un indicatif saisonnier (indicatif de Musset) de type HAPE, ce qui confirme la concentration des pluies en Automne et Hiver.

Le climat de la région de Tessala montre deux périodes presque de la même longueur (environ six mois) :

- une période sèche estivale typique du climat méditerranéen pendant les mois les plus chauds,
- une période froide et humide, se concentrant sur les deux saisons (automne et hiver).

Les précipitations se caractérisent par leurs fluctuations et leurs hétérogénéités selon les années. Les pluies sont mal réparties sur les mois de l'année. Après une période sèche les pluies d'automne sont soudaines et violentes. Le régime pluviométrique est de type H.P.A.E.

Du point de vue bioclimatique, la période récente (1980-2010) varie nettement par rapport à l'ancienne (1913-1938), avec une diminution des précipitations et une augmentation des températures.

La comparaison des données récentes de l'O.N.M (2010) avec les données de Seltzer (1946), montre une différence assez nette qui se traduit par une tendance vers un cycle de sécheresse.

Le climat de la région de Tessala est de type méditerranéen influencé par la barrière climatique des monts de Tessala (Chaumont et Paquin, 1971). Les mesures d'Emberger et de « De Martonne » permettent de localiser la région de Tessala dans l'étage bioclimatique semi-aride à hiver frais

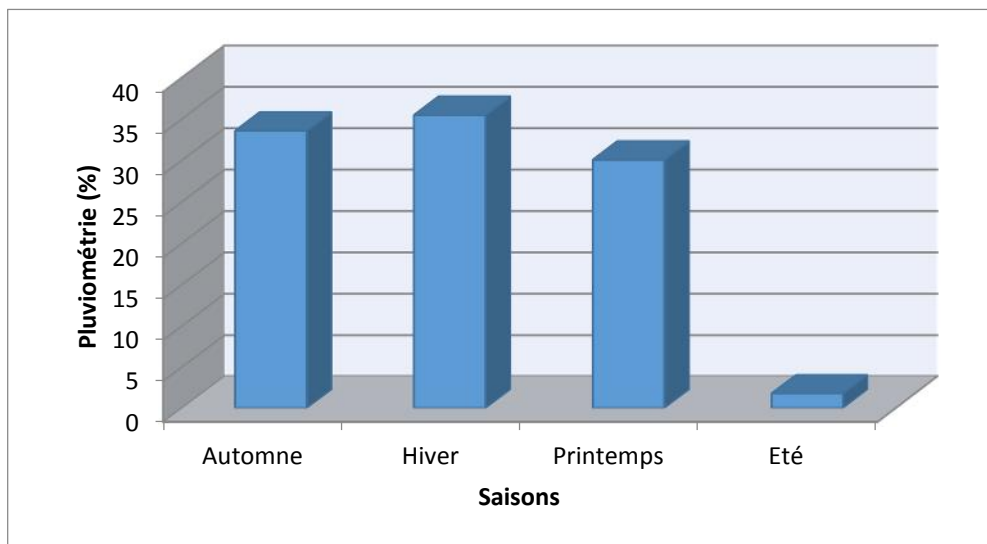


Figure 21 : Représentation graphique du régime saisonnier (Seltzer, 1946).

I. 5 Cadre biotique

I. 5. 1 Occupation des sols

Les rapports du sol et de la végétation connus sous le nom d'edaphologie peuvent être envisagés selon Ozenda (1982) du point de vue pédogénétique, physiologique, biogéographique et écologique.

La commune de Tesla a hérité de son passé colonial une occupation des sols qui marque encore le paysage. Cependant, au plan de l'occupation agricole et d'après la DSA (2008), la céréaliculture et les cultures annuelles prédominaient.

La viticulture était très répandue et couvrait de grandes surfaces. L'arboriculture se développait sur des sols relativement profonds et se localisait essentiellement dans la partie sud de la commune, en particulier le long des Oueds.

Au plan de la végétation naturelle, la couverture forestière occupait une superficie moyennement importante qui semble reculer aujourd'hui en cédant la place aux matorrals et aux garrigues dégradés. C'est un territoire particulièrement montagneux que les conditions naturelles n'ont pas toujours favorisé.

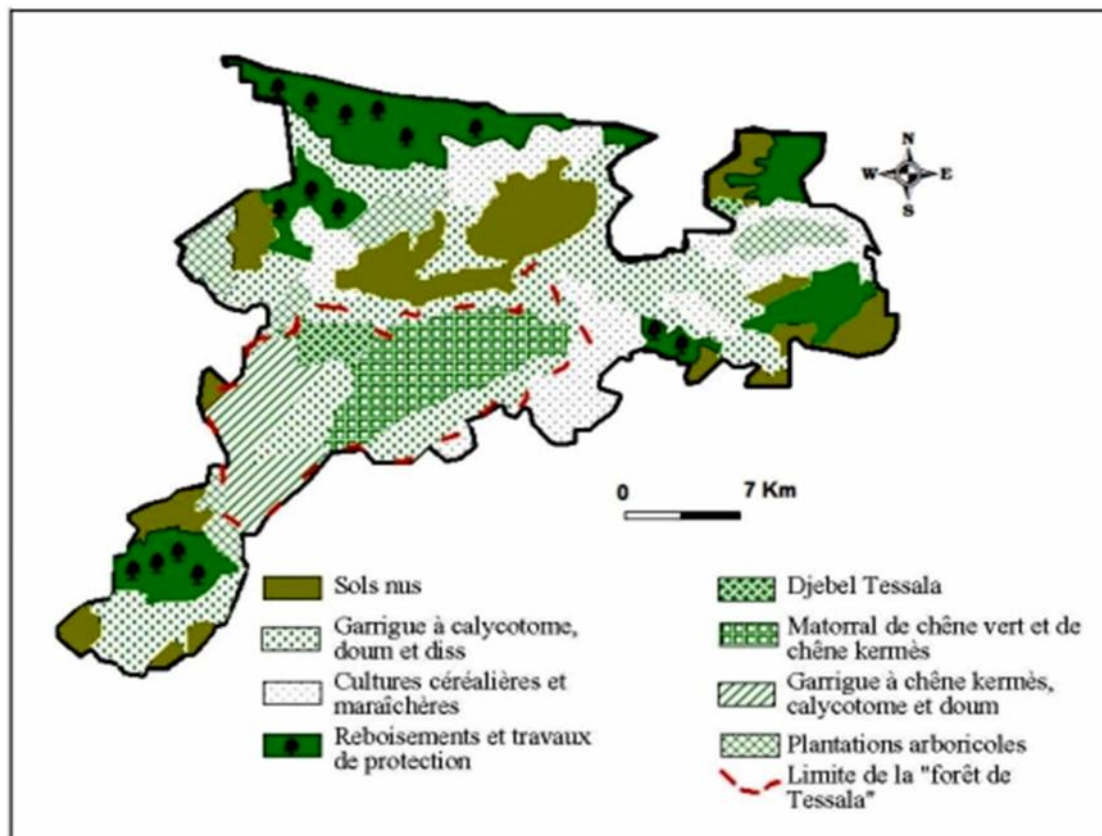


Figure 22 : Carte de l'occupation du sol (Ferka Zazou, 2006).

La classe des pentes permet aussi d'opter pour l'identification des espaces et de leur vocation. Ainsi, dans la catégorie de 0-3% c'est le domaine de l'agriculture avec dominance des cultures annuelles.

- De 3 à 7% c'est le domaine de l'arboriculture rustique avec un choix découlant des conditions du milieu et des besoins socio-économique de la population.
- De 7-14% de pente c'est les espaces fourragères arbustives et arborescentes qui peuvent jouer un double rôle écologique et économique.
- Au-delà de 14% c'est l'aire du chêne vert, les relevés phytoécologiques confirment la série du *Quercus ilex*.

I. 5. 2 Les incendies

La région de Tessala se caractérise par une période sèche et longue, notamment en Juillet et Aout où la température atteint son maximum provoquant ainsi le déclenchement des feux. 70 ha de terres boisées ont été démolis en 2000 ; entre 2001 et 2002 on a enregistré deux saisons calmes où le feu ne s'est pas manifesté. En revanche, entre 2003 et 2006, une reprise des incendies se distingue ; néanmoins avec des taux beaucoup moins alarmants, puisque ils sont en régression par rapport à ceux enregistrés en 2000 (tab. 3). De plus, la superficie incendiée en quatre ans est de l'ordre de 69 ha, un peu plus réduite à celle enregistrée en un an ; ceci est dû aux infrastructures forestières de lutte tel que l'ouverture des pistes, pour une intervention rapide en cas de déclenchement, et aussi la mise en valeur des plantations fruitières, qui ont sans doute rapporté des résultats satisfaisants expliquant ainsi l'absence des incendies depuis 2007. (Conservation des forêts, 2010)

Tableau 3 : Bilan des incendies dans les monts du Tessala.

<i>Années</i>	<i>Superficie incendiée (en ha)</i>	<i>Formations végétales</i>
2000	70	Maquis
2001	/	/
2002	/	/
2003	3	Broussailles
2004	30	Chêne vert et disse, pin d'Alep,
2005	30	Pin d'Alep, Eucalyptus, Alfa
2006	6	Pin d'Alep, Eucalyptus

Source : Conservation des forêts (2010)

I. 5. 3 Le surpâturage

Les monts de Tessala sont caractérisés par un pâturage permanent de troupeaux, ovin, bovin, et caprin qui menacent le renouvellement des ressources biologiques. En fait, la population riveraine ne cherche à travers les délits de coupe et surtout le surpâturage qu'à satisfaire ses besoins de subsistance sans se soucier de l'équilibre de l'écosystème dans lequel elle vit et à partir duquel elle a émergé (Ferka-Zazou, 2006).

CHAPITRE II :

*Matériels biologiques et
méthodes d'étude*

II. 1. Etude écologique

Dans cette étude, nous avons adopté une méthodologie qui consiste à connaître les propriétés physico-chimiques du sol qui ont une influence sur la répartition du couvert végétal ensuite caractériser la richesse spécifique de ces monts en se basant sur une méthode stigmatiste qui a pour but l'évaluation de la diversité biologique et la reconnaissance des espèces végétales sauvages présentes au niveau de la station étudiée.

II. 1. 1 Equipements du terrain

Le matériel utilisé pour la réalisation de cette étude est :

- Une carte topographique 1/25 000 pour localiser la zone d'étude.
- Un GPS de type MGELLAN pour noter les coordonnées géographiques des stations choisies (altitude, longitude et latitude).
- Quatre piquets et une corde pour la délimitation de la surface du relevé.
- Un sécateur et du papier journal pour prélever et conserver les plantes en vue de leurs déterminations.
- Une pelle à main et des sachets en plastique pour le prélèvement et la collecte d'échantillons de sol.

II. 1. 2 Localisation des stations

Après plusieurs prospections préliminaires sur le site d'étude on a peu déterminé la zone d'intérêt qui ont permis une bonne connaissance du potentiel en diversité biologique en présence de l'espèce étudiée *Rhamnus alaternus* L. où on a enregistré les paramètres situationnels relatifs à l'emplacement (altitude, longitude et latitude), aux caractéristiques écologiques des stations (pente, expositions, recouvrement).

II. 1. 3 Etude pédologique

Dans toute étude écologique, le sol constitue l'unique et le principal support pour le développement de la végétation (Chamley, 2002), ce dernier reste la clé déterminante des différents phénomènes (croissance, maintenance, adaptation) par ces éléments nutritifs minéraux ainsi que sa teneur en eau et en matière organique.

Les échantillons de sol sont prélevés de chaque station de l'horizon superficiel à une profondeur de 0 à 20 cm, ils sont ensuite mis à sécher à l'air libre pendant 15 jours. Une fois séchée, la terre est tamisée par un tamis à mailles de 2 mm (Afnor, 1987), séparant les éléments grossiers de la terre fine inférieure à 2 mm. Après le tamisage, nous accéderons

l'analyse physico-chimique selon les méthodes par Aubert (1978) dans son manuel d'analyse du sol. Les différents paramètres analysés sont :

La granulométrie ; Le taux d'humidité ; Le taux de calcaire total ; Le calcaire actif ; Le pH ; La conductivité ; Le taux de la matière organique.

Ces analyses ont été effectuées au niveau du laboratoire de pédologie de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) Sidi Bel Abbès.

II. 1. 3. 1 Analyses physiques

II. 1. 3. 1. 1 La couleur

Pour déterminer la couleur, on utilise le code international de Munsell. En pratique et sur terrain, elle est estimée à l'oeil nue. Aussi il est recommandé d'observer surtout la couleur de l'échantillon à l'état sec et sous bonne clarté. Cette dernière condition est nécessaire pour distinguer plus aisément les différentes couleurs.

II. 1. 3. 1. 2 la structure

On appelle structure du sol, l'ensemble des agrégats ou des structurales de différentes grosseur, forme et porosité (Duchaufour, 2001).

L'identification de la structure sur terrain se fait en prenant à la main un échantillon du sol et on observant la forme et la taille du granulé pour estimer quelle est sa structure.

Les différents aspects de la structure d'un sol : **Granulaire** : petits fragments ; **Polyédrique** : gros fragments ; **Feuilletée** : plaques horizontales ; **Colonnaire** : grandes colonnes du sol, de forme circulaire grossière, aux sommets ronds ; **Prismatique** : fentes verticales assez régulières.

II. 1. 3. 1. 3 Humidité (H)

Les échantillons sont prélevés par la méthode des cylindres, suivant les paramètres que l'on cherche à calculer, ils sont ensuite placés au laboratoire dans des boîtes de Petri et mis à l'étuve après avoir été pesés. Après une durée de 24 h à une température de 105°C suffisante par convention à la disparition de l'eau présente sans qu'il y ait décomposition des carbonates, les échantillons sont ensuite pesés et la variation de la masse est alors égale à la masse d'eau contenue à l'origine.

II. 1. 3. 1. 4 Analyse granulométrique et texture

Pour classer les terres, nous procédons à l'analyse granulométrique du sol. La granulométrie est la classification des éléments constitutifs du sol selon leur taille et la détermination de la

quantité et le pourcentage respectif des différents éléments constitutants (sable, limons, argiles). Cette technique nous donne une idée sur la texture du sol (la fraction fine du sol) (Guillet *et al.*, 1988). La texture est une caractéristique principale et pratiquement permanente du sol, elle influe beaucoup sur le processus physique et chimique dans le profil (Bullock *et al.*, 1985). Notre essai consiste à classer les différents grains constitutants l'échantillon en utilisant une série de tamis, emboîtés les uns sur les autres, dont les dimensions des ouvertures sont décroissantes du haut vers le bas. Le matériel étudié est placé sur la partie supérieure des tamis en appliquant des vibrations de la colonne de tamis de type RETSCH AS 200 digit.

Les différentes fractions obtenues sont présentes dans le tableau suivant :

\emptyset 2 mm	⇨	Fraction grossière
2 mm \emptyset 0,2 mm	⇨	Sable grossier
0,2 mm \emptyset 0,05 mm	⇨	Sable fin
0,05 mm \emptyset 0,02 mm	⇨	Limons
\emptyset 0,002 mm	⇨	Argile

La texture des différents échantillons du sol est définie après projections des résultats de l'analyse granulométrique sur le triangle de Jamagne (1967).

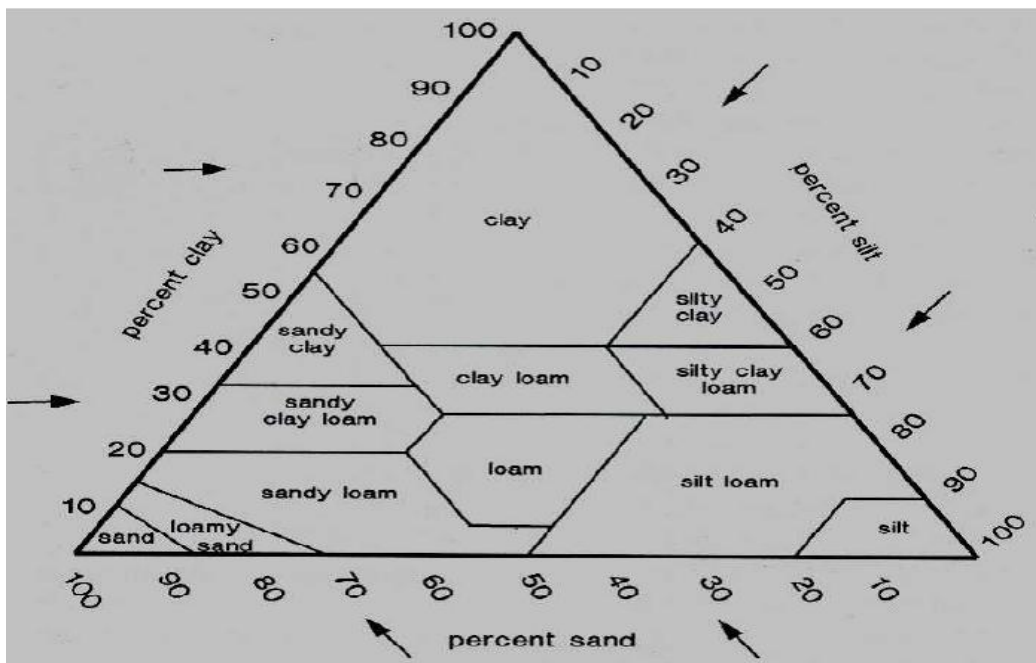


Figure 23 : Triangle de la texture selon « Department of Crop and Soil Sciences » (Berry *et al.*, 2007)

II. 1. 3. 2 Analyses chimiques

II. 1. 3. 2. 1 le potentiel hydrogène (pH)

Le sol n'est pas un milieu inerte, des colloïdes (argile et humus) régularisent la teneur en éléments nutritifs. Ce mécanisme de régulation concerne la teneur en cations métalliques (calcium, potassium,...) et la teneur en ions H de la solution du sol ou acidité du sol qui est due aux ions hydrogènes qui s'y trouvent. En outre le pH est universellement reconnu, comme un facteur d'importance primordiale pour la moitié des éléments traces et leur disponibilité vis-à-vis des êtres vivants. La mesure du pH est faite par la méthode électrométrique en utilisant un pH mètre de type « HANNA Ph209-209R » sur une suspension de la terre avec de l'eau distillée, afin d'apprécier l'alcalinité ou l'acidité du sol.

L'interprétation des résultats est faite selon l'échelle mentionnée au tableau.

On peut classer les sols selon leur acidité de la manière suivante :

- pH < 4,5 : sols très acides.
- 4,5 < pH < 6 : sols faiblement acides.
- 6 < pH < 7 : sols équilibrés permettant une bonne alimentation minérale.
- pH > 7 : sols calcaires et /ou salés.

II. 1. 3. 2. 2. Conductivité électrique (CE)

Elle est définie comme étant la mesure des ions dans la solution. La capacité du sol à conduire le courant électrique est en fonction de la concentration en électrolytes de la solution du sol (Rieu et Chevery, 1976). La conductivité électrique est exprimée en millisiemens par centimètre (Ms/cm), on la détermine sur une solution d'extraction aqueuse (rapport sol eau est égale à 15) à l'aide d'un conductimètre de type HANNA Dist. WP4.

La mesure de la conductivité est une méthode qui petit à petit s'est imposée pour la mesure de salinité du sol (De Jong et *al.*, 1979 ; Williams et Hoey, 1982) ; cette dernière est estimée à l'aide de l'échelle de salure mentionnée au tableau 4.



Figure 24 : Echelle de salure en fonction de la conductivité (Aubert, 1978).

II. 1. 3. 2. 3 Calcaire total (C.T)

- Le calcaire actif : c'est la fraction fine argileuse ou limoneuse du carbone facilement solubilisée dans l'eau chargé de CO₂,
- Le calcaire inactif : c'est le carbonate sous forme de grains grossiers ou cristallins peu soluble dans l'eau chargée de CO₂. Il présente une réserve évoluant par érosion vers une forme active.

Selon la méthode de Calcimètre de Bernard, cette grandeur a été mesurée par un dosage qui est fondé sur la réaction caractéristique du carbonate de calcium (CaCO₃) en contact de l'acide chlorhydrique (HCl). L'échelle d'interprétation des carbonates permet de déterminer la quantité du CaCO₃ comprise dans un échantillon du sol.

Tableau 4 : Identification de la charge en calcaire

% Carbonates	Charge en calcaire
<1 %	Sol pas calcaire
1 à 5 %	Sol peu calcaire
5 à 25 %	Sol modérément calcaire
25 à 50 %	Sol fortement calcaire
50 à 80 %	Sol très fortement calcaire
>80 %	Sol excessivement calcaire

II. 1. 3. 2. 4 Calcaire actif

Le dosage du calcaire actif est réservé uniquement aux échantillons contenant plus de 5 % de calcaire total. Il s'agit de ne doser que la fraction chimiquement active du calcaire du sol.

Le dosage repose sur le tirage par oxydoréduction qui utilise le permanganate de potassium (KMnO₄) et l'oxalate d'ammonium (NH₄)₂C₂O₄H₂O.

II. 1. 3. 2. 5 Matière organique

Le carbone de la matière organique est oxydé par bichromate de potassium en présence d'acide sulfurique. En connaissant la quantité de bichromate nécessaire pour cette oxydation, nous pouvons calculer le pourcentage de carbone organique et d'humus dans le sol (le rapport % d'humus / % Cox = 1,724). Le dosage du carbone organique est effectué à l'aide de la méthode d'Anne, on admet que la matière organique représente deux fois la masse du carbone. Pour l'interprétation des résultats, on se réfère au tableau suivant :

Tableau 5 : Echelle de détermination de la teneur en matière organique

Taux de matière organique	Qualité de la terre
< 1	Très pauvre
1 à 2	Pauvre
2 à 4	Moyenne
> 4	Riche

II. 1. 4 Etude de la composition floristique

II. 1. 4. 1 Méthode utilisée

Pour l'inventaire floristique au niveau de stations retenues, nous avons utilisé la méthode des relevés phytosociologiques recommandée par Braun-Blanquet (1952) dite aussi stigmatiste ou la méthode de l'air minimale. Cette démarche est couramment utilisée en écologie végétale et nous permettra du tableau floristique, elle consiste à :

- choisir des emplacements aussi typiques que possibles pour les inventaires floristiques,
- noter les conditions écologiques des relevés (la localisation géographique, la pente, l'orientation du terrain, la nature du sol et la date),
- dresser une liste complète des espèces présentes par strate,
- accorder pour chaque espèce un coefficient d'abondance-dominance, de sociabilité ainsi que sa fréquence d'apparition dans chaque relevé.

Abondance-dominance : Braun-Blanquet (1952) a créé le coefficient qui associe les concepts d'abondance et de dominance. L'abondance exprime le nombre d'individus qui forment la population de l'espèce présente dans le relevé. La dominance représente le recouvrement de l'ensemble des individus d'une espèce donnée, ce coefficient est estimé visuellement selon une échelle variant de 5 à + :

- Coefficient 5: espèces couvrant plus de 3/4 de la surface
- Coefficient 4: de 3/4 à 1/2
- Coefficient 3: de 1/2 à 1/4
- Coefficient 2: espèces abondantes mais couvrant moins de 1/4
- Coefficient 1: espèces bien représentées mais couvrant moins de 1/20
- Coefficient +: espèces présentes, mais d'une manière non chiffrable.

La sociabilité : Elle traduit le mode de distribution des individus de la même espèce les uns par rapport aux autres. On appelle une espèce sociable, espèce dont les individus sont groupés. Ce caractère est également évalué grâce une échelle de 5 à 1, établie par Braun-Blanquet (1952) :

- **Coefficient 5**: plantes formant des peuplements important recouvrant la plus grande partie de la surface,
- **Coefficient 4** : plantes formant de grandes colonies,
- **Coefficient 3** : plantes croissant en petit peuplements important serrés ou formants des coussinets denses,
- **Coefficient 2** : tiges groupées, la plante croit en touffe,
- **Coefficient 1** : espèces apparaissant par brins isolés, dispersés dans l'air étudié.

Malheureusement dans la pratique, l'observateur ne sait toujours pas, exactement, jusqu'ou s'étend la station ; c'est la raison pour laquelle on utilisera la notion d'aire minimale. Dans notre cas cette aire est de 100 m², elle représente une surface où les conditions écologiques sont homogènes et, où la végétation est uniforme. Selon Guinochet (1973), c'est une surface qui n'offrant pas d'écart de composition floristique appréciable entre ses différentes parties.

Dans notre zone d'étude, trois strates ont été retenues permettant l'identification des formations végétale : arborescente, arbustive et herbacée. L'identification de ces trois strates se fait suivant l'échelle avancée par Benabdelli (1996) pour la végétation ligneuse de l'Oranie : la strate absorbante (hauteur de 4 m et plus), la strate arbustive (hauteur entre 1,50m et 4 m) et la strate herbacée (hauteur moins de 0,5 m).

II. 1. 4. 2 Prélèvement et collecte des espèces

La période d'échantillonnage s'étale d'avril à mai de l'année 2014, période durant laquelle la plus part des végétaux sont en fleurs et où le plus grand nombre des Thérophytes apparaissant. Pour le prélèvement de spécimens de plantes et pour la confection de l'herbier, il est préférable de la faire par temps sec et ensoleillé car les plantes collectées lorsqu'il n'y a pas d'eau en surface, sécheront plus rapidement et conserveront mieux leurs couleurs, les risques d'apparition de moisissure seront réduits.

Il est essentiel de prélever les plantes entières, c'est-à-dire possédant toutes leur parties végétatives : racine, tige, feuille, mais il est indispensable de préserver aussi les fleurs et si possible les fruits qui sont deux organes très essentiels pour la détermination. Les plantes sont faciles à presser, et produisent de meilleurs spécimens lorsqu'elles sont fraîches. Le moyen le

plus simple et le plus efficace pour transporter des plantes récoltées consiste à les placer dans des sacs de plastique.

II. 1. 4. 3 Stockage et séchage

Pour obtenir des échantillons de qualité, le séchage doit commencer le plus rapidement possible après la récolte. Il se fait en posant délicatement chaque plante entre deux feuilles de papier journal sous un poids quelconque. Il est souvent constaté que les plantes perdent leur couleur après le séchage.

Un numéro d'identification qui servira de code devra apparaître à l'extérieur de chaque chemise de papier journal en ce même numéro, ainsi que les données sur la couleur de la fleur ou l'habitat et la date de récolte devront être consignées dans le registre de collection ou le carnet du terrain.

Pour plus de sécurité, il est conseillé de changer régulièrement le papier journal pour éviter les moisissures. Quand un lot de plantes est épais, il est recommandé de placer quelque planche de carton rigide pour éviter la déformation des plantes.

II. 1. 4. 4 Identification des espèces

Sur une petite fiche, nous devons indiquer le code de la plante, la date et le lieu de récolte.

Pour l'identification et la nomenclature des espèces, les flores utilisées pour la détermination des taxons :

- La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (Quezel et Santa 1962 ; 1963).
- Les adventices des cultures méditerranéennes en Tunisie : leurs plantules, leurs semences (Careme, 1990).

Nous avons retenu la nomenclature utilisées dans la flore de Quezel et Santa (1962 ; 1963) pour l'ensemble des espèces.

II. 1. 4. 5 Mise en herbier et archivage

Après leur détermination et leur identification, les plantes sont séchées sous presse avant d'être fixées par la colle sur du papier. Pour obtenir des résultats plus professionnels, nous monterons les spécimens séchés sur une feuille de papier rigide à herbier mesurant environ 30 sur 42 cm. Nous les fixerons en appliquant de petites gouttes allongées de colle blanche (polypropylène) sur les tiges et les pétioles. Les structures délicates, particulièrement celles nécessaires à l'identification, ne devraient pas être couvertes de colle.

L'ajout au coin inférieur de la feuille d'une étiquette donnera les informations comme le nom de la plante, le lieu de collecte et son habitat, complète la préparation du spécimen.

Mises dans des pochettes de plastiques perforées, les planches seront placées dans des classeurs, et gardées dans un endroit aéré, à l'abri de l'humidité et de la lumière.

II. 2 Etude anatomique et histologique

L'étude anatomique et histologique a été effectuée sur des feuilles et des tiges échantillonnées durant le mois de Mai 2014. Nous avons travaillé sur de jeunes organes prélevés à l'aide d'une sape et un ciseau, découpés par une lame de rasoir neuve en petits fragments puis conservés dans l'éthanol 70% à 4°C jusqu'au jour de leurs utilisations.

II. 2. 1 Réalisation des coupes par microtome

L'étude anatomique et histologique des feuilles et des tiges de *Rhamnus alaternus* L. est réalisée sur des coupes transversales semi-fines au microtome (LEICA. RM 2245). Cette technique nécessite la conservation des échantillons dans un état aussi proche que possible de l'état vivant par la fixation des organes dans un fixateur approprié ; déshydratation, inclusion dans la paraffine ; réalisation des coupes semi-fines au microtome ; déparaffinage et enfin coloration des coupes. Ces étapes correspondent aux protocoles publiés dans les travaux de Saint-Pierre et *al.*, (1999) ; Burlat et *al.*, (2004) ; Mahroug et *al.*, (2006). Cette étude a été effectuée en collaboration avec laboratoire d'ANAPAT au niveau du centre hospitalo-universitaire Abdelkader Hassani de Sidi Bel Abbès.

II. 2. 1.1 Fixation

Le but de la fixation est d'immobiliser les structures d'un objet à un état aussi proche que l'état vivant, elle consiste à tuer les cellules sans altérer sensiblement leurs structures (Gabe, 1968). Les différents organes de la plante (feuille et tige) préalablement coupés et conservés dans l'éthanol 70% sont trempés directement dans le fixateur F.A.A 10% (formaldéhyde 3,7% ; acide acétique 5% ; alcool éthylique 50%) pendant une nuit à 4°C et à l'obscurité.

II. 2. 1. 2 Déshydratation

La déshydratation des organes végétaux nécessite plusieurs étapes :

- Eliminer le fixateur (F.A.A)
- Incuber les échantillons dans des bains de butanol tertiaire et d'alcool éthylique à degrés croissants (50%, 70%, 95%, 100% et pur) disposés sous la hotte. Chaque bain dur 1 heure, le cinquième est répété deux fois (Tab. 6).

Tableau 6 : composition (en %) des différents bains de déshydratation.

Bains de déshydratation	1	2	3	4	5
	50 %	70 %	95 %	100 %	Pur (x2)
Eau distillée	50 ml	30 ml	0 ml	0 ml	0 ml
Ethanol 95%	40 ml	50 ml	45 ml	0 ml	0 ml
Butanol tertiaire	10 ml	20 ml	55 ml	75 ml	100 ml
Ethanol absolu	0 ml	0 ml	0 ml	25 ml	0 ml

II. 2. 1. 3 Imprégnation dans la paraffine fondue

Cette opération consiste à :

- Jeter la moitié du butanol tertiaire et faire remplir avec de la paraffine pure fondue et incubé pendant 4h dans une étuve réglée à 60°C,
- Eliminer le mélange et remplacer avec un nouveau mélange (Butanol tertiaire/paraffine : 1V/1V) et incubé une nuit à 60°C,
- Remplacer la paraffine / Butanol tertiaire avec paraffine pure et incubé une nuit à 60°C,
- Remplacer la paraffine par une fraîche.

II. 2. 1. 4 Inclusion des échantillons

Les échantillons sont inclus dans un moule en acier rempli par de la paraffine pure liquide sur une plaque chauffante. Après disposition des échantillons selon l'orientation souhaitée (transversale ou longitudinale) à l'aide d'une pince fine ou d'une aiguille préalablement chauffée. Après refroidissement, nous obtenons des blocs de paraffine solide lesquels sont inclus les échantillons (feuilles et tiges). Ces derniers peuvent être conservés à 4°C plusieurs années.

II. 2. 1. 5 Confection des coupes

La confection des coupes est réalisée à l'aide d'un microtome de type « Reichert-Jung ».

L'épaisseur des coupes est de 10µm. les rubans de coupes sériées sont placés sur des lames contenant une goutte étalée d'eau albumineuse préalablement filtrée. Les lames sont mises sur une plaque chauffante afin d'étaler les coupes et éviter leurs plissement.

II. 2. 1. 6 Déparaffinage et réhydratation

La coloration est réalisée dans un milieu aqueux d'où la nécessité de déparaffiner les coupes avant la coloration. Les lames sont déparaffinées par deux passages successifs dans du xylène pendant 10 mn puis les échantillons sont ensuite réhydratés dans des bains d'alcool éthylique à degrés décroissants (de 100% à 50% pendant 5 min chacun) puis sanctionnés par deux rinçage à l'eau distillée (tab.7). Après rinçage, les lames sont séchées pendant une nuit sur plaque chauffante réglée à 37°C.

Tableau 7 : Bains successifs de déparaffinage et de réhydratation

Bains	Durée
1- Xylène	10 min
2- Xylène	10 min
3- Ethanol 100 %	5 min
4- Ethanol 100%	5 min
5- Ethanol 95 %	5 min
6- Ethanol 75 %	5 min
7- Ethanol 50 %	5 min
8- Eau distillée	5 min
9- Eau distillée	5 min

II. 2. 1. 7 Coloration

Coloration à l'hématoxyline-éosine permet de colorer les noyaux cellulaires en rose. Selon le protocole utilisé au niveau du laboratoire d'ANAPAT, les étapes sont :

- Colorées avec l'hématoxyline Harns (colorant commercialisé) pendant 5 min,
- Rincées avec de l'eau distillée pendant 10 Sec,
- Mordancées avec de l'acide chlorhydrique pendant 8 Sec,
- Trempées dans une solution de carbonate de lithium pendant 10 Sec,
- Rincées avec de l'eau distillée pendant 5 Sec,
- Trempés dans une solution d'alcool 95° pendant 1 min,

- Colorées avec de l'éosine (colorant commercialisé) pendant 10 min,
- Trempées dans deux bains successifs contenant de l'alcool à 100%, pendant 2 min de chacun,
- Trempées dans du toluène ou du xylène pendant 2 min.

II. 2. 1. 8 Montage et observation des coupes

Après chaque coloration, les lames sont montées dans une goutte de baume de Canada entre lame et lamelle, pour être ensuite observées en champ clair d'un microscope optique de type (Mo. Tic. SFC_18). La prise des photos est réalisée à l'aide d'un appareil photo numérique de type SAMSUNG ST 72 (16 méga pixel).

II. 3 Etude biochimique

Matériel végétal

Rhamnus alaternus L. a été collecté le mois d'avril 2014 au niveau des monts de Tessala (Wilaya de Sidi Bel Abbés), l'identification de l'espèce a été réalisé au niveau du laboratoire biodiversité végétal : conservation et valorisation, faculté des sciences de la nature et la vie, université de Djillali Liabes. Un échantillon de référence est conservé au laboratoire.

les souches microbiennes utilisées

Les souches microbiennes utilisées dans l'activité antimicrobienne proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection), cinq souches sont utilisées : trois bactériennes (*Escherichia coli* ATTC 25922, *Bacillus cereus* ATTC 10876 et *Proteus mirabilis* ATTC 35659) et deux fongiques (*Aspergillus brasiliensis* ATTC 16404 et *Candida albicans* ATTC 10231). Les souches utilisées font partie de deux groupes de microorganismes : pathogènes et contaminants.

Les milieux de cultures

Suivant les méthodes utilisées dans les essais et selon les souches, nous avons utilisé comme milieu de culture les suivants :

- Muller Hinton (MH) pour la culture des bactéries,
- Oxytetracycline-Glucose-Agar (OGA) pour la culture des champignons.

Les rats

Le matériel biologique quant à lui constitué de : *Rattus norvegicus*, souche : Wistar, femelles, pesant entre 180 et 230 g, provenant de l'animalerie de la faculté des sciences de la nature et de la vie université de Sidi Bel Abbes. Avant les essais pharmacologiques proprement dits, ils

sont gardés dans des cages métalliques au niveau de l'animalerie de la faculté dans une ambiance d'air conditionné (25-28 °C). Ils sont nourris au granulé (aliments pour bétail) avec accès libre à l'eau ; ils bénéficient en outre des conditions de veille/sommeil (12h de veille ; 12h de sommeil). Et 24 heures avant les tests proprement dits, les animaux sont sélectionnés puis réparties par lots de 5, soumis à la diète. Ils seront pesés peu avant le début des essais pharmacologiques.

II. 3. 1 Technique d'extraction des flavonoïdes

Les feuilles broyées ont été macérées dans un mélange méthanol/ eau (7/3 : v/v) avec un rapport 1/10 (masse/v), sous agitation douce pendant une nuit à température ambiante. L'extrait hydroalcoolique est filtré sous vide, et le méthanol est évaporé à sec à l'évaporateur rotatif. L'extrait obtenu correspond à l'extrait brut (Ex.Br) des feuilles. Cinquante millilitres de cet extrait ont été congelés puis lyophilisés afin de déterminer le rendement d'extraction (Markham, 1982 ; Merghem, 1995). L'Ex.Br restant a été extrait par l'hexane (1/1, v/v) plusieurs fois jusqu'à ce que la phase hexanique devienne transparente. Après évaporation à sec à l'évaporateur rotatif, on obtient un extrait hexanique (Ex.Héx). La phase aqueuse est ensuite extraite plusieurs fois par le chloroforme puis par l'acétate d'éthyle pour donner les extraits (Ex.Ch) et (Ex.Ac). Ces deux extraits sont évaporés à sec à l'évaporateur rotatif. Cinquante millilitres de chaque extrait concentré Ex.Héx, Ex.Ch, Ex.Ac et la phase aqueuse résiduelle (Ex.Aq) ont été congelés puis lyophilisés afin de déterminer les rendements d'extraction. Tous les lyophilisats ont été conservés à -20 °C jusqu'à leurs utilisations. Les mêmes étapes ont été utilisées pour l'extraction des flavonoïdes pour les écorces de la même espèce étudiée.

II. 3. 1. 1 Rendement des extraits en flavonoïdes

Les différents extraits obtenus après lyophilisation sont pesés pour déterminer le poids sec résultant. Les rendements ont été rapportés à 50 g de poudre (Feuilles et écorces).

II. 3. 1. 2 Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par (Zhishen et *al.*, 1999) avec le trichlorure d'aluminium et la soude. La teneur en flavonoïdes totaux des extraits de plantes étudiées est exprimée en milligramme (mg) équivalent de la catéchine par gramme d'extrait (mg EC/g d'extrait).

Mettre 1 ml d'extrait de *R. alaternus* L. (Feuille et/ou Ecorce) dans un tube à essai ; Ajouter 1 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 2 % ; laisser incubé 15 min à

température ambiante. Lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible (Spectronic 20 Genysis TM) à 430 nm. Effectuer la même opération pour la catéchine à différentes concentrations en introduisant 1 ml de ces dernières dans une série de tubes et ajout de 1 ml d'AlCl₃ à 2%. Le blanc est représenté par l'éthanol additionné à l'AlCl₃, toutes les opérations sont réalisées en triplicata. Les concentrations des flavonoïdes contenus dans les extraits de *R. alaternus* L. (Feuille et Ecorce) sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la catéchine comme standard, les résultats sont exprimés en mg équivalent en catéchine/ g d'extrait.

II. 3. 1. 3 Activités antioxydants : Test de piégeage du radical libre DPPH

Le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 515 nm. En présence de composés antiradicalaire, le radical DPPH est réduit en changeant de couleur et en virant vers le jaune. Les absorbances mesurés à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnellement au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon.

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par Benhamou et *al.*, (2006). Un volume de 50 µl de l'extrait flavonoïques et des standards (acide ascorbique, acide gallique, acide caféique, acide tannique et catéchine) à différentes concentrations préparé dans le méthanol à raison géométrique de 2 (500, 250, 125, 62,5, 31,25 et 15,62 µg/ml) est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025 g de DPPH/ 1 L de méthanol) fraîchement préparé. En se qui concerne le control négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1,950 ml d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée. Le blanc de la réaction contient seulement le méthanol. Après Incubation à l'obscurité pendant 30 mn et à la température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Le calcul des pourcentages de l'activité antiradicalaire est effectué par la formule suivante :

$$AA \% = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Avec:

AA : activité antiradicalaire

Ac : absorbance du control négative

At : absorbance de l'extrait végétal

La concentration inhibitrice 50 % (CI₅₀), aussi appelée efficient concentration 50 % (EC₅₀), est la concentration de l'échantillon testé ou du standard, nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Ces concentrations sont calculées graphiquement par les équations de régressions linéaires résultantes des graphes tracés des pourcentages d'activité antioxydante (AA%) en fonction de différentes concentrations des extraits flavonoïques et des standards.

II. 3. 1. 4 Activités antimicrobiennes

Le test biologique constitue le meilleur précurseur permettant de découvrir les substances bioactives. Pour cela, nous avons testé l'effet antimicrobien et antifongique des produits finaux obtenus sur les trois souches bactériennes et deux champignons. Cette étude a été réalisée au laboratoire de microbiologie de la faculté de Médecine à l'université de Djillali Liabes (Sidi Bel Abbés). Le test de sensibilité des bactéries et des champignons est réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé, appelée encore la méthode des disques. Cette méthode est la plus utilisée par les laboratoires de diagnostic.

II. 3. 1. 4. 1 Préparation des concentrations

La solubilisation des lyophilisats obtenus est faite dans le diméthylformamide (DMF) pur. Des essais témoins sont effectués *in vitro* pour le DMF pur vis-à-vis de chaque type de souche microbienne. Pour cela, nous n'avons enregistré aucune inhibition de la croissance pour l'ensemble des souches bactériennes et fongiques.

Pour la préparation des différentes concentrations des différents extraits, 1 mg de chaque extrait lyophilisé est introduit dans un tube à essai auquel 10 ml de DMF pur sont ajoutés. Les tubes sont agités au vortex jusqu'à dissolution totale de l'extrait. Pour tous les extraits, une solution mère à 100 µg/ml a été préparée. Les solutions mères sont diluées progressivement dans le DMF pur afin d'avoir pour chaque extrait, une gamme de solutions ayant des concentrations de 20, 40, 60 et 80 µg/ml. Ces quatre concentrations plus les concentrations mères (100µg/ml), sont utilisées pour la détermination de leurs activités antimicrobiennes.

II. 3. 1. 4. A Test antibactérien

Cette méthode permet de mettre en évidence l'effet antibactérien des extraits testés sur les trois souches bactériennes, ainsi que la détermination de la résistance ou la sensibilité de ces souches vis-à-vis des différents extraits (Essawi et asarour, 2000 ; Bssaibis et *al.*, 2009). Pour la préparation de l'inoculum bactérien, chaque souche a été ensemencée sur une gélose nutritive pour obtenir des colonies isolées. Après incubation de 24h à 37°C, nous avons choisi 4 à 5 colonies bien isolées avec une anse de platine et nous les avons transférées dans un tube

contenant 5 ml d'eau physiologique stérile. L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum. Dans des boîtes de Pétri stérilises de 90 mm de diamètre sur une épaisseur de 4 mm, 20 ml de gélose Muller Hinton (MH) sont coulés et laissés pendant 15 mn pour se solidifier. Sur ce milieu de culture, 100 µl de suspension bactérienne est disposé et ensemencé sur toute la surface de la boîte de Pétri à l'aide d'un râteau en verre.

Des disques de 6 mm de diamètre préparés avec papiers Whatman n° 1 et autoclavés pendant 15 mn, sont imprégnés à l'aide d'une pince métallique stérile dans chaque concentration (20, 40, 60, 80 et 100 µg/ml) et disposés sur la surface du milieu solidifié. Une fois appliqués, les disques ne doivent pas être déplacés. Les boîtes de Petri sont ainsi incubées dans une étuve à 37°C pendant 24h à 48h.

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'une règle graduée et à l'extérieur de la boîte fermée, le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques, déterminé par les différentes concentrations des différents extraits.

II. 3. 1. 4. B. Test antifongique

Ce test met en évidence la sensibilité des souches fongiques vis-à-vis des extraits testés, permettant ainsi de les classer selon leurs diamètres d'inhibition (Senhadji et *al.*, 2005 ; Vinod et *al.*, 2010 ; Traoré et *al.*, 2012).

L'inoculum des champignons a été préparé de la même façon que celui des bactéries en prenant deux tubes contenant chacun 5 ml d'eau physiologique stérile et à l'aide d'une anse en platine, nous avons raclé quelques colonies bien isolées de chacun des champignons testés qui vont être déchargés chacun dans un tube.

Dans des boîtes de Pétri stériles, nous avons versé 20 ml de gélose OGA (Oxytétracycline-Glucose-Agar). Après solidification du milieu, ce dernier est inoculé avec 100 µl de suspension des champignons à étudier ensuite étalé en surface à l'aide d'un râteau à verre.

Des disques stériles en papiers Whatman N° 1 de 6 mm de diamètres, imprégnés de différentes concentrations des extraits (20, 40, 60, 80 et 100 µg/ml) sont disposés sur la surface du milieu solidifié. Les boîtes de Pétri ont été incubées pendant une demi-heure à température ambiante, ensuite pendant 24h à 4h dans une étuve à 37°C.

Comme pour le test antibactérien, la détermination de l'activité antifongique a été faite en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition, qui est représentée par une auréole formée autour de chaque disque où aucune croissance fongique n'est observée.

II. 3. 1. 4. C Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques et des antifongiques

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe ou des plusieurs germes à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique et de donner des indications sur l'efficacité « in vitro » de ces antibiotiques.

De même pour un antifongigramme, qui consiste à déterminer « in vitro » la sensibilité des mycètes vis-à-vis d'un ou de plusieurs antifongiques. Un autre but c'est de comparer les résultats des différents extraits obtenus avec ceux de l'antibiogramme et de l'antifongigramme.

Le choix des antifongiques et des antibiotiques est fait selon la disponibilité :

- Les antibiotiques : la kanamicine, l'ampicilline, la pieracilline, la gentamicine, l'Aztréonam, l'acide nalidixique, le chloramphénicol, la Ceftriaxone et l'imipénème.
- Les antifongiques : l'amphotéricine B, le nitrate d'éconazole, le Fluconazole, et la terbinafine.

Le test de la sensibilité des bactéries et des moisissures vis-à-vis des antibiotiques et des antifongiques est réalisé par la même méthode utilisé pour les tests antibactériens et antifongiques des différents extraits obtenus.

II. 3. 1. 4. C .1 Antibiogramme

L'antibiogramme est réalisé selon les mêmes étapes décrites précédemment (diffusion sur milieu solide). Dans quatre boîtes de Pétri stériles, 1 ml de chaque suspension bactérienne est inoculée à la surface de 20 ml de gélose Muller Hinton (MH) solide et étalée à l'aide d'un râtelier en verre. A l'aide d'une pince métallique, des disques de papier buvard de 6 mm de diamètre, imprégnés d'antibiotiques commercialisées à doses connues sont appliqués à la surface à des distances déterminées (3 disques par boîte). Les boîtes sont ensuite incubées dans une étuve à 37°C pendant 24h à 48h. La lecture des résultats se fait à l'aide d'une règle graduée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition, qui est représentée par une auréole formée autour de chaque bactérie en cas d'une activité positive.

Tableau 8 : les antibiotiques commercialisés utilisés

Les antibiotiques	Signes	Concentrations (µg/ml)
Kanamycine	K	30
Ampicilline	AMP	10
Pipéraciline	PIP	100
Gentamicine	CN	10
Aztréonam	ATM	30
Chloramphénicol	C	30
Acide nalidixique	NA	30

II. 3. 1. 4. C. 2 Antifongigramme

20 ml de gélose OGA (Oxytetracycline- Glucose- Agar) sont versé dans deux boîtes de Pétri stériles. Après solidification du milieu, ce derniers estensemencé avec quatre gouttes de suspension des champignons à étudier, chacun dans une boîte (*Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*), ensuite étalées en surface. Les disques imprégnés d'antifongiques à différentes concentrations sont disposés à la surface du milieu solideensemencé. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h à 48h. Les lectures sont effectuées en contrôlant le diamètre de la zone d'inhibition en cas d'une réponse positive aux agents.

Tableau 9 : Les antifongiques commercialisés utilisés

Les antifongiques	Signes	Concentration (µg/ml)
Amphotéricine	AMB 1	100
	AMB 2	50
	AMB 3	20
	AMB4	10
Fluconazole	FLC 1	100
	FLC 2	50
	FLC 3	20
	FLC 4	10
Terbinafine	TER 1	100
	TER 2	50
	TER 3	20
	TER 4	10
Nitrate d'éconazole	N	20

II. 3. 1. 4. D Classement des souches testées selon leurs sensibilités aux antibiotiques, antifongiques et aux extraits

La catégorisation des souches bactériennes et fongiques lors de l'antibiogramme, l'antifongigramme et vis-à-vis des différents extraits s'effectue comme suit : souche sensible (+), intermédiaires (\pm) et résistantes (-). Cette classification a été établie par Bonnet et *al.*, (2012).

Tableau 10 : Classement des souches microbiennes selon leurs sensibilités

Souches sensibles (+)	Souches intermédiaire (\pm)	Souche résistante (-)
10 mm \emptyset D	D \emptyset 10 mm	\emptyset d

Avec :

- **D** : diamètre critique haut (le plus grand diamètre atteint par la souche).
- **d** : diamètre critique bas (le plus petit diamètre atteint par la souche).
- **\emptyset** : diamètre d'inhibition.

II. 3. 1. 4. 2 Concentration minimales inhibitrices (CMI) : technique de dilution en milieu liquide

La détermination des CMI est réalisée en utilisant la méthode de microdilution en milieu gélosé (Billerbeck et *al.*, 2002 ; Yakhlef et *al.*, 2012) à partir d'une gamme de concentration de l'extrait végétal. Elle est réalisée seulement pour les extraits végétaux les plus actifs constatés lors des tests de sensibilité en milieu solide, ce choix est arbitraire (\emptyset 10 mm). Une série de dilution à raison géométrique de 2 sont réalisées à partir d'une solution mère de 200 $\mu\text{g/ml}$ de chaque extrait végétal préparé dans le DMF pur. Ces concentrations sont de : 100, 50, 25, 12,5, 6,25 et 3,12 $\mu\text{g/ml}$.

2 ml de chaque dilution sont alors incorporés à 38 ml de milieu MH (bactéries) ou d'OGA (Champignons). Les mélanges sont immédiatement répartis dans deux boîtes de Pétri à raison de 20 ml de milieu par boîte. Après solidification, l'inoculation des géloses, contenant l'extrait ou non (témoin), est effectuée en surface sous forme de quatre (pour les bactéries) ou cinq (pour les champignons) dépôts de 1 μl de chaque souche microbienne. Après incubation à 35°C pendant six jours, la croissance est comparée à celle du témoin. La CMI est définie comme la plus petite concentration de produit pour laquelle aucune croissance bactérienne ou fongique n'est visible comparativement au témoin sans extrait végétal.

II. 3. 2 Effet antihépatotoxique

II. 3. 2. 1. Préparation des extraits

Dans le souci d'être en conformité avec la forme galénique traditionnelle d'utilisation de la drogue telle que préconisée par les thérapeutes traditionnels, nous avons procédé à une décoction et macération aqueuses pour l'obtention des extraits d'étude.

- Le décocté aqueux lyophilisé

Cinq cent grammes (500 g) de matière sèche (poudre de feuilles) ont été mis en décoction dans un ballon contenant 2000 ml d'eau distillée ; la décoction a été maintenue sous reflux continu pendant deux (02) heures. Au terme de cette opération, le décocté obtenu après refroidissement a été filtré à travers un entonnoir contenant du coton hydrophile. La partie récupérée a été lyophilisée grâce à un lyophilisateur de paillasse au bout de 72 heures à l'issue desquelles le décocté lyophilisé a été récupéré puis pesé en vue d'en déterminer le rendement.

- Le macéré aqueux lyophilisé

Il a été obtenu dans les mêmes conditions que le lyophilisat du décocté à la seule différence qu'ici l'on a procédé à une macération (extraction à froid) sans aucune opération de chauffage de la prise d'essai (500 g).

II. 3. 2. 2. Test antihépatotoxique

Vue la grande diversité des protocoles d'étude constaté dans les publications internationales (Fleurentin, 1990) en ce qui concerne la détermination des propriétés hépato-protectrices des drogues végétales, nous avons privilégié la démarche méthodologique de Rao et Mishra (1997) ; après adaptation aux conditions de travail du laboratoire où nous avons effectuée les différentes essais.

Pour ce faire, les animaux requis pour les tests pharmacologiques et antihépatotoxique ont été répartis en Cinq (05) groupes de 6.

Le groupe I (témoin normal) reçoit une administration quotidienne du véhicule c'est-à-dire une solution aqueuse à 1% p/v de gomme arabique (1ml/ kg) et ce pendant neuf (09) jours.

Le groupe II (témoin normal intoxiqué) se voit administrer également chaque jour la solution aqueuse de gomme arabique à 1% (p/v) par voie oral durant tout le temps que dure l'expérience.

Les rats du groupe III reçoivent par gavage le produit de référence, la silymarine (100 mg/kg).

Les animaux des groupes tests eux aussi se voient administrer une fois par jour durant le temps que durent les essais respectivement, le décocté aqueux lyophilisé (groupe IV), le macéré aqueux lyophilisé (groupe V). Les extraits reçus par les rats des groupes tests ont été administrés à la même dose de 250 mg/kg. Au septième jour, tous les rats des différents groupes à l'exception de ceux du groupe I (témoin normal) ont reçu le tétrachlorure de carbone CCL₄ (0,5 ml/kg). Pour le traitement des animaux, le décocté et le macéré lyophilisés ont été solubilisés dans le véhicule avant être administré aux animaux à l'aide d'une seringue de gavage. Au dixième jour de l'épreuve, tous les rats ont été sacrifiés après anesthésie à l'éther. Le sang prélevé par ponction cardiaque est destiné à l'estimation des marqueurs biochimiques de l'intoxication hépatique notamment les transaminases (ALAT/GPT ; ASAT/GOT), la phosphatase alcaline (ALKP) et la bilirubine directe (DBil) à l'aide d'une gamme d'analyseurs cobas® 6000.

II. 3 Analyse statistique

Des analyses de la variance (ANOVA) à un, deux et à plusieurs critères de classification au seuil de 5% sont réalisées pour :

- La mise en évidence de l'effet du type de l'extrait flavonoïques et de sa concentration, la nature de la souche microbienne et l'organe végétatif de l'espèce *R. alaternus* sur le pouvoir antimicrobien représenté par les diamètres d'inhibition.
- La caractérisation de l'influence du type de l'extrait flavonoïques et sa concentration et l'organe végétatif utilisé de *R. alaternus* sur les activités antioxydantes résumées par les pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH.
- Nous considérons que la différence est : non significative ($p > 0,05$), significative (* $p < 0,05$), hautement significative (** $p < 0,01$) et très hautement significative (***) $p < 0,001$). Ces analyses sont exécutées en utilisant le test de Tukey pour les comparaisons deux à deux.
- Pour la mise en évidence de l'effet des extraits testés (groupe : III, IV, V) sur les paramètres biochimiques du test antihépatotoxique. des analyses de la variance à deux critères de classification sont réalisées au seuil de 5 %.

Nous considérons que la différence est : non significative ($P > 0,05$), significative ($P < 0,05$). Ces analyses sont exécutées par logiciel XLSTAT 2012 en utilisant le test de Tukey pour les comparaisons deux à deux.

CHAPITRE III :

Résultats et discussions

III. 1. 1 Ecologie stationnelle de l'espèce *Rhamnus alaternus* L. au niveau des monts de Tessala

Nous entamons dans cette partie une étude des caractères édaphiques de la station échantillonnée puis une analyse de la flore inventoriée du point de vue systématique biologique et morphologique. Nous avons tenu compte en plus de la présence des espèces, de leur abondance-dominance et le calcul de la fréquence.

III. 1. 1. 1 Etude édaphique

L'analyse physico-chimique qui apparaisse sur l'échantillon de sol prélevé se résume sur le tableau ci-dessous.

Tableau 11 : Résultat de l'analyse du sol

Echantillon	PH	CE	Calcaire Total	Calcaire actif	MO	Sable	Limon	Argile	Humidité
St 1	7.78	0.08	5.3	2.42	8.36	47	25	28	14

Les analyses pédologiques ont été effectuées au niveau du laboratoire pédologique de l'institut National de la Recherche Agronomique (INRA) Sidi Bel Abbés. Pour la station d'étude nous avons pris un seul échantillon de l'horizon superficiel, car la composition de ce dernier est la plus importante pour étudier la végétation.

Le sable est l'élément qui domine dans ce sol, présente un taux de 47% au niveau de la station étudiée, ce pourcentage est vraisemblablement dû à leur localisation sur une pente assez forte où ce ruissellent contribue à l'appauvrissement des sols en éléments fins.

Les proportions des limons et des argiles varient avec des pourcentages moins importants.

On indique un taux de limons atteignant 25% et un taux d'argile ne dépassant pas les 28%.

La structure est de type équilibrée, elle se situe entre l'aire limono-argilo-sableuse pour la station étudiée.

Les taux d'humidité obtenus par passage des sols dans une étuve à 10°C atteint 14% ceci est dû à l'altitude qui est assez importante. L'importance de ce pourcentage dans cette station s'explique par leurs localisations dans le versant Nord.

Le pH est estimé à 7,78 définit ainsi un pH alcalin où l'activité biologique du sol est forte et rapide.

Les mesures au conductimètre indiquant des sols non salés (conductivité inférieure à 0,6 Ms/ Cm). Cette dernière a une influence sur la végétation. La présence de quantité importante des sels dans la solution du sol abaissent le potentiel hydrique et réduit fortement la disponibilité de l'eau pour les plantes, on parle alors des milieux « physiologiquement sec ».

La plupart des échantillons définissent des proportions de carbone organique supérieure à 4% indiquant ainsi une richesse relative en matière organique. Cette richesse est en relation avec le taux d'humidité qui est relativement élevé et au taux de recouvrement des stations étudiées.

Pour les teneurs en calcaire total, l'esquisse de nos résultats fait ressortir un sol moyennement calcaire où la teneur est inférieure à 4%.

III. 1. 1. 2 Analyse floristique

Le relevé réalisé sur le terrain nous a permis de quantifier la richesse et la diversité floristique de l'écosystème de Djebel Tessala. Notre travail a ciblé l'approche de la flore qui accompagne l'espèce étudiée présente sur le site d'étude.

III. 1. 1. 2. 1 Caractérisation systématique

Sur le total des 34 espèces recensées, réparties sur 21 familles différentes (Fig. 25). La famille la mieux représentée est celle des Liliaceae avec un taux de 14,28%, suivie des Asteraceae, Cistaceae et les Lamiaceae (8,57%). Les Poaceae, les Brassicaceae avec 5,71% et en fin les Apiaceae, Fabaceae, Convolvulaceae, Geraniaceae, Fumariaceae, Malvaceae, Anacardiaceae, Fagaceae, Residaceae, Rhamnaceae, Rubiaceae, Rosaceae, Dipsacaceae, Caryophyllaceae, Urticaceae avec (2,85%).

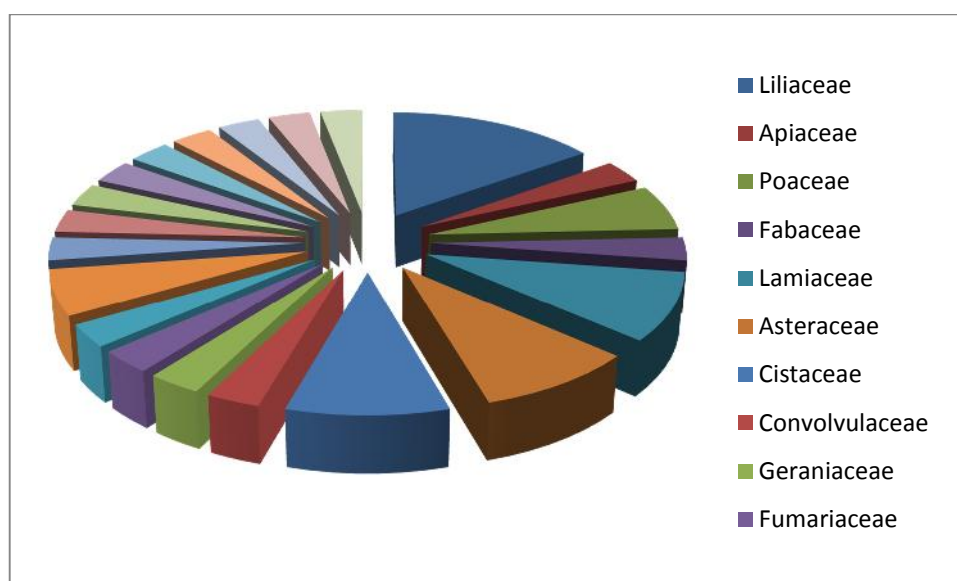


Figure 25 : Répartition des familles

III. 1. 1. 2. 2 Caractéristique biologique

Le type biologique d'une plante est la résultante sur la partie végétative de son corps, de tous les processus biologiques y compris ceux qui sont modifiés par le milieu pendant la vie de la plante et qui ne sont pas héréditaire (Polumin, 1967).

Il se dégage de cette figure que les pourcentages sont : Thérophytes 37%, vient en deuxième position les Hémicryptophytes avec 33%. Les Phanérophytes et les Géophytes renferment un taux de 15%.

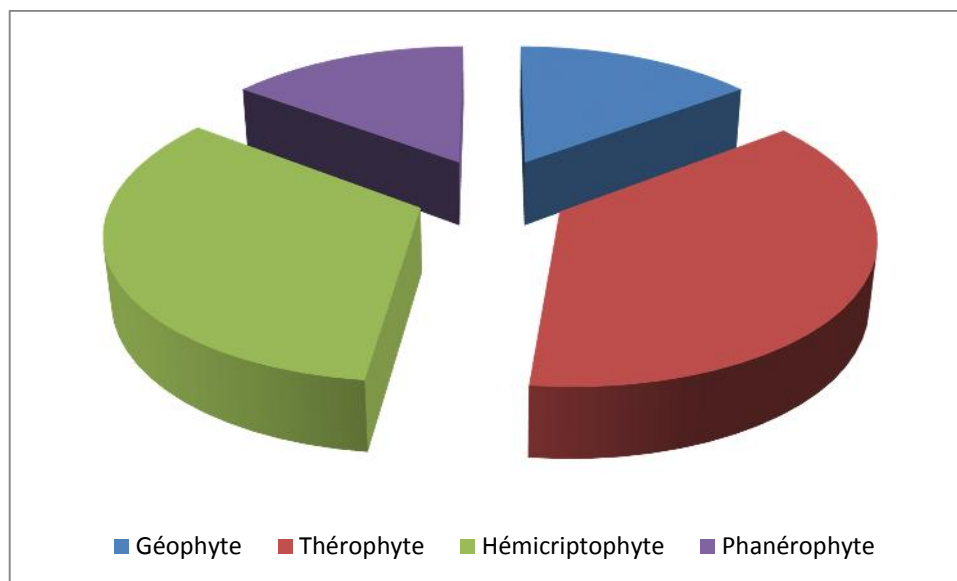


Figure 26 : Distribution des types biologiques

III. 1. 1. 2. 3 Caractérisation morphologique

Les herbacées annuelles définissent le taux le plus élevé (50%), suivie par les herbacées vivaces avec 24%. Les ligneuse vivaces avec 26%.

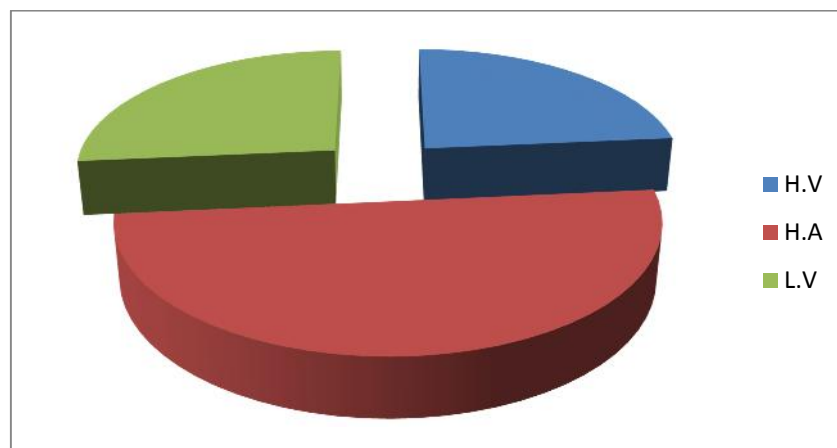


Figure 27 : Distribution des types morphologiques

III. 1. 1. 2. 4 Eléments phytochoriques

Plusieurs travaux ont été réalisés sur ce domaine. Nous pouvons citer ceux de Quézel (1983). Ce même auteur explique la diversité biogéographique de l'Afrique par les modifications climatiques durement subies dans cette région depuis le Miocène, ce qui entraîne la migration d'une flore tropicale.

Il ressort de cette figure que l'élément biogéographique qui prédomine incontestablement cette formation végétale est bien le type Méditerranéen avec un taux de 42,85%, suivie de l'Ouest-Méditerranéen (11,42%). l'Endémique Algérie-Maroc ne représentent que 2,85%.

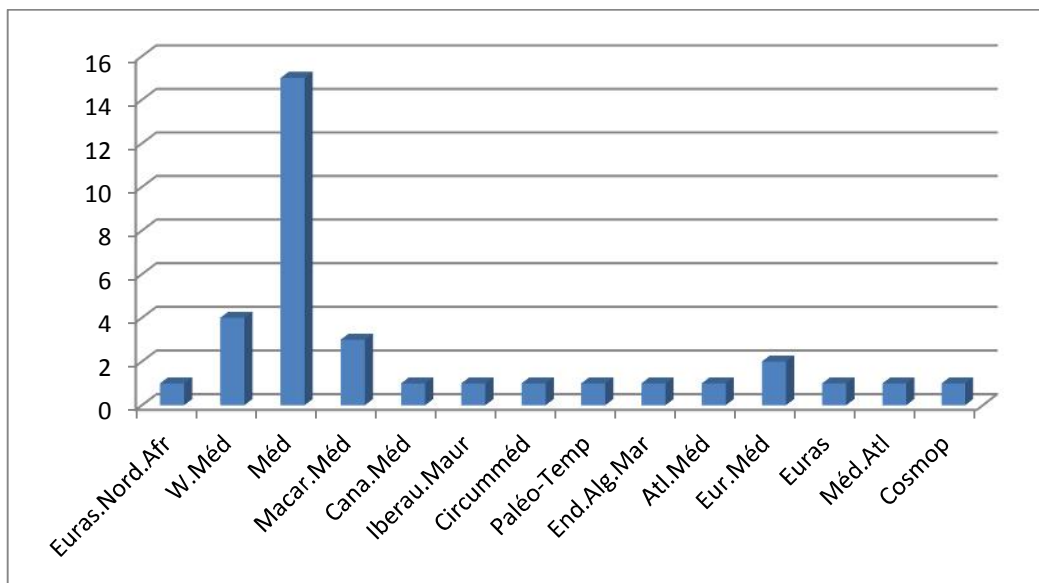


Figure 28 : Répartition des espèces par types biogéographiques

Eur-Méd : Euro-méditerranéen. **Euras :** Eurasiatique. **Macar-Méd :** Macaro-Méditerranéen. **Cosmop :** Cosmopolite. **Paléo-Temp :** Paléo-Tempéré. **Méd :** Méditerranéenne **W.Méd :** Ouest-Méditerranéen. **Sub-Méd :** Sub-Méditerranéen. **Iber-Maur :** Ibéro-Mauritanien. **Cir-med :** Européen Méditerranéen.

III. 1. 1. 2. 5 Analyse phytoécologique

Les résultats de l'étude phytoécologique de cette station sont représentés sur le tableau 12.

Tableau 12 : Relevée phytoécologique

Station	Latitude (nord)	Longitude (ouest)	Altitude (mètre)	Exposition
St 1	35° 16' 482''	0° 46' 555''	990	Sud-Ouest

N°	Espèces	Coeff
1	<i>Allium ampeloprasum</i> L.	1.3
2	<i>Ammi visnaga</i> (L). Lam	1.1

3	<i>Ampelodesma mauritanicum</i> (Bir) et Schiz	++
4	<i>Anthyllis tetraphylla</i> L.	1.2
5	<i>Asparagus acutifolius</i> L.	+
6	<i>Asparagus stipularis</i> Forsk.	+
7	<i>Asphodelus microcarpus</i> Sal et Viv.	+
8	<i>Ballota hirsuta</i> Benth.	1.2
9	<i>Bellis anua</i> L.	1.2
10	<i>Centaurea acaulis</i> L.	1.+
11	<i>Cistus salviifolius</i> L.	1.1
12	<i>Convolvulus althaeoides</i> L.	1.+
13	<i>Dactylis glomerata</i> L.	++
14	<i>Daucus carota</i> (L.) Thell.	1.1
15	<i>Erodium sp</i>	++
16	<i>Fumaria caprioliata</i> L.	++
17	<i>Helianthemum polyanthum</i> (L.) Mill.	1.1
18	<i>Helianthemum hirtum</i> (L.) Mill.	++
19	<i>Lavatera cretica</i> L.	++
20	<i>Lobularia maritima</i> (L.) Desvaux	1.1
21	<i>Muscari comosum</i> (L.) Mill.	++
22	<i>Pallensis spinosa</i> (L.) Cass.	1.2
23	<i>Pistacia lentiscus</i> L.	++
24	<i>Quercus ilex</i> L.	++
25	<i>Raphanus raphanistrum</i> L.	++
26	<i>Reseda alba</i> L.	1.2
27	<i>Rhamnus alaternus</i> L.	1.2
28	<i>Rubia peregrina</i> L.	++
39	<i>Rubus ulmifolius</i> Schott.	++
30	<i>Scabiosa stellata</i> L.	++
31	<i>Sideritis incana</i> L.	++
32	<i>Silene colorata</i> Poiret.	++
33	<i>Stachys ocymastum</i> (L.) Briq	++
34	<i>Urtica membranica</i> Poir.	++

L'abondance d'une espèce est généralement mesurée par son nombre total d'individu. On ajoute qu'elle se mesure aussi par sa densité définie par le nombre d'individu par unité de surface ou distance moyenne entre individus. Cependant, pour les 34 espèces inventoriées ceux affectés d'un coefficient de + et 1 sont définis comme des espèces peu abondantes où le recouvrement est de moins 25% à moins 5%.

Gegout (1995), note que la rareté d'une espèce peut être due à trois raisons : soit elle est caractéristique d'un autre milieu que celui étudié et y est donc par accident, soit elle est naturellement rare et sa fréquence est faible dans toutes les conditions écologiques, soit enfin, elle a une écologie très étroite : elle est très faible, elle est fréquente dans un très faible éventail de milieux et absente ailleurs.

Planche I : Quelques espèces présentes au niveau du mont Tessala (Cliché : W. Benchiha, 2014)



III. 1. 2 Etude anatomique et histologique des feuilles, des tiges et des fleurs du *Rhamnus alaternus* L.

III. 1. 2. 1 Les feuilles

L'observation microscopique photonique des coupes transversales sériées réalisées au microtome colorés par l'hématoxyline-éosine (pl. II) a montré que la nervure principale et le limbe est constitué de l'extérieur vers l'intérieur des tissus suivant :

- Un épiderme supérieur (Ep) à cuticule épaisse, formé de cellules beaucoup plus grandes que celles de l'épiderme inférieure (pl.II. fig. A,B).
- Un parenchyme palissadique (Pp) à une ou deux assises sur les parties latérales (pl.II. fig. A).
- Un parenchyme lacuneux (Pl) à grosse cellules arrondies, réduit à la face supérieure de la feuille, plus étendu à la face intérieure (pl. II. Fig. A, B).
- Tissus conducteurs de sève : Xylème et Phloème (pl. II. Fig. 1, A).
- Un épiderme inférieur portant des poils sécréteurs moins abondants caractérisé aussi par la présence des stomates (Sto) (pl. II. Fig. A, C).
- Présence de grosses macles d'oxalate de calcium.

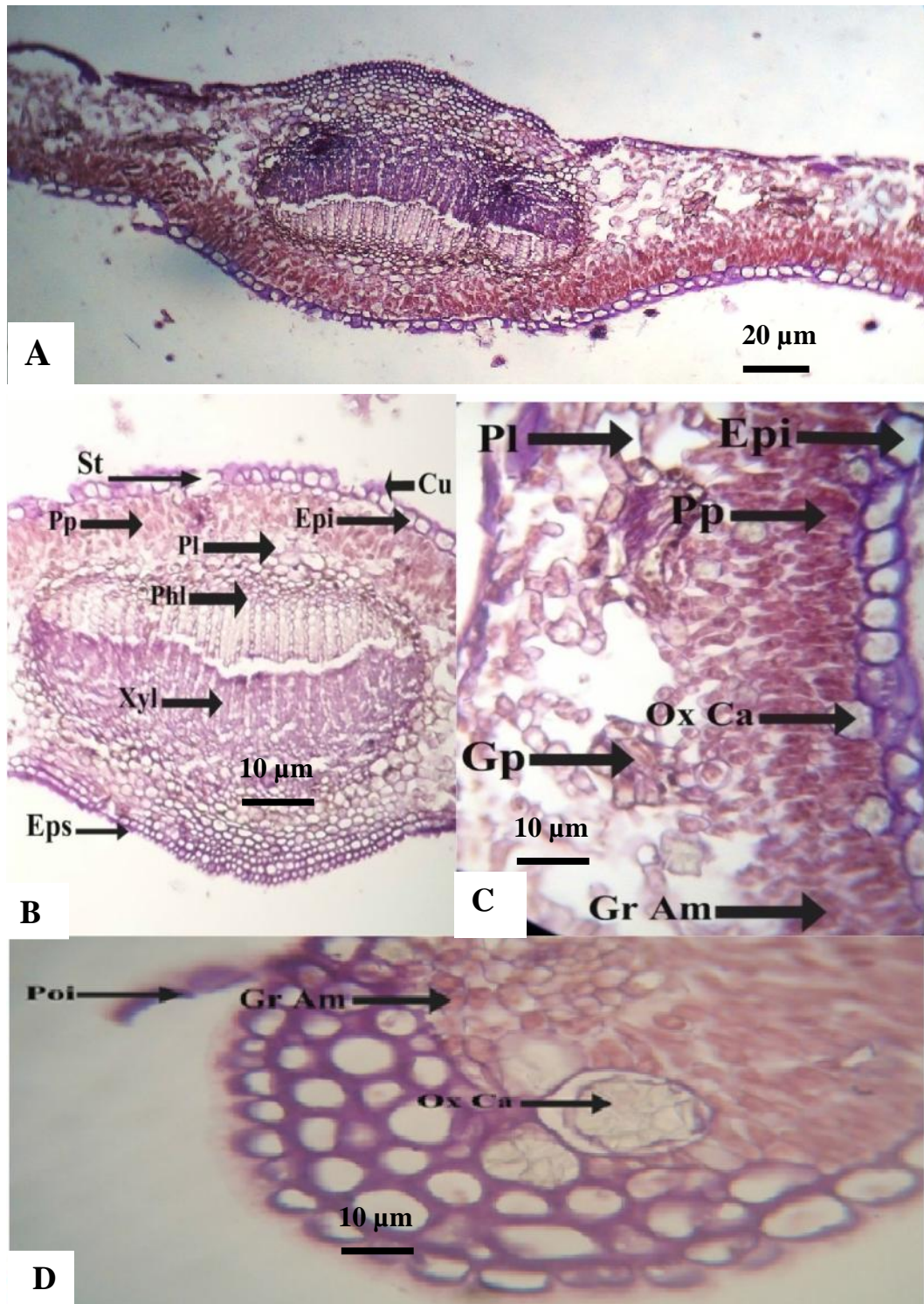
Le limbe (pl. II. Fig. B) est de même structure que la nervure principale mais avec un parenchyme chlorophyllien plus abondant caractérisé par un nombre important de grain d'amidon ainsi que de gaine périfasciculaire.

III. 1. 2. 2 Les tiges et les fleurs

L'examen des coupes longitudinales réalisé sur une tige de *Rhamnus alaternus* L. sériées au microtome et colorées par l'hématoxyline-éosine (pl. III) à fait ressortir que la tige possède une structure simple caractérisée par les tissus suivant :

- Un épiderme (Ep) à cuticule (Cu) mince dépourvue de poils (Poi) (pl. III. Fig. D, E).
- Un parenchyme cortical (Pc) localisé sur les faces, contenant des cristaux d'oxalate (Ox Ca) rejoignant par endroit l'épiderme (pl. III. Fig. D, E).
- Un endoderme (En) bien différencié formant deux à trois assises de grosses cellules (pl. III. Fig. D).
- Un système conducteur formant un anneau complet (Xylème et Phloème) et une Moelle (Mo) qui occupe le centre de la coupe.

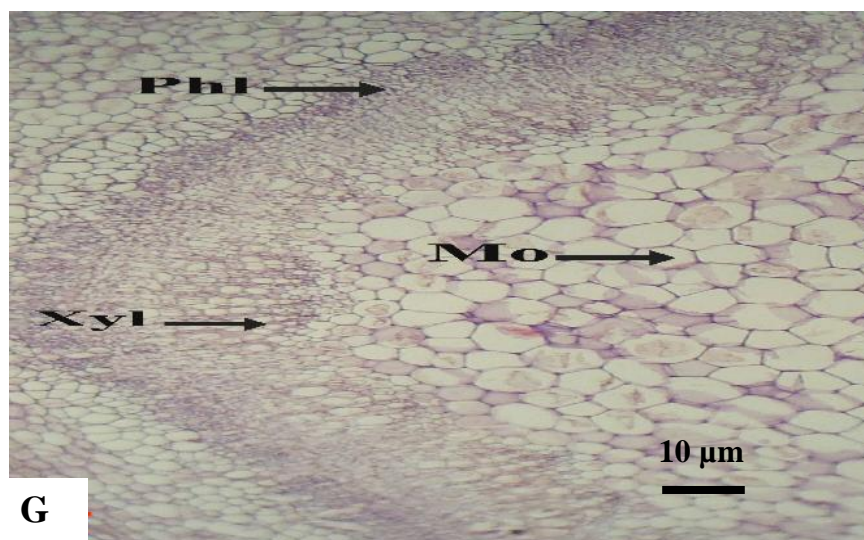
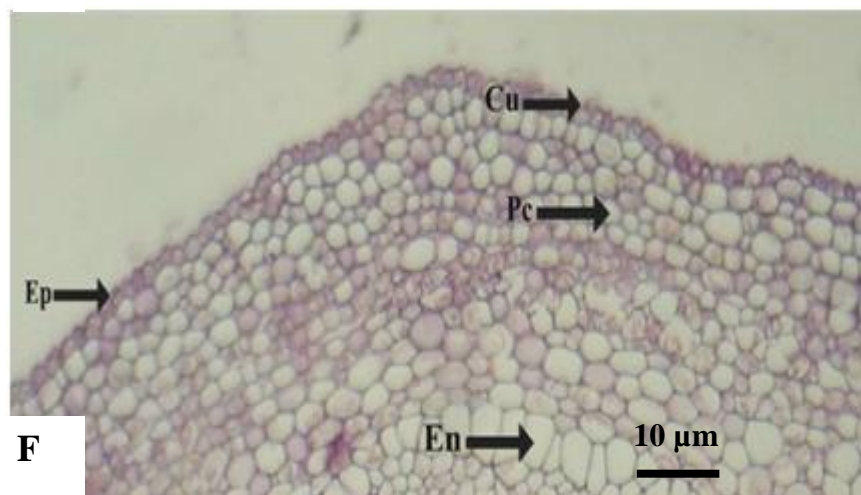
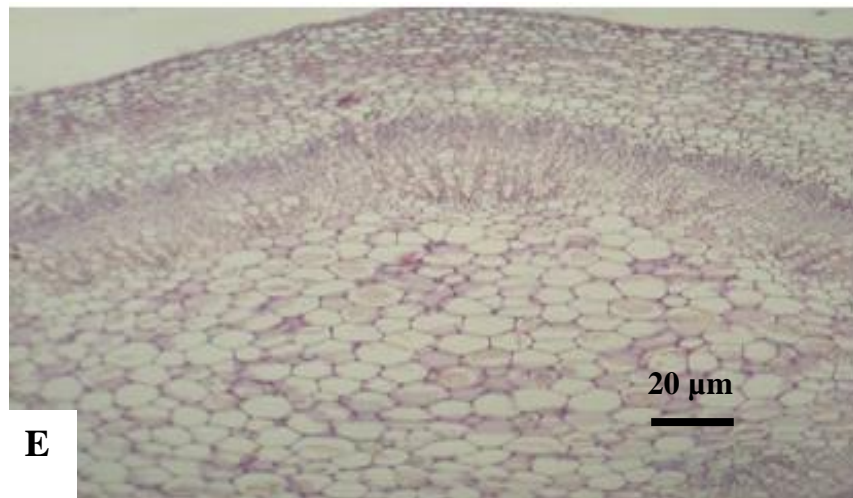
Planche II. Coupe transversale sériée réalisées au microtome coloré par l'hématoxyline-éosine (Cliché : W. Benchiha, 2014).



(Eps) : épiderme supérieur ; (Pp) : parenchyme palissadique ; (Pl) : parenchyme lacuneux ; (Xyl) : Xylème ; (Phl) : Phloème ; (Cu) : cuticule ; (Epi) : épiderme inférieur ; (Poi) : poils ; (Ox Ca) : oxalate de calcium ; (Gr Am) : graine d'amidon ; (Gp) : gaine périfasciculaire.

A : Vue générale d'une coupe transversale au niveau d'une feuille (Gr \times 400) ; B : nervure principale (Gr \times 600) ; C : Portion du limbe (Gr \times 800) ; D : portion de l'extrémité de la feuille (Gr \times 800).

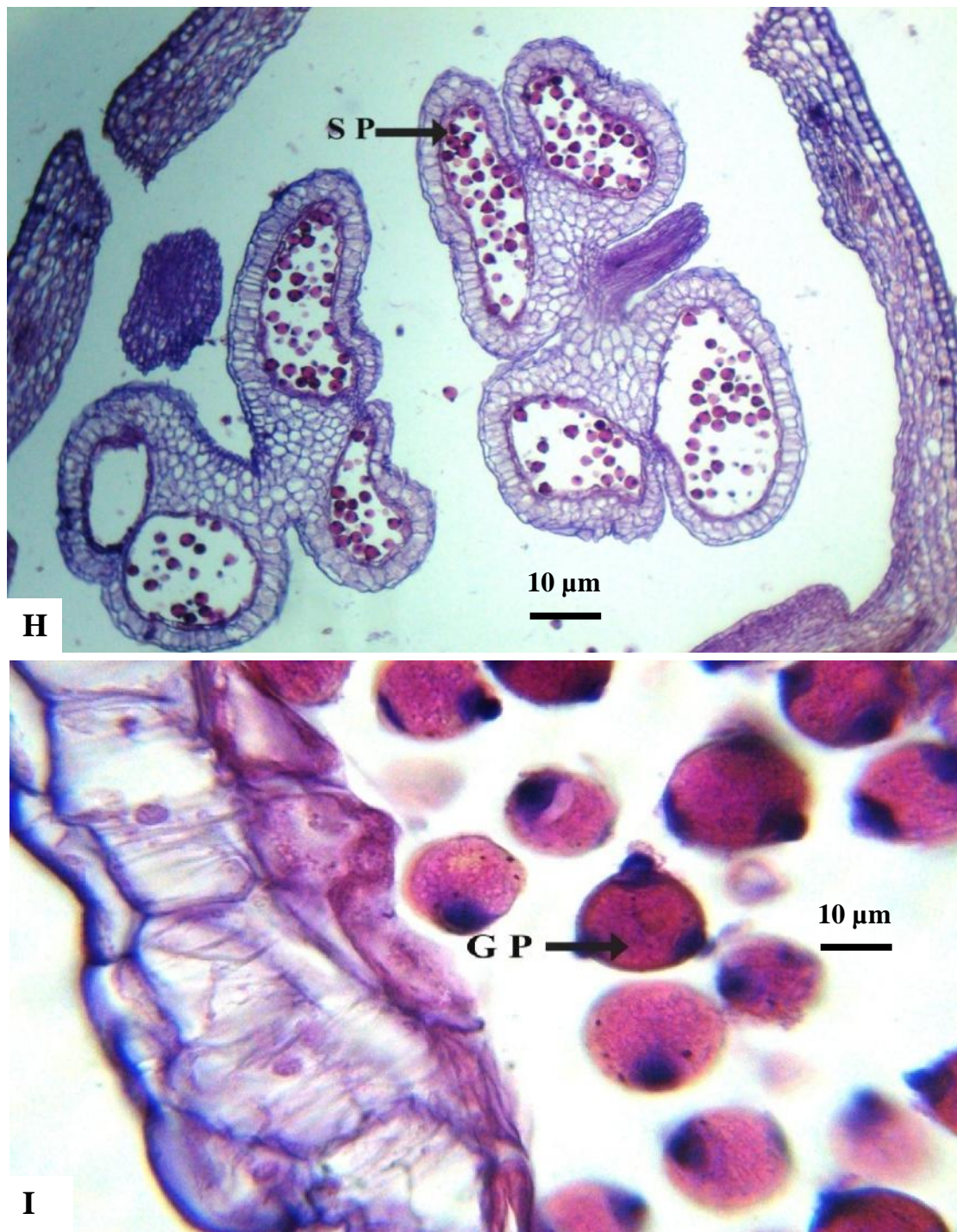
Planche III. Coupes transversales sériées au niveau d'une tige, colorées à l'hématoxyline-éosine (Cliché : W. Benchiha, 2014).



(**Cu**) : cuticule ; (**Pc**) : parenchyme cortical ; (**Ep**) : épiderme ; (**Phl**) ; phloème ; (**Xyl**) : xylème ; (**Mo**) : moelle

E : vue complète d'une coupe transversale au niveau d'une tige (Gr × 400) ; **F** : mise en évidence de la partie supérieur de la tige (Gr × 600) ; **G** : détail du tissu conducteur de la tige (Gr × 600).

Planche IV. Coupe transversale sériée au niveau d'une fleur, colorées à l'hématoxyline-éosine (Cliché : W. Benchiha, 2014).



(SP) : sac pollinique ; (GP) : graine de pollen.

H : vue générale d'une coupe transversale au niveau d'une fleur (Gr \times 800) ; **I** : observation à l'intérieur d'un sac pollinique (Gr \times 1000).

III. 1. 3 Etude biochimique

III. 1. 3. 1. Etude biochimique d'extraits flavonoïques des feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

III. 1. 3. 1. 1. Rendement des extractions

Les différents extraits obtenus après lyophilisation ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant. Les rendements ont été déterminés par rapport au poids total de la matière végétale réduite en poudre et par rapport à l'extrait méthanolique (l'extrait brute). Ces rendements sont représentés dans le tableau 13.

Tableau 13 : Rendement des différentes fractions flavonoïques

Extrait flavonoïques	Rendement % (au broyat)	Rendement % (à Ex.Br)
Ex.Br	36,6 %	100 %
Ex.Héx	4,88 %	13,33 %
Ex.Ch	5,68 %	15,52 %
Ex.Ac	7,2 %	19,67 %
Ex.Aq	13,8 %	37 %

Ex.Br : extrait brut ; **Ex.Héx** : extrait hexanique ; **Ex.Ch** : extrait chloroformique ; **Ex.Ac** : extrait d'acétate ; **Ex.Aq** : extrait aqueux.

Les extraits flavonoïques obtenus présentent différents aspects : pâteux, huileux et poudreux, de diverses couleurs vert foncé, marron clair, vert jaunâtre et vert clair. Ex.Br représente (36.6%) du poids de matière sèche des feuilles, suivi Ex.Aq (13.8%), Ex.Ac (7.2%), Ex.Chl (5.68%), Ex.Héx (4.88%). Par rapport à l'extrait brut les rendements sont : 37.7%, 19.67%, 15.52%, 13.33% respectivement pour Ex.Aq, Ex.Ac, Ex.Chl, Ex.Héx.

La somme des pourcentages des quatre extraits par rapport à l'extrait brut est de 85,52%, le fractionnement de l'extrait brute peut conduire à des pertes substantielles de matière, ces pertes représentent 14, 48 %.

III. 1. 3. 1. 2. Teneur en flavonoïdes totaux des différents extraits de feuilles

Les taux des flavonoïdes totaux des cinq extraits concernant la partie (feuille) ont été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage qui suit une équation de type : $y = 0.010 x + 0.064$ sachant que $R^2 = 0.990$. Les concentrations des flavonoïdes (Fig. 29) sont relativement importantes dans les extraits dans leur majorité, les teneurs en flavonoïdes sont de (19.33) mg EC/g d'extrait dans l'extrait hexanique suivi de : (18.42 ; 16.75 ; 3.90 ; 3.02) mg EC/ g d'extrait respectivement pour les extraits suivant : Ex.Chl, Ex.Ac, Ex.Br, Ex.Aq.

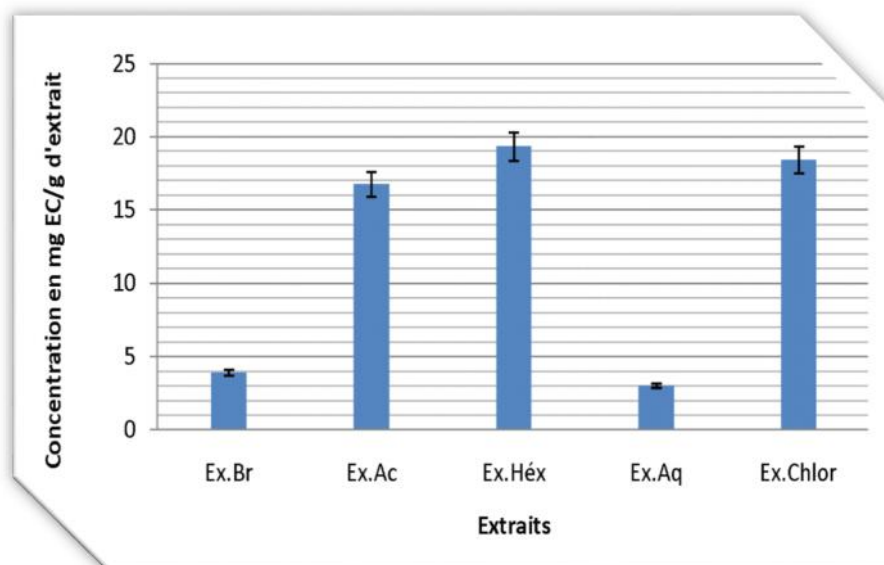


Figure 29 : Teneur en flavonoïdes totaux pour les cinq extraits des feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

III. 1. 3. 1. 3. Test de piégeage du radical libre DPPH

L'activité anti radicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH-H est formée (Bortolomeazzi *et al.*, 2007). L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration des différents extraits utilisés (Fig. 30) et du témoin (standards phénoliques) (Fig. 31) il s'agit de : vitamine C, catéchine, acide gallique, acide tannique, acide caféique (500 ; 250 ; 62.5 ; 31.25 ; 15.62) $\mu\text{g/ml}$.

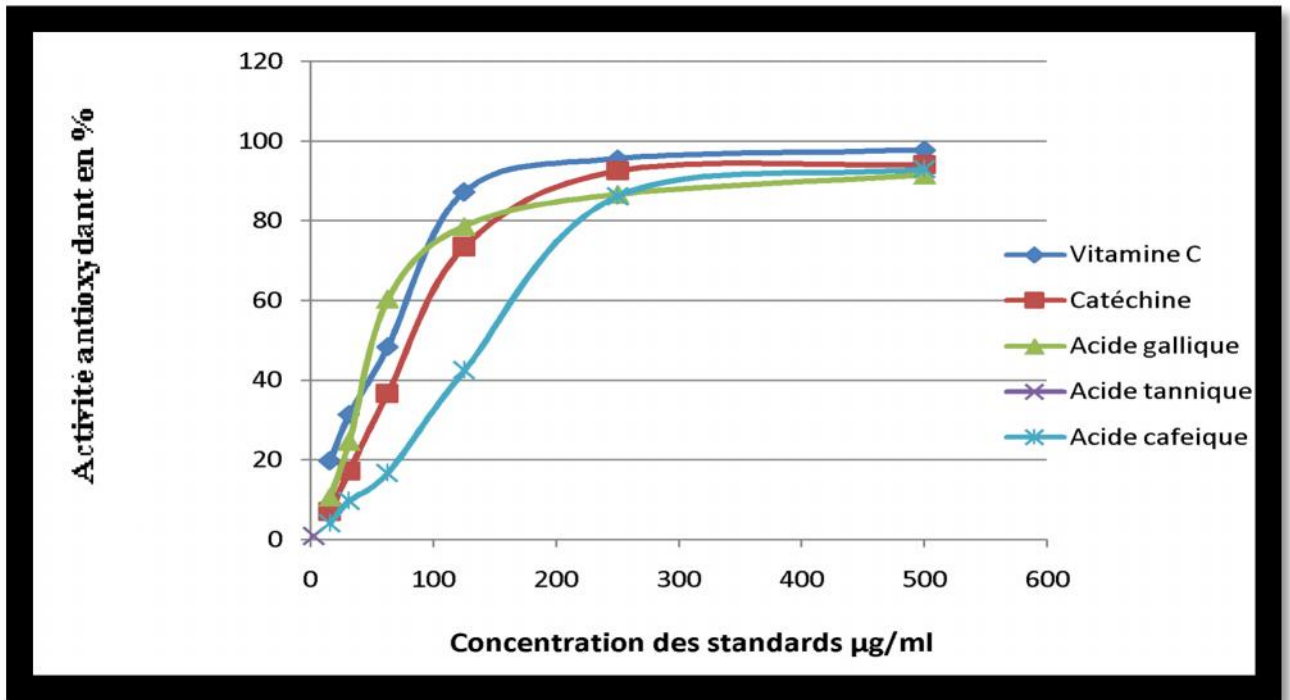


Figure 30 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration des standards.

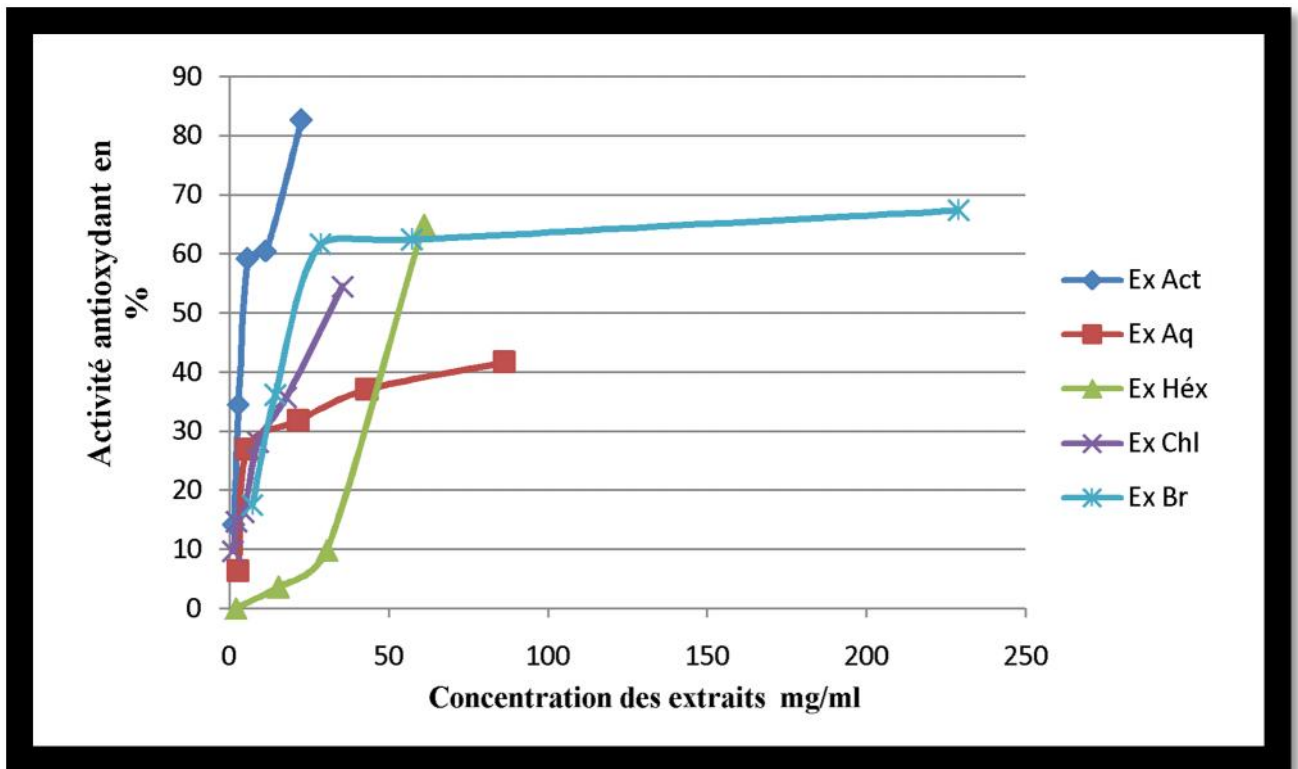


Figure 31 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration des extraits flavonoïques des feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

Les pourcentages d'inhibition du radical stable (DPPH) enregistré par les différents extraits flavonoïques et les standards phénoliques sont portés par les fig. (30-31). La lecture de ces résultats par spectrophotométrie à 515 nm a montré que qu'el que soit l'extrait flavonoïques ou le standard phénolique testé, les pourcentages d'inhibitions du radical stable (DPPH) augmente toujours avec l'augmentation des concentrations. Les pourcentages d'inhibitions les plus élevés sont obtenus avec les plus fortes concentrations (500 µg/ml pour les standards et 250 µg/ml pour les extraits).

L'activité antiradicalaire des extraits flavonoïques et des standards phénoliques évaluée par le test DPPH est exprimé par les concentrations minimales inhibitrices 50 (CI₅₀). La CI₅₀ est inversement liée à la capacité antioxydante de l'extrait testé, car elle exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur de la CI₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante est grande. Ces résultats sont regroupés dans le (Tabl. 14).

Tableau 14 : Concentrations minimales inhibitrices 50 (CI₅₀) des standards phénoliques et des extraits flavonoïques des feuilles de *R. alaternus*.

Standards	CI 50 (µg/ml)	Extraits flavonoïques	CI 50 (mg/ml)
Vitamine C	74,56	Ex. Br	8,64
Acide gallique	101,78	Ex. Hélix	9,98
Catéchine	143,78	Ex. Chl	54,08
Acide tannique	205,41	Ex. Ac	30,49
Acide caféique	201	Ex. Aq	74,16

Les résultats mentionnés ci-dessous montrent que les concentrations minimales inhibitrices 50 varient en fonction de l'extrait flavonoïques testé et de la partie végétative utilisée. Les valeurs des CI₅₀ sont de :

- Pour les extraits flavonoïques des feuilles de *R. alaternus* : Ex. Br (8,64 mg/ml), Ex. Hélix (9,98 mg/ml), Ex. Chl (54,08 mg/ml), Ex. Ac (30,49 mg/ml) et Ex. Aq (74,16 mg/ml).
- Pour les standards phénoliques : Acide ascorbique (74,56 µg/ml), Acide gallique (101,78 µg/ml), Catéchine (143,78 µg/ml), Acide tannique (205,41 µg/ml) et Acide caféique (201 µg/ml).

III. 1. 3. 1. 4. Activité antibactérienne

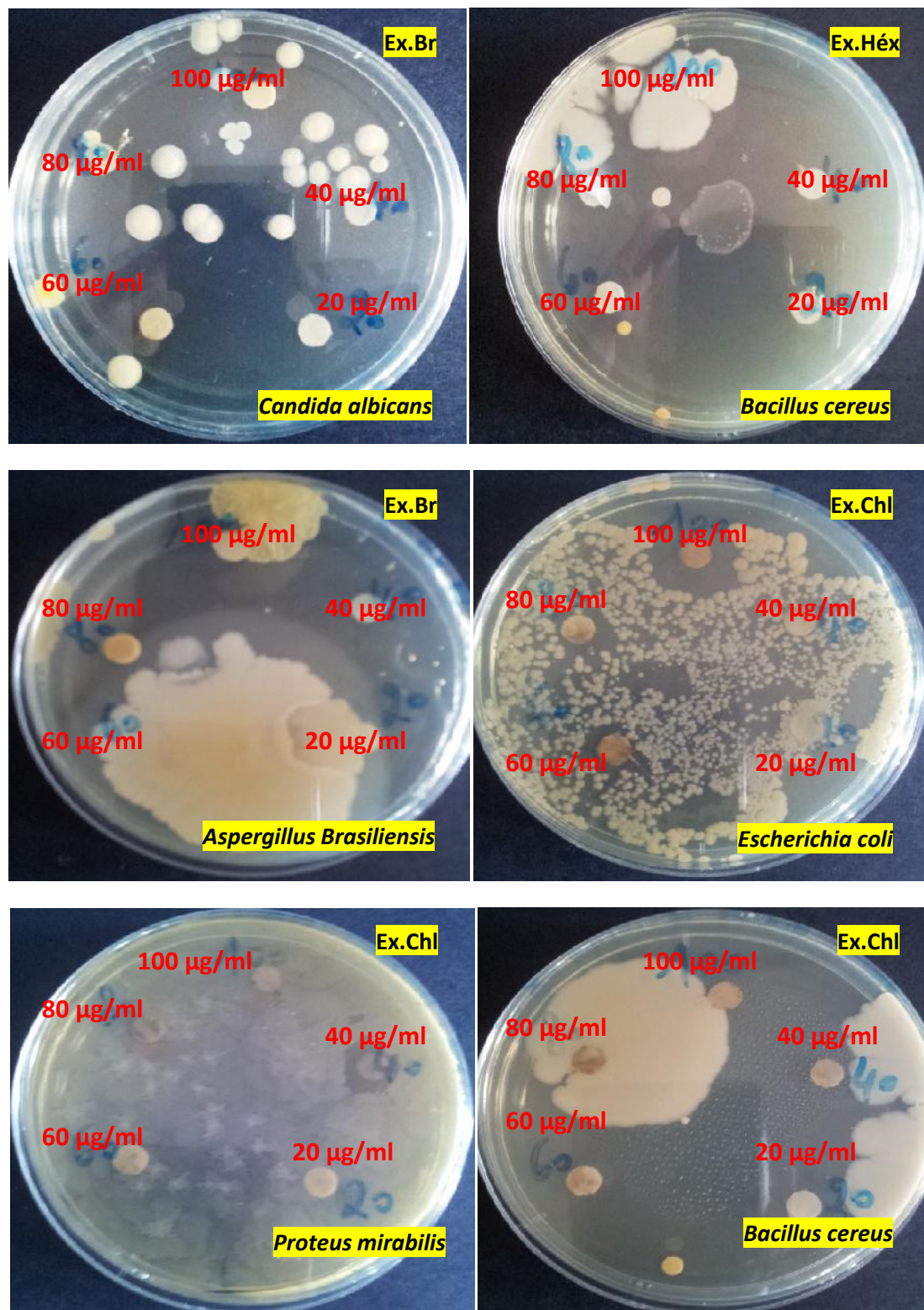
Le test de la sensibilité des bactéries et des champignons est réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé, encore appelée méthode des disques. L'activité antimicrobienne des extraits flavonoïques des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. est estimée en termes de diamètre d'inhibition autour des disques chargés des extraits flavonoïques à divers concentrations vis-à-vis de cinq souches microbiennes. Les résultats sont regroupés dans le tableau 15 et représentés sur la planche V.

Tableau 15 : Diamètres moyens des zones d'inhibition en mm (Moyenne \pm écart-type) et CMI ($\mu\text{g/ml}$) des extraits flavonoïques à partir des feuilles de *Rhamnus alaternus* L.

Extraits Flavonoïques	$\mu\text{g/ml}$	Diamètres des zones d'inhibition (en mm), concentration minimale inhibitrice (en $\mu\text{g/ml}$) et sensibilité des souches microbiennes									
		Bactéries						Champignons			
		<i>B. cereus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. mirabilis</i>		<i>A. brasiliensis</i>		<i>C. albicans</i>	
		D	S	D	S	D	S	D	S	D	S
Ex.Br	100	0	-	0	-	0	-	IT	++	14.6 \pm 1.30	+
	80	7.4 \pm 1.28	±	0	-	0	-	IT	++	6.6 \pm 1.15	±
	60	0	-	0	-	0	-	IT	++	11.7 \pm 1.05	+
	40	5.3 \pm 0.92	±	0	-	0	-	IT	++	0	-
	20	5 \pm 0.86	±	0	-	0	-	IT	++	10 \pm 1.73	+
								CMI = 6,25		CMI = 100	
Ex.Héx	100	10 \pm 1.73	+	0	-	0	-	IT	++	0	-
	80	8.3 \pm 1.44	±	0	-	0	-	IT	++	11.7 \pm 1.12	+
	60	8.3 \pm 1.44	±	3.3 \pm 0.57	±	0	-	IT	++	0	-
	40	16.6 \pm 1.44	+	5 \pm 0.86	±	0	-	IT	++	6.6 \pm 1.15	±
	20	20 \pm 1.73	+	0	-	0	-	IT	++	0	-
		CMI = 50						CMI = 6,25		CMI = 100	
Ex.Ch	100	13.3 \pm 1.25	+	5.6 \pm 0.98	±	0	-	IT	++	10 \pm 1.73	+
	80	6.6 \pm 1.15	±	0	-	0	-	IT	++	6.6 \pm 1.15	±
	60	20 \pm 0.5	+	0	-	0	-	IT	++	7.2 \pm 1.24	±
	40	0	-	0	-	5 \pm 0.86	±	IT	++	15 \pm 1.5	+
	20	14.4 \pm 1.26	+	0	-	IT	++	IT	++	8.3 \pm 1.44	±
		CMI = 100		CMI = 50				CMI = 6,25		CMI = 100	
Ex.Ac	100	10 \pm 1.73	+	6.6 \pm 1.15	±	0	-	IT	++	10 \pm 1.73	+
	80	13.3 \pm 1.25	+	8.3 \pm 0.76	±	0	-	IT	++	0	-
	60	0	-	6 \pm 1.03	±	0	-	IT	++	0	-
	40	0	-	0	-	0	-	IT	++	17 \pm 1.53	+
	20	8.3 \pm 1.44	±	0	-	0	-	IT	++	0	-
		CMI = 100						CMI = 6,25		CMI = 100	
Ex.Aq	100	0	-	0	-	0	-	IT	++	9.2 \pm 1.59	±
	80	6.6 \pm 1.15	±	0	-	0	-	IT	++	17 \pm 1.47	+
	60	6.6 \pm 1.15	±	0	-	0	-	IT	++	14.3 \pm 1.25	+
	40	6.6 \pm 1.15	±	0	-	0	-	IT	++	16.1 \pm 1.40	+
	20	8.3 \pm 1.44	±	0	-	0	-	IT	++	0	-
								CMI = 6,25		CMI = 50	

IT : inhibition totale de la croissance fongique, **D** : diamètre d'inhibition, **S** : Sensibilité, + : sensible, - : résistante, \pm : intermédiaire.

Planche V: Effet inhibiteur de quelques extraits flavonoïques des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. vis à vis les souches bactériennes



Au regard des résultats de l'activité antibactériennes des extraits flavonoïques des feuilles, nous avons observé que :

- Ex.Chl est celui qui a montré l'activité antibactérienne la plus élevée vis-à-vis de *B. cereus* avec des diamètres d'inhibitions allant de 6,6 mm à 33,3 mm. Sur *E. coli*, il est modérément actif enregistrant des auréoles dont le diamètre est de 5,6 mm. A 40 %, il est le seul extrait flavonique ayant inhibé *P. mirabilis* en enregistrant un diamètre d'inhibition de 5 mm.
- *E. coli* et *P. mirabilis* se sont révélés résistants n'enregistrant aucune zone d'inhibition contre ces deux extraits Ex.Br et Ex.Aq. Par contre les autres extraits Ex.Héx, Ex.Chl et Ex.Ac présentent une activité en inhibant la croissance de la bactérie *E. coli* avec des zone d'inhibitions allant de 3,3 mm à 8,3 mm.

Contrairement à l'activité antibactérienne, nous avons remarqué que tous les extraits flavonoïques analysés présentes une importante activité antifongique traduite par les diamètres d'inhibitions formés autour des disques :

- Tous les extraits flavonoïques sont révélé un bon fongistatiques en inhibant totalement la croissance de *A. brasiliensis*. Des diamètres d'inhibitions compris entre 6,6 mm à 17 mm vis-à-vis *C. albicans*.
- Ex. Br, Ex. Ac et Ex.Aq génèrent la plus forte activité fongistatique vis-à-vis *C. albicans* en enregistrant une auréole maximale allant de 10 mm jusqu'au 17 mm.
- On enregistre une inhibition remarquable avec des auréoles comprises entre 7,2 mm à 10 mm pour les autres extraits notamment Ex.Héx et Ex.Chl.

Une concentration minimale inhibitrice de 100 µg/ml est enregistrée avec Ex. Br sur *B. cereus* et *C. albicans*. La CMI de 50 µg/ml est notée chez Ex. Aq vis-à-vis *C. albicans*. Enfin une CMI de 6,25 µg/ml est enregistrée pour tous les extraits flavonoïques vis-à-vis *A. brasiliensis*.

III. 1. 3. 1. 4. 1. Classement des souches microbiennes et des extraits flavonoïques des feuilles

Pour mieux interpréter les résultats de la sensibilité des souches microbiennes testées vis-à-vis des extraits flavonoïques, les souches microbiennes ont été classées selon leurs sensibilités tableau 16.

Il ressort de ces résultats que :

- La bactérie la plus résistante est *P. mirabilis* avec un pourcentage de 92% suivi de *E. coli* avec 76% et enfin *B. cereus* avec 24%.

- La bactérie la plus sensible est *B. cereus* avec un taux de 32%.
- *C. albicans* est le champignon le plus résistant vis-à-vis des extraits flavonoïques utilisés avec un taux de 28%, à l'opposé *A. brasiliensis* présente un taux de sensibilité de 100%.

Tableau 16 : Classement des extraits flavonoïques des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. selon leurs effets antibactérien et antifongique et des souches microbiennes selon leurs sensibilités.

		Sensibilités							
		Résistante (-)		Intermédiaire (±)		Sensible (+)		Totaux	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Type de test et de souches	Extraits								
Test antibactérien	Ex.Br	12	80	3	20	0	0	15	100
	Ex.Héx	8	53	4	26	3	20	15	100
	Ex.Chl	8	53	4	26	3	20	15	100
	Ex.Ac	9	60	4	26	2	20	15	100
	Ex.Aq	11	73	4	26	0	0	15	100
Test antifongique	Ex.Br	1	10	2	20	7	70	10	100
	Ex.Héx	2	20	1	10	7	70	10	100
	Ex.Chl	0	0	3	30	7	70	10	100
	Ex.Ac	3	30	0	0	7	70	10	100
	Ex.Aq	1	10	1	10	8	80	10	100
	Souches microbienne								
Bactéries	<i>Bacillus cereus</i>	6	24	11	44	8	32	25	100
	<i>Escherichia coli</i>	19	76	6	24	0	0	25	100
	<i>Proteus mirabilis</i>	23	92	1	4	1	4	25	100
Champignons	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	0	0	0	0	25	100	25	100
	<i>Candida albicans</i>	7	28	6	24	12	48	25	100

N : Nombre de test

De même, les différents extraits flavonoïques testé, eux aussi ont été répartis selon leurs effets antibactériens et antifongiques (tab. 16). Ces résultats nous révèlent que :

- L'Ex.Héx, Ex.Chl et Ex.Ac sont les extraits flavonoïques qui ont enregistré les plus forts taux de tests sensibles avec des taux de 20% vis-à-vis des souches bactériennes et des taux de 70% vis-à-vis les souches fongiques. Les deux extraits restant notamment Ex.Br et Ex. Aq sont inactifs enregistrant des taux de 0% de test sensible contre les

souches bactériennes par contre l'Ex.Aq présente le taux le plus élevé de test sensible vis-à-vis les souches fongiques et le reste des extrait présente un taux de 70%.

- Concernant la résistantes des bactéries, l'Ex.Br était le moins actif avec 80% des tests résistant suivi respectivement par Ex.Aq, Ex.Ac et Ex.Chl et Ex.Héx avec 73%, 60% et 53% chacun. Pour la résistante des champignons, l'Ex.Ac est l'extrait flavonoïque le moins actif avec 30% suivi respectivement par Ex.Héx avec 20% et Ex.Aq ainsi que Ex.Br avec 10% par contre l'Ex.Chl présente un test sensible de 100%.

III. 1. 3. 1. 4. 2. Antibiogramme et antifongigramme

Les diamètres d'inhibition résultant des tests de sensibilité des souches microbiennes testées vis-à-vis des antibiotiques et des antifongiques commercialisés sont mentionnés dans le tableau 17 et illustré par la planche VI.

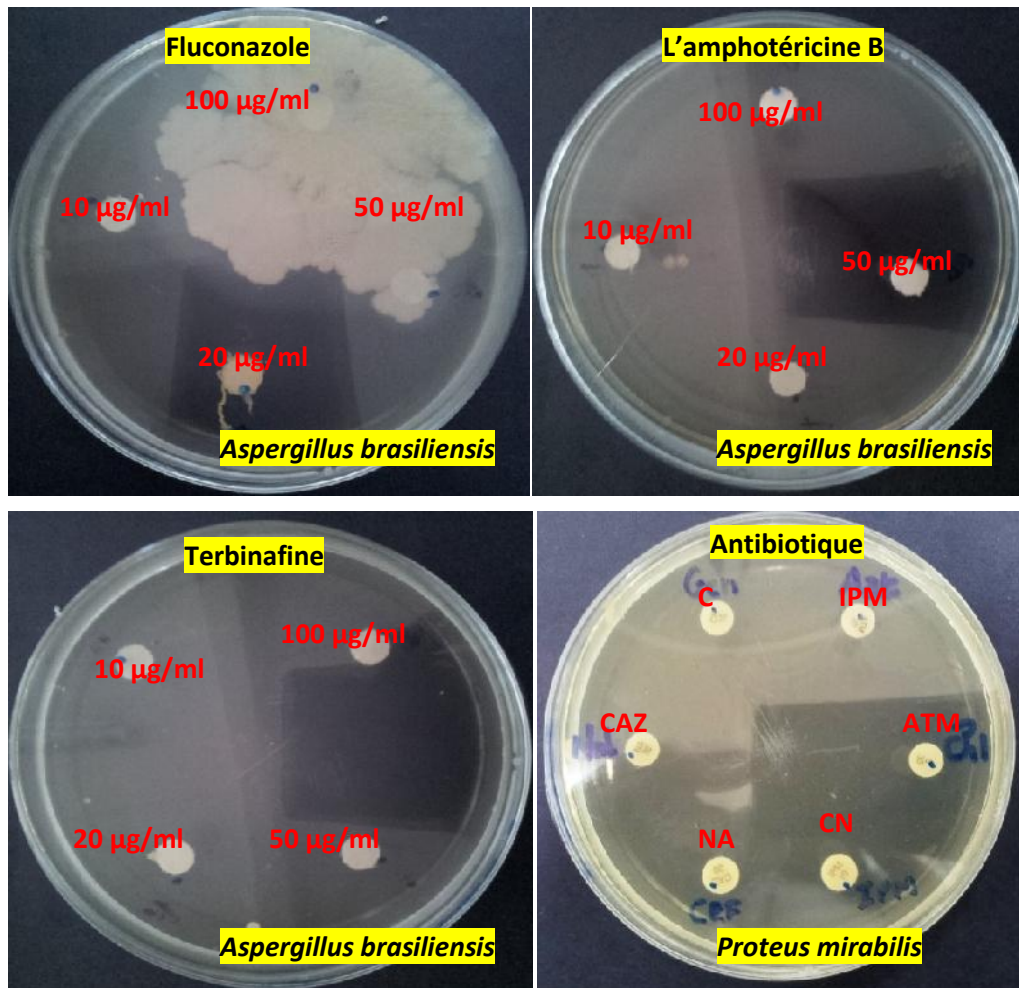
Tableau 17 : Diamètres moyens des zones d'inhibition en mm (moyenne \pm écart-type) et sensibilité des souches microbiennes vis-à-vis des antibiotiques et antifongiques commercialisés

Antibiotiques	$\mu\text{g/ml}$	Diamètres des zones d'inhibition et sensibilité					
		<i>B. cereus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. mirabilis</i>	
		D	S	D	S	D	S
CN	10	25	+	25	+	IT	++
ATM	30	0	-	30	+	IT	++
NA	30	25	+	25	+	IT	++
CAZ	30	0	-	27	+	IT	++
C	30	25	+	30	+	IT	++
IPM	10	30	+	30	+	IT	++
Antifongiques	$\mu\text{g/ml}$	<i>A. brasiliensis</i>		<i>C. albicans</i>			
		D	S	D	S		
AMB	100	IT	++	0	-		
	50	IT	++	0	-		
	20	IT	++	0	-		
	10	IT	++	0	-		
FLC	100	0	-	0	-		
	50	0	-	0	-		
	20	35	+	0	-		
	10	25	+	0	-		
TER	100	IT	++	0	-		
	50	IT	++	0	-		
	20	IT	++	0	-		
	10	IT	++	0	-		

CN : Gentamicine, ATM : Aztréonam, NA : Acide nalidixique, C : Chloramphénicol, CAZ : Ceftazidime, IPM : Imipénème, NA : Nitrate d'éconazole, AMB : l'amphotéricine B, FLC : Fluconazole, TER : terbinafine.

L'utilisation des antifongiques et des antibiotiques commercialisés a permis d'établir un antibiogramme et un antifongogramme, à partir desquels sont classées les souches microbiennes selon leurs sensibilités (Tab. 17). Les souches microbiennes choisies ne présentent aucune résistance vis-à-vis des antibiotiques et antifongiques commercialisés sauf pour l'antibiotique ATM (Aztréonam) et CAZ (Ceftazidime) qui n'ont aucun effet sur la bactérie *Bacillus cereus*, ainsi que la résistance totale de l'espèce fongique *Candida albicans* face aux antifongiques utilisés (AMB, FLC, TER). On enregistre des diamètres d'inhibition qui varient entre 25-35 mm. Les extraits flavonoïques ne présentent aucun effet sur la bactérie *Proteus mirabilis*. Ex.Ac, Ex.Chl, exerce un effet sur la bactérie *E. Coli* qui présente une sensibilité (+) à la concentration 100% où son diamètre d'inhibition varie entre (10.5-14) mm. Le test antifongique a révélé une inhibition totale de tous les extraits flavonoïques vis-à-vis l'espèce fongique *Aspergillus brasiliensis* sauf pour l'extrait Brut où le diamètre d'inhibition varie entre (8.3-25) mm et des diamètres d'inhibition entre (5-24.2) mm pour les mêmes extraits face à *Candida albicans*.

Planche VI : Effet inhibiteur des antibiotiques et antifongiques commercialisées vis-à-vis d'*Aspergillus brasiliensis*, *Proteus mirabilis*.



III. 1. 3. 2 Etude biochimique d'extraits flavonoïques des écorces de *Rhamnus alaternus* L.

III. 1. 3. 2. 1 Rendement des extractions

Les différents extraits obtenus après lyophilisation ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant. Les rendements ont été déterminés par rapport au poids total de la matière végétale réduite en poudre et par rapport à l'extrait méthanolique (l'extrait brut). Ces rendements sont représentés dans le tableau 18.

Tableau 18 : Rendement des différentes fractions flavonoïques

Extrait flavonoïques	Rendement % (au broyat)	Rendement % (à Ex.Br)
Ex.Br	31,28 %	100 %
Ex.Héx	9,12 %	29,15 %
Ex.Ch	5,68 %	26,08 %
Ex.Ac	0,52 %	1,66 %
Ex.Aq	7,76 %	24,08 %

Ex.Br : extrait brut ; **Ex.Héx** : extrait hexanique ; **Ex.Ch** : extrait chloroformique ; **Ex.Ac** : extrait d'acétate ; **Ex.Aq** : extrait aqueux.

Les extraits flavonoïques obtenus présentent différents aspects : pâteux, huileux et poudreux, de diverses couleurs vert foncé, marron clair, vert jaunâtre et vert clair. Ex.Br représente (31,28%) du poids de matière sèche des écorces, suivi Ex.Héx (9,12%), Ex.Aq (7.76%), Ex.Chl (5.68%), Ex.Ac (0,52%). Par rapport à l'extrait brut les rendements sont : 29,15%, 26,08%, 24,08%, 1,66% respectivement pour Ex.Héx, Ex.Chl, Ex.Aq, Ex. Ac.

La somme des pourcentages des quatre extraits par rapport à l'extrait brut est de 80,97 %, le fractionnement de l'extrait brute peut conduire à des pertes substantielles de matière, ces pertes représentent 19,03 %.

III. 1. 3. 2. 2 Teneur en flavonoïdes totaux des différents extraits

Les taux des flavonoïdes totaux des cinq extraits concernant la partie (écorce) ont été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage qui suit une équation de type : $y = 0.010 x + 0.064$ sachant que $R^2 = 0.990$. Les concentrations des flavonoïdes pour la partie des écorces sont relativement importantes dans les extraits dans leur majorité, les teneurs en flavonoïdes sont de 192.74 mg EC/g d'extrait dans l'extrait acétatique suivi de : (31.47 ; 20.38 ; 10.41 ; 3.44) mg EC/ g d'extrait respectivement pour les extraits suivant : Ex.Chl, Ex.Héx, Ex.Br, Ex.Aq.

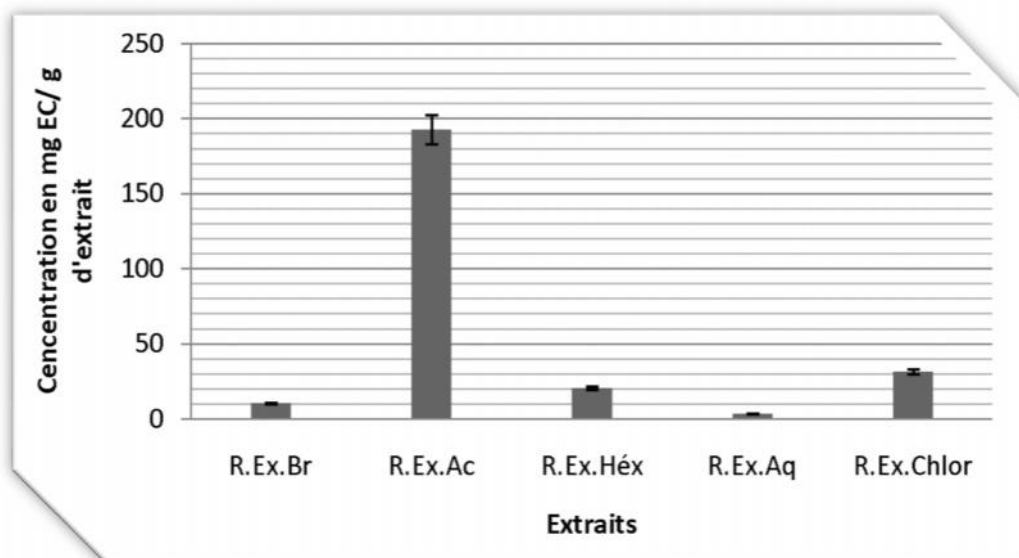


Figure 32 : Teneur en flavonoïdes totaux pour les cinq extraits des écorces de *Rhamnus alaternus* L.

V. IV. 2. 3. Test de piégeage du radical libre DPPH

L'activité antioxydante des extraits flavonoïques des écorces de *R. alaternus* ainsi que des standards phénoliques vis-à-vis du radical libre DPPH est évalué de la même manière que la précédente. Les pourcentages d'inhibitions du radical stable (DPPH) enregistrés par les différents standards phénoliques et les extraits flavonoïques sont portés sur les Fig. (33-34).

Les pourcentages d'inhibitions les plus élevés sont obtenus avec les plus fortes concentrations. En effet, quel que soit le standard phénolique utilisé ou bien l'extrait flavonoïque testé, les pourcentages d'inhibitions du radicale DPPH augmentent avec l'augmentation des concentrations.

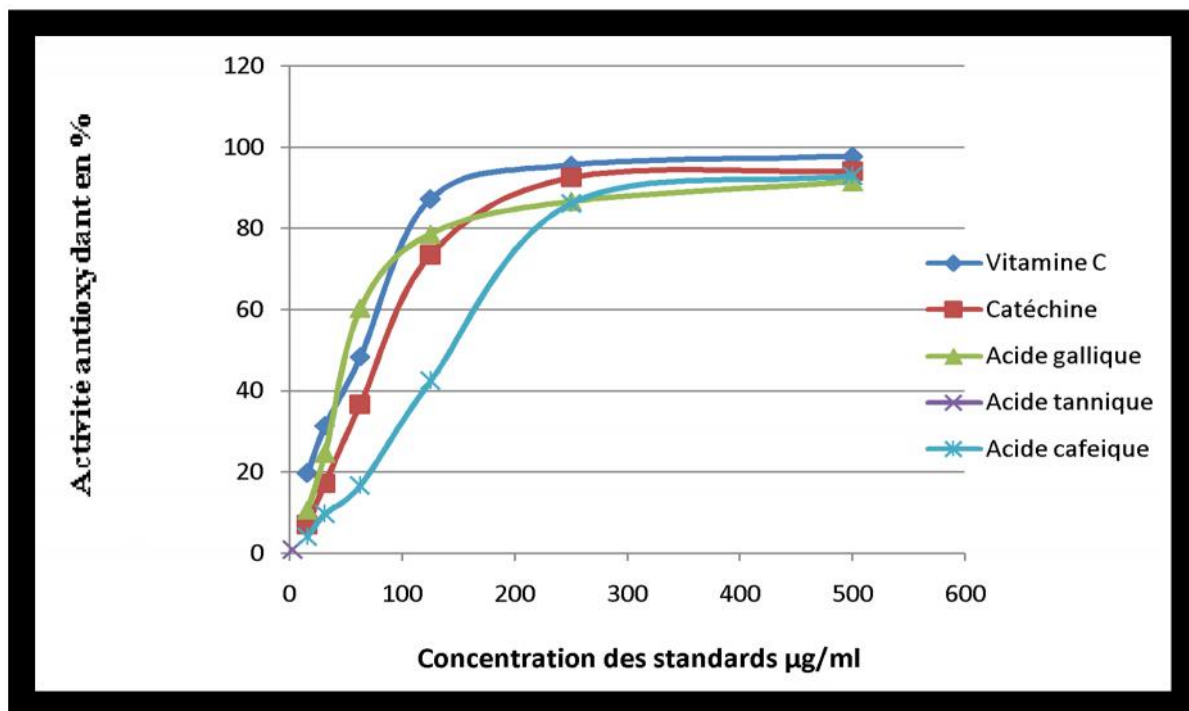


Figure 33 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration des standards.

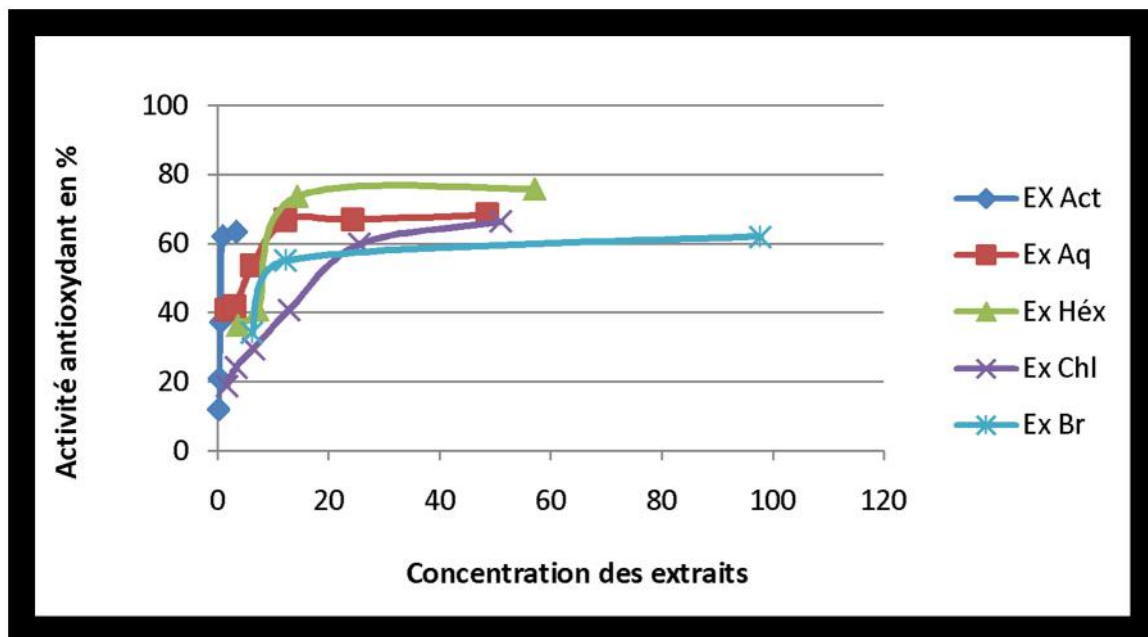


Figure 34 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration des extraits flavonoïques des écorces de *Rhamnus alaternus* L.

L'activité antiradicalaire des extraits flavonoïques des écorces de *R. alaternus* et les standards phénoliques évalués par le test DPPH est exprimé par les concentrations minimales inhibitrices 50 (CI₅₀). Ces résultats sont regroupés dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Concentrations minimales inhibitrices 50 (CI₅₀) des standards phénoliques et des extraits flavonoïques des écorces de *R. alaternus*.

Standards	CI 50 (µg/ml)	Extraits flavonoïques	CI 50 (mg/ml)
Vitamine C	74,56	Ex. Br	1,78
Acide gallique	101,78	Ex. Héc	4,08
Catéchine	143,78	Ex. Chl	9,79
Acide tannique	205,41	Ex. Ac	27,16
Acide caféique	201	Ex. Aq	48,37

Les résultats mentionnés ci-dessous montrent que les concentrations minimales inhibitrices 50 varient en fonction de l'extrait flavonoïques testé et de la partie végétative utilisée. Les valeurs des CI₅₀ sont de :

- Pour les extraits flavonoïques des écorces de *R. alaternus* : Ex. Br (1,78mg/ml), Ex. Héc (4,08mg/ml), Ex. Chl (9,79mg/ml), Ex. Ac (27,16mg/ml) et Ex. Aq (48,37mg/ml).
- Pour les standards phénoliques : Acide ascorbique (74,56 µg/ml), Acide gallique (101,78 µg/ml), Catéchine (143,78 µg/ml), Acide tannique (205,41 µg/ml) et Acide caféique (201 µg/ml).

III. 1. 4. 2. 4 Activité antibactérienne

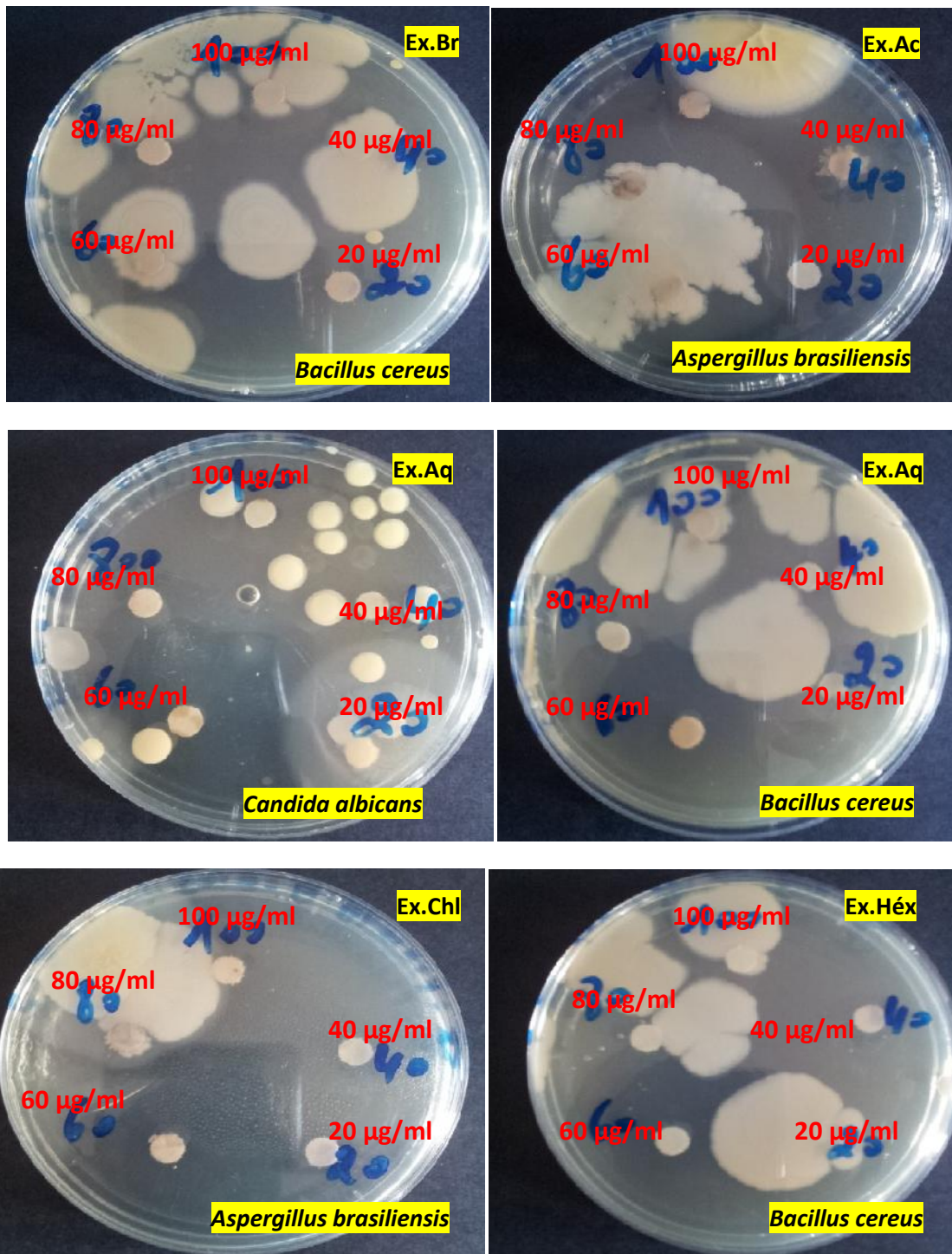
Les résultats des tests de sensibilité des souches microbienne testées vis-à-vis des extraits flavonoïques extraites des écorces de *R. alaternus* sont regroupés dans le tableau 20 et illustré par la planche VII.

Tableau 20 : Diamètres moyens des zones d'inhibition en mm (Moyenne \pm écart-type) des extraits flavonoïques à partir des écorces de *Rhamnus alaternus* L.

Extraits Flavonoïques	$\mu\text{g/ml}$	Diamètres des zones d'inhibition (en mm) et sensibilité des souches microbiennes									
		Bactéries						Champignons			
		<i>E. Coli</i>		<i>B. Cereus</i>		<i>P. mirabilis</i>		<i>A. brasiliensis</i>		<i>C. albicans</i>	
		D	S	D	S	D	S	D	S	D	S
Ex.Br	100	0	-	0	-	0	-	25 \pm 0.5	+	0	-
	80	0	-	14.4 \pm 1.26	+	0	-	16 \pm 1.38	+	17.3 \pm 1.50	+
	60	0	-	8.3 \pm 1.44	\pm	0	-	25.5 \pm 0.42	+	15 \pm 1.32	+
	40	0	-	9.1 \pm 1.57	\pm	0	-	8.3 \pm 1.44	\pm	15.8 \pm 1.01	-
	20	0	-	0	-	0	-	15 \pm 1.5	+	9 \pm 0.79	\pm
				CMI = 100			CMI = 6,25		CMI = 50		
Ex.Héx	100	0	-	0	-	0	-	IT	++	9 \pm 1.55	\pm
	80	0	-	0	-	0	-	IT	++	5.3 \pm 0.92	\pm
	60	0	-	5 \pm 0.81	\pm	0	-	IT	++	0	-
	40	0	-	9.3 \pm 1.61	\pm	0	-	IT	++	21.8 \pm 0.62	+
	20	0	-	5.6 \pm 0.98	\pm	0	-	IT	++	21.6 \pm 0.28	+
							CMI = 6,25		CMI = 50		
Ex.Ch	100	14 \pm 0.14	+	9.7 \pm 1.69	\pm	0	-	IT	++	24.2 \pm 0.38	+
	80	0	-	7.7 \pm 1.34	\pm	0	-	IT	++	6.4 \pm 1.11	\pm
	60	0	-	25 \pm 0.5	+	0	-	IT	++	15.6 \pm 1.40	+
	40	0	-	0	-	0	-	IT	++	11.6 \pm 1.04	+
	20	0	-	16.6 \pm 1.44	+	0	-	IT	++	13.3 \pm 1.25	+
				CMI = 100			CMI = 100		CMI = 6,25		CMI = 50
Ex.Ac	100	10.5 \pm 1.07	+	0	-	0	-	IT	++	8.3 \pm 1.44	\pm
	80	0	-	0	-	0	-	IT	++	12.7 \pm 1.11	+
	60	0	-	5 \pm 0.86	\pm	0	-	IT	++	16.4 \pm 1.42	+
	40	0	-	0	-	0	-	IT	++	5 \pm 0.86	\pm
	20	0	-	12 \pm 0.07	+	0	-	IT	++	20.2 \pm 0.73	+
				CMI = 100			CMI = 6,25		CMI = 25		
Ex.Aq	100	0	-	0	-	0	-	IT	++	5 \pm 0.86	\pm
	80	0	-	7.8 \pm 1.37	\pm	0	-	IT	++	11.9 \pm 1.04	+
	60	0	-	8.3 \pm 1.44	\pm	0	-	IT	++	22.4 \pm 0.23	+
	40	0	-	0	-	0	-	IT	++	20.4 \pm 0.47	+
	20	0	-	26 \pm 0,17	+	0	-	IT	++	5 \pm 0.86	\pm
				CMI = 50			CMI = 6,25		CMI = 25		

IT : inhibition totale de la croissance fongique, **D :** diamètre d'inhibition, **S :** Sensibilité, **+** : sensible, **- :** résistante, **\pm** : intermédiaire.

Planche VII : Effet inhibiteur de quelques extraits flavonoïques des écorces de *Rhamnus alaternus* L. vis à vis les souches bactériennes



Les résultats des tests antibactériens représentés ci-dessous montre que :

- L'Ex.Ch est l'extrait flavonoïque qui présenté le meilleur rendement bactériostatique vis-à-vis de *B. cereus* qui s'est montrée sensible à la majorité des tests réalisés. En effet, il a enregistré des diamètres d'inhibitions allant de 5 mm à 25 mm (le plus grand diamètre atteint par la souche).
- Seul l'extrait : Ex.Ch et Ex.Ac enregistrent une activité moyenne vis-à-vis d'*E. coli* donnant ainsi des zones d'inhibition comprises entre 9,22 mm et 26,1 mm.
- En revanche, sur la bactérie *P. mirabilis* tous les extraits avec ces différentes concentrations semblent inactifs et ne présente aucune activité bactériostatique.

En ce qui concerne l'activité antifongique, il ressort ce qui suit :

- L'Ex.Br a été remarquablement efficace sur *A. brasiliensis* enregistrant des auréoles comprises entre 8,3 mm à 25,5 mm.
- Les quatre extraits restant ont provoqué une inhibition totale de la croissance *A. brasiliensis*.
- Tous les extrais semblent actifs vis-à-vis la souche fongique *C. albicans* engendrant des zones d'inhibitions au niveau de toutes ces concentrations allant de 5 mm à 24,2 mm.
- L'Ex.Ch est l'extrait le plus actif vis-à-vis des deux souches fongiques testées. En effet, il inhibe complètement la croissance d'*A. brasiliensis*, et sur *C. albicans* a engendré au niveau de la concentration 100% un diamètre d'inhibition maximal de l'ordre de 24,2 mm.

Une concentration minimale inhibitrice de 100 µg/ml est enregistrée avec Ex. Chl et Ex. Ac sur *E. coli* et *B. cereus* enregistrée aussi avec Ex. Br sur *B. cereus*. La CMI de 50 µg/ml est notée chez Ex. Br et Ex. Chl vis-à-vis *C. albicans*. La CMI de 12,5 µg/ml est observée pour tous les extraits flavonoïques vis-à-vis *A. brasiliensis*.

Tableau 21 : Classement des extraits flavonoïques des écorces de *Rhamnus alaternus* L. selon leurs effets antibactérien et antifongique et des souches microbiennes selon leurs sensibilités.

		Sensibilités							
		Résistante (-)		Intermédiaire (±)		Sensible (+)		Totaux	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Type de test et de souches	Extraits								
Test antibactérien	Ex.Br	12	80	2	13	1	6	15	100
	Ex.Héx	12	80	3	20	0	0	15	100
	Ex.Chl	10	66	2	13	3	20	15	100
	Ex.Ac	12	80	1	6	2	13	15	100
	Ex.Aq	12	80	2	13	1	6	15	100
Test antifongique	Ex.Br	2	20	2	20	6	60	10	100
	Ex.Héx	1	10	2	20	7	70	10	100
	Ex.Chl	0	0	1	10	9	90	10	100
	Ex.Ac	0	0	2	20	8	80	10	100
	Ex.Aq	0	0	2	20	8	80	10	100
	Souches microbienne								
Bactéries	<i>Bacillus cereus</i>	10	40	10	40	5	20	25	100
	<i>Escherichia coli</i>	23	92	0	0	2	8	25	100
	<i>Proteus mirabilis</i>	25	100	0	0	0	0	25	100
Champignons	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	0	0	1	4	24	96	25	100
	<i>Candida albicans</i>	3	12	8	32	14	56	25	100

N : Nombre de test

Il ressort de ces résultats que :

- La bactérie la plus résistante est *P. mirabilis* avec un pourcentage de 100% des tests, suivi successivement par *E. Coli* avec 92% et *B. cereus* avec 40%.
- La bactérie la plus sensible est *B. cereus* avec un taux de 20% suivi par *E. coli* avec un taux de 8%.
- *C. albicans* est le champignon le plus résistant vis-à-vis les extraits flavonoïques utilisés avec un taux de 12% des tests réalisés, par contre *A. brasiliensis* ne présente aucune résistante vis-à-vis les extraits utilisés.
- Du point de vue de sensibilité, *A. brasiliensis* est la plus sensible avec un taux de 96% suivi par *C. albicans* avec 56%.

Du même, les différents extraits testés eux aussi ont été répartis selon leurs effets antibactériens et antifongiques. Ces résultats nous montrent que :

- L'Ex.Chl et l'Ex.Ac sont les deux extraits flavonoïques qui ont enregistré les plus forts taux de tests sensibles avec respectivement 20% et 13% suivis de deux extraits restant notamment l'Ex.Br et Ex.Aq avec 6% pour chacun vis-à-vis les souches bactériennes.

Pour les souches fongiques, L'Ex.Chl présente le test le plus sensible avec un taux de 90% suivi par Ex.Ac et Ex.Aq avec 80% pour chacun, l'Ex.Héx avec 70% et L'Ex.Br avec 60%.

III. 1. 4 Etude statistique

III. 1. 4. 1 Teneur en des extraits flavonoïques des deux organes (feuille et écorce) en flavonoïdes totaux

Les résultats de l'analyse de la variance à plusieurs critères de classification sont regroupés dans le tableau 22. Ces résultats montrent que les paramètres testés ainsi que leurs combinaisons à deux et à trois de classification ont un effet très hautement significatif ($P < 0,0001^{***}$). (Annexe 2).

Tableau 22 : Analyse de la variance à plusieurs critères de classification : Teneur de l'extrait flavonoïques des deux organes végétatifs en flavonoïdes totaux.

Source	DDL	SC	CM	F	P > F
Organe	1	7765,600	7765,600	35,793	0,000
Extraits	4	27736,551	6934,138	31,961	< 0,0001 ^{***}
Organe*Extraits	4	23423,108	5855,777	26,990	< 0,0001 ^{***}

DDL : degré de liberté ; SC : somme des carrés ; CM : carrés moyens ; F : Fischer ; P : probabilité.

Les résultats mentionnés ci-dessus montrent que les paramètres testés et leurs combinaisons à deux et à trois critères de classification présentent des différences : Très hautement significative ($^{***} P < 0,001$) : extraits, organe*extrait.

III. 1. 4. 2 Activité antioxydant des extraits flavonoïques des deux organes (feuille et écorce)

Les résultats de l'analyse de la variance à plusieurs critères de classification sont regroupés dans le tableau 23. Ces résultats montrent que les paramètres testés ainsi que leurs combinaisons à deux et à trois de classification ont un effet très hautement significatif ($P < 0,0001^{***}$) sur les pourcentages d'inhibition du radical stable (DPPH). (Annexe 3).

Tableau 23: Analyse de la variance à plusieurs critères de classification : effet de l'extrait flavonoïques des deux organes végétatifs sur l'activité antioxydant.

Source	DDL	SC	CM	F	P > F
Organe végétatif	1	6115,712	6115,712	104,853	< 0,0001***
Extrait flavonoïque	4	4319,632	1079,908	18,515	< 0,0001***
Concentration de l'extrait	5	23464,476	4692,895	80,459	< 0,0001***
Organe*Extrait	4	10941,369	2735,342	46,897	< 0,0001***
Organe*Concentration	5	1261,609	252,322	4,326	0,002**
Extrait*Concentration	20	4469,314	223,466	3,831	< 0,0001***
Organe*Extrait*Concentration	20	4847,200	242,360	4,155	< 0,0001***

DDL : degré de liberté ; SC : somme des carrés ; CM : carrés moyens ; F : Fischer ; P : probabilité.

Les résultats mentionnés ci-dessus montrent que les paramètres testés et leurs combinaisons à deux et à trois critères de classification présentes des différences :

- Très hautement significative (***) P 0,001) : organe végétatif, extrait flavonoïque, concentration de l'extrait flavonoïque, organe*extrait, extrait*concentration, organe*extrait*concentration.
- Significatif (** P 0,05) : organe*concentration.

III. 4. 1. 3 Pouvoir antimicrobien des extraits flavonoïques des deux organes (feuille et écorce)

Les résultats des analyses de la variance à plusieurs critères de classification sont regroupés dans le tableau 24. (Annexe 4).

Tableau 24 : Analyse de la variance à plusieurs critères de classification : effet de l'extrait flavonoïques, du type de la souche microbienne et l'organe végétatif sur le pouvoir antimicrobien.

Source	DDL	SC	CM	F	P > F
Organe végétatif	1	2,423	2,423	1,756	0,186
Extrait flavonoïque	4	19,692	4,923	3,567	0,007**
Concentration de l'extrait flavonoïques	4	2,539	0,635	0,460	0,765
Souche microbienne	4	780,056	195,014	141,313	< 0,0001***
Organe*Extrait	4	11,575	2,894	2,097	0,081
Organe*Concentration	4	12,234	3,059	2,216	0,067
Organe*Souche	4	7,260	1,815	1,315	0,264
Extrait*Concentration	16	19,309	1,207	0,874	0,599
Extrait*Souche	16	32,479	2,030	1,471	0,109
Concentration*Souche	16	10,027	0,627	0,454	0,966
Organe*Extrait*Concentration	16	30,442	1,903	1,379	0,150
Organe*Extrait*Souche	16	36,342	2,271	1,646	0,056**
Organe*Concentration*Souche	16	38,142	2,384	1,727	0,041**
Extrait*Concentration*Souche	64	63,126	0,986	0,715	0,948

DDL : degré de liberté ; SC : somme des carrés ; CM : carrés moyens ; F : Fischer ; P : probabilité.

Les résultats mentionnés ci-dessus montrent que les paramètres testés et leurs combinaisons à deux et à trois critères de classification présentes des différences :

- Très hautement significative (***) P 0,001) : souche microbienne.
- Significatif (** P 0,05) : extrais flavonoïques ; organe*extrait*souche et organe*concentration*souche.

III. 1. 5 Essai pharmacologique antihépatotoxique

III. 1. 5. 1 Etude phytochimique qualitative

Le rendement d'extraction obtenus en terme d'extrait sec lyophilisé ont été respectivement de 11,88 % (décocté aqueux), 6,57 % (macéré aqueux).

III. 1. 5. 2 Essais pharmacologiques antihépatotoxique

L'administration de tétrachlorure CCL₄ (0,5 ml/kg) provoque une monté significative

(p 0,01) des marqueurs sériques enzymatiques en particulier les transaminases (GOT /AST et GPT/ALT) et la phosphatase alcaline (ALP). De même on observe une augmentation significative de la bilirubine directe (DBil). Ce phénomène est surtout observé avec les rats du groupe témoin intoxiqué (groupe II) en comparaison avec les rats de groupe témoin normal (groupe I) comme indiqué dans le tableau 25.

Tableau 25 : Effet des extraits lyophilisés des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. (*Rhamnaceae*) sur les paramètres biochimiques enzymatiques des groupe contrôle normal, contrôle intoxiqué et des groupes tests (intoxiqués et traités).

Traitements	Doses (mg/kg)	SGOT (UI/L)	GPT (UI/L)	ALP (UI/L)	DBil (mg/dL)
Groupe I	-	403 ± 7,07	497 ± 4,24	65 ± 1,41	0
Groupe II	-	1004,5 ± 4,95	628 ± 1,41	121 ± 8,48	1,33 ± 2,30
Groupe III	100	797 ± 2,82 (34,49%)	552,5 ± 6,36 (57,63%)	97 ± 1,41 (42,85%)	0,75 ± 0,95 (43,75%)
Groupe IV	250	536 ± 4,24 (43,39%)	512 ± 5,65 (88,54%)	80 ± 7,07 (73,21%)	0 (100%)
Groupe V	250	745,5 ± 6,36 (43,06%)	518 ± 2,82 (83,97%)	82 ± 1,41 (69,64%)	0 (100%)

Chaque valeur est une moyenne et son écart-type (N = 6) ; valeur déterminées après 3 essais successifs.

Les extraits aqueux lyophilisés (décocté et macéré) administré à la même dose (250 mg/ml) entraîne une baisse significative du taux des enzymes sériques de la bilirubine directe (DBil) comparativement aux animaux du groupe contrôle intoxiqué (groupe II). Du point de vue de l'activité pharmacologique, la régression des paramètres biologiques (transaminases, phosphatases alcaline et bilirubine directe) constaté dans les groupes tests notamment les groupes IV, V intoxiqués et traités est un signe manifeste de la capacité de ces extraits à réduire l'hépatotoxicité provoquée par l'administration du toxique organochloré (CCL₄, 0,5ml/kg). Ce pouvoir réducteur intrinsèque des extraits étudiés vis-à-vis de l'intoxication provoquée est exprimé en pourcentage de réduction de l'hépatotoxique. Le tableau ci-dessous (tab. 25) résume les effets anti-hépatotoxique des extraits de la drogue sur les différents paramètres biochimiques impliqués dans l'hépto-intoxication.

III. 1. 5. 3 Effets antihépatotoxique comparatifs

Le pourcentage de réduction du toxique par l'extrait de drogue est un critère d'appréciation de l'effet antihépatotoxique de ces derniers (extrait). Le pourcentage moyen de réduction obtenu à partir des résultats permet de classer les extraits étudiés selon leur degré d'efficacité antihépatotoxique pour les (04) paramètres biochimiques déterminés (Tab. 26).

Tableau 26 : Comparaison des effets antihépatotoxique des extraits étudiés au regard du pourcentage moyen de réduction de l'hépatotoxique (CCL₄ ; 0,5 ml/ kg).

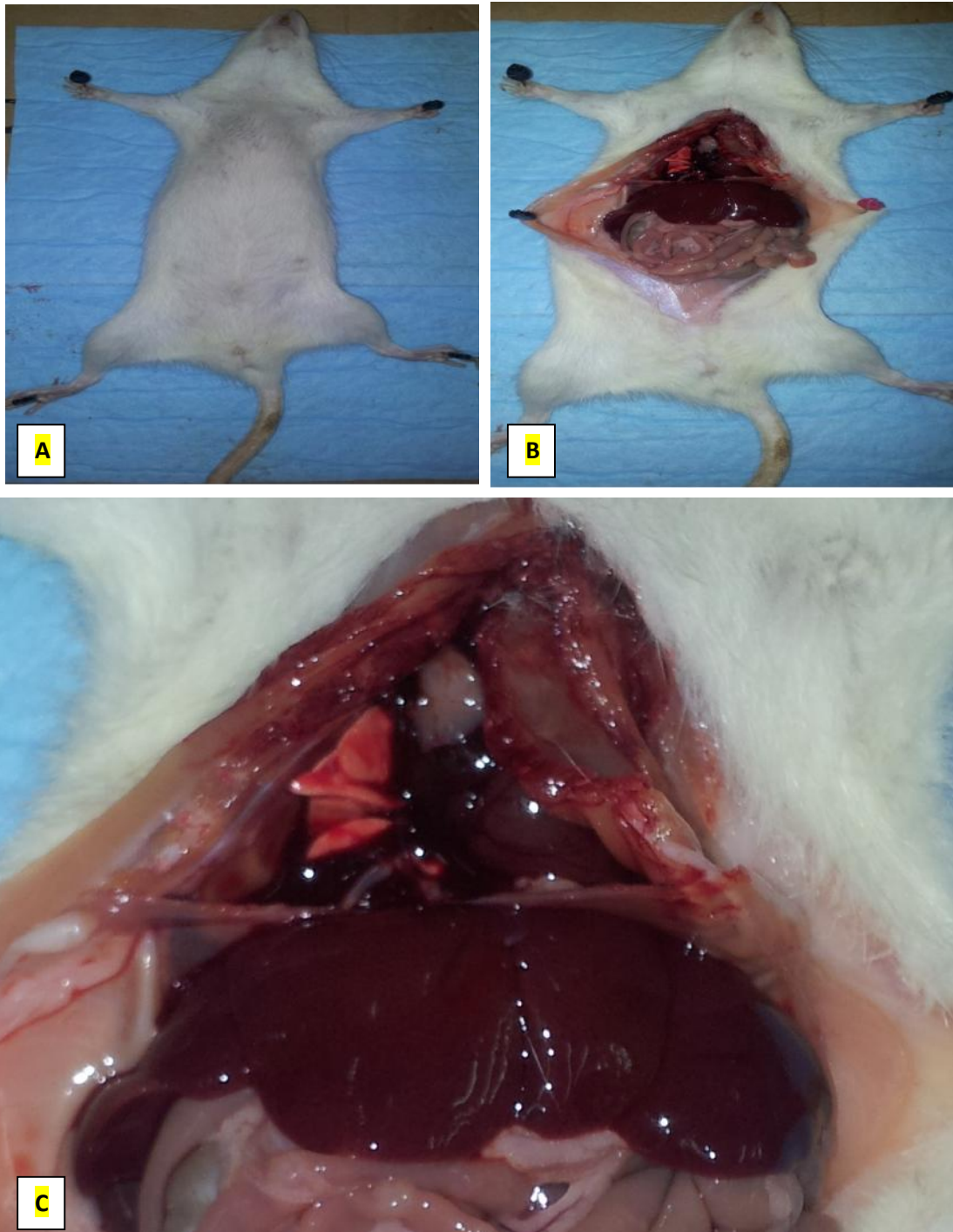
Extraits testés	Doses (mg/kg)	Pourcentage moyen de réduction/ensemble des 4 paramètres biochimiques
Silymarine	100	44,68 %
Décocté lyophilisé	250	76,28 %
Macéré lyophilisé	250	74,16 %

Pour la mise en évidence de l'effet des extraits testés (groupe : III, IV, V) sur les paramètres biochimiques du test antihépatotoxique, des analyses de la variance à deux critères de classification sont réalisées au seuil de 5 %. Nous considérons que la différence est : non significative ($P > 0,05$), significative ($P \leq 0,05$). Ces analyses sont exécutées par logiciel XLSTAT 2012 en utilisant le test de Tukey pour les comparaisons deux à deux indiqué dans le tableau N 27. (Annexe 5).

Tableau 27 : Comparaison des différentes groupes (Normal, normale intoxiqué, groupe test) avec les différentes paramètres biochimiques (TGP/TGO, ALP, DBil) en utilisant test de Tukey :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	P > F
Groupe	4	184415,350	46103,837	2305,192	< 0,0001
Paramètre	3	3459727,30	1153242,433	57662,122	< 0,0001
Groupe*Paramètre	12	279688,450	23307,371	1165,369	< 0,0001

Planche VIII : Différentes étapes de la dissection de l'animal



A: L'animal est placé dans une cuve à dissection puis est épinglé dans celle-ci., **B** : réalisation de l'incision afin d'accéder aux différents organes en étirant la peau. **C** : Prélèvement du sang par ponction cardiaque en ouvrant la cage thoracique.

III. 2 Discussion

III. 2. 1 Etude écologique

Les caractères physicochimiques de la station étudiée, présente un pourcentage important de sable et une quantité de limon non négligeable. Les travaux antérieurs sur la région de Tessala évoquent que la couleur des sols est très hétérogènes ; on y trouve des sols Jaunâtres, noirâtres, d'autres rougeâtre et des sols marrons claire (Ferka-Zazou, 2006).

Pouquet (1952), affirme que les structures grumeleuses sont majoritaires sur les différents sols. Il ajoute que la texture sableuse et la texture équilibrée sont caractéristiques des sols de la région de Tessala. Nos résultats corrobore avec ceux de l'auteur, étant donné que la prédominance de la structure équilibrée à été observé sur notre station d'étude.

Le potentiel hydrogène (pH = 7,78) est légèrement alcalin, selon Dajoz (1982), le pH n'est pas une caractéristique stable du sol mais dépend des différents cations absorbés de la nature de la couverture végétale, ainsi que des conditions climatiques. Il est aussi lié à la quantité du calcaire présente dans le sol, à la composition minérale et à la salinité du sol (Valles, 2006).

La conductivité électrique (CE = 0,08) indique un sol non salé. Ce taux est en relation avec la profondeur, la texture, l'évaporation ainsi que l'humidité du profil (Bendaanoun, 1981).

L'humidité (H = 14) sur le sol étudié dépend de la nature du substrat, la nature de l'humus et de la période de prélèvement (Bonin, 2006). Cependant, la teneur du sol en matière organique évoque des quantités riches et moyennes.

La fluctuation des conditions pédologiques, peut avoir des répercussions sur le cortège floristique qui accompagne cette espèce. D'après Quezel et *al.* (1988), la richesse spécifique est la première approche pour évaluer la biodiversité.

La richesse spécifique de la station étudiée est de 35 espèces s'explique par le fait que la répartition de la flore est en relation avec les différents facteurs du milieu, le pâturage ovin et les coupes qui participent fortement à la dégradation des formations végétales, elle est de ce fait qualifiée de moyenne selon la classification de Daget et Poissonet (1991, 1997).

Sur la base du relevé floristique réalisé, 34 espèces ont été inventoriées. Elles se rattachent à 21 familles botaniques différentes avec une prédominance des *Liliaceae*, des *Asteraceae*. Cette importance s'explique par leur contribution globale au sein de la flore de Tessala et par leur aire de répartition méditerranéenne.

Selon l'analyse floristique, les herbacées annuelles et les herbacées vivaces détiennent la première place. Cet accroissement est dû à l'envahissement des Thérophytes et des Hémicryptophyte. Pour Roman (1987) « il y a une bonne corrélation entre les types biologique et de nombreux caractères phénomorphologique ». De plus, l'action anthropique exerce une influence sur la répartition morphologique des espèces. Cependant, Le Floc'h (2001) affirmait que les ovins et les caprins apprécient différemment les espèces classées par type morphologiques principaux (Ligneuses, dressées, herbacées vivaces, annuelle... ect). Les ovins apprécient les espèces annuelles et presque indifféremment du stade biologique où elles se trouvent, alors que les caprins au contraire ne consomment que peu les annuelles.

La composition du spectre biologique accuse une prédominance des Thérophytes (37%). Cette proportion élevée s'explique par les conditions édaphiques et surtout microclimatique, où la période hivernale et printanière est relativement humide, alternant avec une période assez prolongée de sécheresse (Henaoui, 2007). De plus Floret *et al.* (1990), signalent que lorsqu'un système est influencé par l'homme les Thérophytes prennent de l'ampleur, ce qui témoigne la forte pression anthropique que subit la région de Tessala.

Malgré l'importance des Thérophytes, les hémicryptophyte gardent une place particulièrement importante avec un taux de 33%. Cela peut s'expliquer par la richesse de sol en matière organique ; phénomène confirmé par Barbéro *et al.* (1989).

Les Phanérophytes et les géophytes viennent en troisième position avec une proportion d'ordre 15%. Ce dernier type biologique est décrit comme étant le mieux adapté à l'aridité et s'installe proportionnellement au fur et à mesure qu'il y a adaptation des milieux forestiers (Ghezlaoui, 2011).

Sur le plan biogéographique nous avons pris en considération l'inventaire des espèces présentes au niveau des monts de Tessala. Cette dernière se distingue par une distribution hétérogène des espèces où dominant les formations des matorrals, et des garrigues. La formation qui joue encore un rôle pré forestier et forestier est principalement la chênaie verte.

La distribution des éléments phytochoriques est très hétérogène. Quézel (1983) explique la diversité biogéographique de l'Afrique par les modifications climatiques durement subies dans cette région depuis le Miocène, ce qui entraîne la migration d'une flore tropicale. Le type Méditerranéen est très élevé avec un taux de 42,85%.

III. 2. 2 Rendement et teneur des extraits flavonoïques des feuilles et des écorces

L'extrait brute représente le meilleur rendement par rapport aux autres extraits pour les deux organes (feuille et écorce) de la même espèce étudié (*Rhamnus alaternus* L.), il est suivi respectivement par l'extrait aqueux, l'extrait d'acétate d'éthyle, l'extrait chloroformique et l'extrait hexanique pour la partie végétative « feuille » et de l'extrait hexanique, l'extrait chloroformique, l'extrait aqueux et l'extrait d'acétate d'éthyle pour les écorces. Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement d'extraction n'est que relatif et semble être lié aux propriétés génétiques de l'espèce utilisée, à la nature des organes pour une même espèce (Bruneton, 1999), à l'origine géographique (Narayana *et al.*, 2001), aux conditions de récolte (Lin et Weng 2006), et aux méthodes d'extraction appliquées (Markham, 1982).

En outre, le calcul des rendements permet d'apprécier les extraits totaux que nous pouvons tirer de chaque espèce. Ces rendements permettent également d'envisager la quantité des organes à prélever en cas de besoins pour une éventuelle étude similaire ; ce qui rendait l'utilisation rationnelle et donc durable des espèces visées.

En plus de ces aspects quantitatifs, quelle que soit la méthode d'extraction appliquée, elle doit tenir compte de la qualité de l'extrait (bio-activité de ces principes actifs). Dans la présente étude, la méthode de macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant avec l'extrait. De même, le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet d'obtenir le maximum de composés (Poirot, 2007 ; Besombes, 2008).

La méthode utilisée est très recommandée pour l'extraction de ce type de composé, en utilisant des solvants à polarité croissante permet d'épuiser successivement la matière végétale, permettant ainsi de séparer les composés de l'extrait brut selon leur degré de solubilité dans les solvants d'extraction (Markham, 1982).

La teneur en flavonoïdes totaux présente une différence très hautement significative (***) p 0,0001) entre l'extrait acétatique des écorces et les extraits flavonoïques à partir des feuilles de *R. alaternus*.

L'extrait acétatique des écorces présente la plus grande teneur en flavonoïdes estimé de 192.74 mg EC/ gr d'extrait. Ces résultats peuvent être ajoutés à celle trouvé par (Djeridane *et al.*, 2007) qui est de 1 mg EQ/ g de MF pour un extrait éthanolique de la même espèce de la région de Laghouat, (Ben ammar *et al.*, 2007) qui sont respectivement 28 et 21 mg EQ/100g de matière fraîche pour les extraits méthanolique et aqueux des feuilles de la même espèce de

la région de la Tunisie, (Ben ammar et *al.*, 2008) soit des teneurs de 15 et 20 mg EQ/g de matière fraîche pour des extraits méthanoliques des écorces des racines et des feuilles respectivement. Toutefois, il est difficile de comparer les résultats obtenues avec ceux de la bibliographie car l'utilisation de différentes méthodes d'extraction et de quantification réduit la fiabilité d'une comparaison entre les études (Lee et *al.*, 2004). En plus, plusieurs paramètres peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques car des études ont montré que les facteurs extrinsèques tels que les facteurs géographiques, climatiques et environnementaux) (Ebrahimi et *al.*, 2008), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la période de récolte ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (Aganga et Mosase, 2001 ; Pedneault et *al.*, 2001 ; Miliauskas et *al.*, 2004 ; Fiorucci, 2006).

III. 2. 3 Activité antioxydant

L'activité antioxydant des extraits flavonoïques des feuilles et des écorces de *R. alaternus* est exprimée en en concentration d'inhibitrice 50 (CI₅₀). Ces deux paramètres sont employés par plusieurs chercheurs pour présenter l'activité antioxydante de différentes métabolites secondaires extraits de diverses plantes (Atoui et *al.*, 2005 ; Wang et *al.*, 2008).

Tous les extraits ont un pouvoir antiradicalaire envers le DPPH plus la valeur de l'CI₅₀ est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant (Kadri et *al.*, 2011).

En effet, les plus forte CI₅₀ sont notées chez les extraits les extrais bruts (méthanoliques) des deux partie feuilles et écorces avec (8,64 mg/ml et 1,78 mg/ml), suivie par les autres extrais, tandis que la plus faible CI₅₀ est enregistré chez extrait aqueux et l'extrait chloroformique à partir des feuilles avec (74,16 et 54,05 mg/ml) suivi par l'extrait aqueux à partir des écorces de la même espèce avec (48,37 mg/ml). Il est impossible se sélectionner un solvant organique standard destiné à l'extraction des antioxydants végétaux (Addai et *al.*, 2013).

La plus part des études menées sur ce contexte expliquent les variations de l'activité antioxydante en fonction des solvants d'extraction par la polarité de ces derniers qui influent sur les rendements d'extraction et par conséquent sur la composition phytochimique et sur le potentiel antioxydant (Barwick, 1997 ; Kolar et *al.*, 2002 ; Yang et *al.*, 2014).

Certains auteurs ont suggéré que la variation de l'activité antioxydante en fonction des solvants d'extraction est due essentiellement à leurs variabilité dans leurs profils d'absorbance de DPPH (Shizuka et Kawabata, 2005 ; Sharma et Bhat, 2009). Autres chercheurs ont démontré qu'il existe une corrélation entre l'activité antioxydante et l'intensité de la couleur de l'extrait ; ils ont remarqué qu'un extrait de couleur foncée à une teneur élevée en

polyphénols et par conséquent une forte activité antioxydante (Frankel et *al.*, 1998 ; Bretta et *al.*, 2005). Cette constatation n'est pas été confirmée par notre étude car l'extrait acétatique à partir des écorces de notre espèce d'étude présente une forte teneur en flavonoïdes totaux et une activité antioxydante moyenne par rapport aux autres extraits flavonoïques.

L'activité antioxydante des extraits flavonoïques de *R. alaternus* varie significativement ($P < 0,0001$) selon la nature de l'extrait flavonoïque. L'extrait méthanolique pour la partie des écorces présente une forte activité antioxydante par rapport aux autres extraits utilisés avec une valeur de (1.78 mg/ml). Les standards phénoliques testés ont enregistré de très bonnes concentrations inhibitrices 50 (CI₅₀). L'acide ascorbique est l'antioxydant le plus puissant avec une CI₅₀ = 74,56 µg/ml, suivi respectivement par l'acide gallique, catéchine, acide caféique et l'acide tannique avec des CI₅₀ de 101,78 µg/ml, 143,78 µg/ml, 201 µg/ml et 205,41 µg/ml. En comparant ces CI₅₀ avec celles enregistrées par les extraits flavonoïques des deux organes végétatifs, nous remarquons que ces résultats restent plus au moins loin à celles trouvées chez les antioxydants commercialisés notamment à la vitamine C (Acide ascorbique) qui est de (74.78 µg/ml).

Une étude menée (Ben ammar et *al.*, 2008) sur la même espèce de plante de la Tunisie a montré des CI₅₀ de 7 et 19 µg/ml des écorces des racines et des feuilles respectivement, lorsque l'extraction a été menée par le méthanol suivie par une extraction dans le butanol saturé en eau. Cette valeur est nettement inférieure à celle trouvée avec nos extraits.

Il est très difficile de comparer les résultats obtenus avec ceux de la bibliographie. En effet, l'activité antioxydante des végétaux est influencée par plusieurs facteurs tels que la méthode d'extraction (Heimler et *al.*, 2006 ; Parente et *al.*, 2013), les solvants d'extraction (Tiwari et *al.*, 2011), les conditions de séchage (Hossain et *al.*, 2010), l'organe végétal analysé (Dominguez-Avila et *al.*, 2013 ; Jain et *al.*, 2014), le stade végétatif (Chouaieb et *al.*, 2012), la saison de prélèvement (Howard et *al.*, 2003 ; Ni et *al.*, 2012) et les stress environnementaux (Alexieva et *al.*, 2001 ; Herbingner et *al.*, 2002).

Plusieurs auteurs expliquent que l'influence de la région biogéographique ainsi que la localité d'échantillonnage sur l'activité antioxydante est due essentiellement aux variations édaphiques et climatiques qui conduisent à des différences dans la composition chimique des métabolites bioactifs et éventuellement d'autres composantes mineurs, qui peuvent agir sur la capacité antioxydante (Ghedolf et *al.*, 2002 ; Bhojar et *al.*, 2011 ; Pineli et *al.*, 2012). D'autres chercheurs affirment que ces variations peuvent être liées à différents facteurs, tels que l'humidité et l'altitude (Perna et *al.*, 2014) et la température (Yu et *al.*, 2003 ; You et *al.*,

2004 ; Zhou et *al.*, 2004) qui affectent l'état physiologique de la plante et ainsi la biosynthèse phénolique et par conséquent la production des antioxydants.

En outre, dans le but d'identifier les sites potentiels au sein des flavonoides qui sont responsables de l'effet antiradicalaire vis-à-vis du radical DPPH, plusieurs travaux ont étudié le mécanisme réactionnel des flavonoides avec ce radical stable. Amic et *al.*, (2003) ont mis en évidence la relation structure fonction de 29 flavonoides (flavones, Flavonol et flavanones) et leurs capacités de piéger le DPPH. Les résultats de cette étude ont montré que les flavonoides les plus efficaces sont ceux qui renferment des groupements hydroxyles sur le cycle B.

La capacité antioxydante de deux composés flavonoïques isolés à partir des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. (K3O-ir) et (R3O-ir) ont également été évalué par leurs capacités à piéger O₂⁻ par NBT/ riboflavine, les résultats ont indiqués que K3O-ir (CI₅₀ = 18,75 µg/ml) était plus efficace que R3O-ir (CI₅₀ = 22,5 µg/ml) (Bhourri et *al.*, 2011).

Une étude menée par Kosalec et *al.*, (2013) sur des extraits flavonoïques à partir des écorces de *Rhamnus alaternus* L. a montré une teneur en flavonoides totaux de 33,6 mg/g et une concentration inhibitrice 50 (CI₅₀ = 78,7 µg/ml) vis-à-vis le radical libre DPPH.

Les résultats de cette étude avec celles menées par Ben Ammar et *al.*, (2008) sur la réactivité des extraits flavonoïques avec les radicaux libres DPPH ont montré qu'il existe une corrélation entre la teneur phénolique et l'activité antiradicalaire cité aussi dans les travaux de nombreux chercheurs ((Mohd-Esa et *al.*, 2010; Oliveira et *al.*, 2008; Orhan et *al.*, 2009; Perez et *al.*, 2011).

III. 2. 4 Activité antibactérienne

L'antibiogramme a montré que les souches bactériennes testées sont toutes sensibles à la gentamicine, acide nalidixique et chloramphénicol avec des diamètres d'inhibitions allant de 25 mm jusqu'au 30mm. Cette sensibilité est due au fait que ces antibiotiques ont un large spectre d'action agissant préférentiellement sur les bactéries Gram + que les bactéries Gram – (Peyret, 1991).

L'antifongigramme a révélé que les la souche fongique *C. albicans* présente une résistance vis-à-vis les antifongiques utilisés notamment : l'Amphotéricine B, Terbinafine et Fluconazole. Par contre ces antifongiques présentent un spectre d'activité allant jusqu'à l'inhibition total de la croissance de l'espèce fongique *A. brasiliensis*.

L'activité antibactérienne des extraits flavonoïques et les tests de sensibilité réalisés permettent de classer les extraits flavonoïques selon leurs effets. Toutes les souches bactériennes présentent une sensibilité intermédiaires avec un pourcentage de 10% jusqu'au 26% et des zones d'inhibition de 3.3 jusqu'au 20 mm pour les extraits flavonoïques des feuilles par contre les extraits flavonoïques des écorces de la même espèce un pourcentage de 6% jusqu'au 20% et des zones d'inhibition de 5 jusqu'au 26 mm sauf pour la souche bactérienne *Proteus Mirabilis* qui est une bactérie Gram – présente une résistance total vis-à-vis des différentes extraits flavonoïques.

La pluparts des auteurs associent la résistance de *P. mirabilis* aux extraits végétaux par sa résistance naturelle a une large gamme d'antibiotiques tels que tétracyclines et les nitrofurantoïne (Ngoune et al., 2009). D'autres chercheurs expliquent que c'est l'acquisition des pénicillinases et des B-lactamases qui est la cause principale de cette résistance (Hammer et al., 2010).

Plusieurs travaux mettent en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram + par rapport aux bactéries Gram - (Hayouni et al., 2007 ; Koné et al., 2004). Cela peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram -. En effet, les bactéries Gram – possèdent couche additionnelle à la membrane externe, composé de phospholipides ; de protéines et de lipopolysaccharides formant une barrière imperméable à la plupart des molécules hydrophobes (Georgantelis et al., 2007).

Toutefois, il est difficile de comparer les résultats obtenus dans notre étude avec ceux de la bibliographie. En effet, les différences trouvées dans les études d'évaluation du pouvoir antibactérien et antifongique des différents principes actifs, peuvent être attribuées à plusieurs écologiques, les variations saisonnières, la méthode d'extraction (Sagdic et Ozcan, 2003 ; Moreira et al., 2005 ; Celiktas et al., 2007 ; Turkmen et al., 2007), la préparation de l'extrait, le solvant utilisé, la sensibilité des bactéries, la concentration de l'extrait (Loziene et al., 2007) et finalement l'organe de la plante utilisé (Naatarajan et al., 2005).

Pour cela, nous nous sommes contentés de donner quelques résultats des travaux réalisés et ceci pour avoir une idée sur l'effet antibactérien et antifongique des flavonoïdes.

Plusieurs travaux ont été consacrés à l'étude du pouvoir antibactérien des flavonoïdes, les extraits flavonoïques extraites à partir des feuilles de *Lavandula stoechas* L., *Cistus ladaniferus* L., *Crategus oxycantha* L. et *Smyrniium olusatrum* L., enregistrent des diamètres d'inhibitions compris à mm et 14 mm vis-à-vis de *Staphylococcus sp.*, tandis que ils ne présentent aucune activité vis-à-vis *E. coli* (Mohammedi, 2006). Les travaux par Treki et al.,

(2009) réalisés sur les flavonoïdes extraites des feuilles d'une labiée (*Thymus hirtus* L.) en utilisant des solvants organiques (éther diéthylique, acétate d'éthyle et n-butanol) ont donné des diamètres d'inhibitions situés entre 9 mm et 15 mm contre *E. coli*. Les résultats de travaux apportés par Madi (2010), réalisés sur des feuilles de trois labiées (*Thymus algeriensis* Boiss. & Reut., *Thymus serpyllum* L. et *Salvia officinalis* L.) ont montré que les extraits flavonoïques sont plus au moins actifs sur *E. coli* avec des diamètres d'inhibition variant entre 8 mm et 14 mm. En opposé, très peu de travaux ont été réalisés sur l'activité antifongique des flavonoïdes, puisque la plus part des études sont menées sur les huiles essentielles car ces derniers sont plus efficaces et actifs sur les moisissures (Sacchetti et al., 2005 ; Rasooli et al., 2008).

Néanmoins, des résultats concernant l'effet antifongique des flavonoïdes ont été signalés dans certains travaux. A titre d'exemple, Mohammedi (2006), a montré que les extraits flavonoïques obtenues des feuilles de *Lavandula stoechas* L., *Cistus ladaniferus* L., *Crategus oxycantha* L. et *Smyrniolum olusatrum* L., présentent des diamètres d'inhibition variant entre 13 mm et 34 mm vis-à-vis de *Aspergillus sp.* et de *Penicillium sp.*

Les extraits flavonoïques des feuilles et des écorces de *Rhamnus alaternus* L. sont plus efficaces sur les champignons que sur les bactéries testées. On comparant nos résultats d'activité antifongique des extraits avec ceux des antifongogramme il ressort que toutes les deux ont inhibé totalement la croissance de l'espèce fongique *Aspergillus brasiliensis* par contre l'espèce fongique *Candida albicans* présente une sensibilité de 80% vis-à-vis tous les extraits flavonoïques utilisées avec un diamètre d'inhibition de 5 jusqu'au 24.2 mm pour les extraits flavonoïques des écorces et de 7.2 jusqu'au 17 mm pour les extraits de feuille par contre ses souches sont quasiment résistantes face aux antifongiques commercialisées utilisées dans ce test. La plupart de ces études menées dans ce contexte ont démontré que c'est la structure spéciale des flavonoïdes notamment certaines classes flavonoïques tels que (flavanes et flavanols) peut expliquer le remarquable effet antifongique de ces extraits flavonoïques. Tsuchiya et al., (1996) ont conclu que le type des substituants des flavanols a un rôle déterminant dans la qualité de l'activité antimicrobienne. Aussi, plusieurs auteurs signalent que la remarquable inhibition de la croissance microbienne induite par les flavanes et les flavanols est due essentiellement à la présence des groupements hydroxyles (Osawa et al., 1992 ; Stapleton et al., 2004).

Malgré la résistance de *C. albicans* aux antifongiques liées à sa composition génétique cité dans plusieurs travaux de recherches (Yesland et Fonzi, 2000 ; Cowen et al., 2001 ; Goldman et al., 2004) on constate que nos extraits flavonoïques inhibent la croissance de cette espèce à

80%. Les candidas peuvent résister aux différents antifongiques soit par modification de la perméabilité de la cellule fongique aux agents antifongiques (Vanden Bosshe, 1992) ou par altération du transport de l'antifongique dans et/ou hors la cellule (Rex et al., 1995).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) diffère en fonction de l'extrait flavonoïques, de l'organe végétatif et du type de la souche microbienne. A titre d'exemple, vis-à-vis d' *A. brasiliensis*, toutes les extrais flavonoïques à partir des deux partie végétative caractérisé par une CMI de 6,25 µg/ml. La même chose pour *C. albicans* avec des CMI qui varient entre 25 µg/ml et 50 µg/ml pour toutes les extrais flavonoïques. On enregistre une CMI de 50 µg/ml juste pour l'extrait chloroformique à partir des feuilles vis-à-vis *P. mirabilis* et une CMI de 100 µg/ml pour le même extrait à partir des écorces vis-à-vis *E. coli*.

Aligiannis et al., (2001) ont proposé une classification des extraits végétaux sur la base des résultats des concentrations minimales inhibitrices comme suit : forte inhibition (CMI inférieur à 500 µg/ml), inhibition modérée (CMI varie de 500 à 1500 µg/ml) et faible inhibition (CMI supérieur à 1600 µg/ml). Selon cette classification, nous constatons une très forte inhibition présente par nos extrais flavonoïques (CMI 100 µg/ml) pour les tests réalisés.

III. 2. 5 Activité antihépatotoxique

L'ictère provoqué expérimentalement chez les rats (Wistar) dans le cas la présente étude est une conséquence de la toxicité du tétrachlorure de carbone CCL₄, un toxique organochloré à tropisme essentiellement hépatique et et agent potentiel cité par plusieurs chercheurs (Shah et al., 2009; Sanmugapriya, 2006). En outre, les changements associés à des lésions hépatiques induites par CCL₄ sont similaires à celui de l'hépatite virale aiguë (Suja et al., 2004).

Son mécanisme d'action physiopathologique décrit par plusieurs auteurs, entre autres (Sarada et al., 2012 ; Petet et Casimiro, 2010 ; Letteron et al., 1990) permet de mieux appréhender les dommages hépatiques dont il est responsable. En effet, la métabolisation hépatique du tétrachlorure de carbone (CCL₄) commence par sa transformation en ses métabolites primaires (Trichlométhyl et Trichlométhylperoxyde) grâce à cytochrome P₄₅₀ oxydase hépatique, principal système enzymatique responsable des réactions d'oxydoréduction des xénobiotique au niveau du foie. Le trichlorométhylpéroxyde est un radical libre hautement réactif qui va initier une lipoperoxydation autrement dites oxydation des acides gras polyinsaturés des phosphomembranes lipidiques des hépatocytes.

Une conséquence de cette activité radicalaire est la désagrégation des membranes des hépatocytes dont les enzymes intra-cytoplasmiques entre autres les transaminases

(ASAT/GOT et ALT/GPT) et la phosphatase alcaline (ALP) vont se déverser dans le milieu extracellulaire (plasma sanguin) en cas de cellules endommagés (Singh et *al.*, 1998 ; Ozturk et *al.*, 2009) toute chose entraînant une élévation significative des marqueurs sériques enzymatiques et de la bilirubine directe constaté avec les rats du groupe intoxiqué (Elbery et *al.*, 2010). Selon Sallie et *al.*, (1991) la lésion hépatique peut être attribuée à l'endommagement de l'intégrité structurale du foie, parce que ces enzymes ont une localisation cytoplasmique et libérés dans la circulation après dommages cellulaires, indiquant le développement de l'hépatotoxicité.

La silymarine inhibe le cytochrome P450 hépatique oxydase (cytochrome P450), la principale enzyme responsable de l'activation du tétrachlorure de carbone (CCl₄) et sa transformation en ses métabolites, notamment radical trichlorométhyle qui conduit à trichlorométhyle peroxyde, des radicaux libres. Ce radical libre (trichlorométhyl peroxyde) dérivé joue un grand rôle dans la peroxydation des lipides conduisant à des dommages au foie. *Silybum marianum* et la silymarine agissent mieux en préventif et sont dépourvus d'effet thérapeutique en traitements aigus (Fleurentin et Joyeux, 1990).

Les résultats de notre étude ont révélé une augmentation significative des activités sériques de GOT, GPT, ALP et les niveaux de bilirubine sur l'exposition à CCl₄, indiquant des dommages considérables hépatocellulaire, l'augmentation des niveaux de marqueurs sériques GOT, GPT, ALP et de la bilirubine directe (DBil) libéré par le foie dans le sang (Ashok et *al.*, 2002 ; Achliya et *al.*, 2004) sont les signes qui montraient des lésions hépatiques important dans le groupe des rats intoxiqués (groupe II).

L'administration des extraits végétaux (lyophilisats) aux rats des groupes tests provoque un processus de restauration des marqueurs biochimiques vers une évolution à la normale comme celle du traitement à la silymarine. Ceci illustre la capacité des extraits à assurer une protection de l'intégrité des membranes des hépatocytes contre l'intoxication organochloré (CCL₄) ; laquelle intoxication est jugée responsable de la fuite des substrats enzymatiques intra-cytoplasmiques des hépatocytes vers le milieu extérieur (plasma).

Sur le plan comparatif, les résultats du présent travail corroborent ceux obtenus par (Sourabié et *al.*, 2006, 2012) qui avait permet de mettre en évidence une activité antihépatotoxique globale du décocté et du macéré aqueux lyophilisés de feuilles d'*Argemone mexicana* L. (Papaveraceae).

Le mécanisme d'action de l'effet anti-hépatotoxiques présentée par la feuille d' *Argemone mexicana* L., il peut être attribué à des éléments phytochimique mis en évidence dans les

extraits de suspension en poudre. En effet, selon Rathi et *al.*, (2008) protopine, l'un des alcaloïdes isoquinoleic de *A. mexicana* exerce une action inhibitrice sur la formation de peroxydes lipidiques. Et on sait que la peroxydation des lipides est l'une des étapes importantes du CCl₄ métabolisation conduisant à la dégradation des membranes des cellules hépatocytes. L'action exercée par protopine (alcaloïde isoquinoleic de *A. mexicana*) est similaire à celle de la silymarine, considéré comme l'un des inhibiteurs du cytochrome P450 (Sarada et *al.*, 2012). Le rôle inhibiteur de la silymarine a été effectivement confirmé par Letteron et *al.*, (1990) concernant le métabolisme du tétrachlorure de carbone (CCl₄).

Par contre nos résultats concernant le pourcentage de réduction des extraits de notre espèce étudier (*Rhamnus alaternus* L.) sont plus important à celle enregistré pour les extrais méthanoliques aux différentes concentrations (150, 300, 500 mg/kg) pour l'espèce *Justica gendarussa* Borm (Krishna et *al.*, 2009) ainsi que extrait éthanolique des feuilles et écorces de l'espèce *Narina crenulata* (Roxb) Nicolson aux concentrations (250, 500 mg/kg) (Sarada et *al.*, 2012). Le mécanisme de l'effet anti-ictère peut également être dû à certains phytoconstituents tel que les sucres et les glycosides présents. Ces composants selon Chiu et *al.*, (1992) et Ye et *al.*, (2001) dérivé de polysaccharides que certains d'entre eux ont été bien documentés dans la littérature au sujet de leur propriété anti-hépatotoxiques. En outre, la capacité d'un médicament hépatoprotecteur afin de réduire les effets dommageables ou de préserver le mécanisme physiologique hépatique normale, qui ont été perturbées par un hépatotoxine (CCl₄; 0,5 ml / kg), est l'indice de l'effet de protection selon Yudav et Dixit (2003).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Le présent travail a pour objectif l'étude de *Rhamnus alaternus* L. peuplant les monts de Tessala (Algérie occidentale), à travers la caractérisation de son habitat et son cortège floristique, identification des différents tissus caractérisant ses feuilles, tiges et fleurs par une approche histologique. La quantification de ces composés phénoliques précisément les flavonoïdes totaux à partir des extraits flavonoïques des deux parties végétatives feuilles et écorces, l'évaluation du pouvoir antioxydant, antibactérien et antifongique de ces extraits flavonoïques ainsi que l'activité antihépatotoxique des deux extraits aqueux (macéré et décocté) à partir de ces feuilles.

L'étude écologique a contribué à l'évaluation de la diversité biologique du mont de Tessala par le billet d'une caractérisation de sa richesse floristique. Dans ce contexte, nous avons peu recensés sur la station d'échantillonnage 34 espèces appartenant à 21 familles de plantes vasculaire. Ces derniers contribuent au potentiel phytoécologique qu'abrite notre site d'étude.

L'étude de l'habitat de *Rhamnus alaternus* L. en utilisant la méthode stigmatique fait ressortir que cette plante est caractéristique des garrigues, se développe surtout dans les stations ensoleillées, à différentes altitudes, sur un sol légers à pH légèrement alcalin avec des teneurs moyenne à forte en matière organique.

L'étude histologique des feuilles, tiges et fleurs du *Rhamnus alaternus* L. nous a donné une idée sur les différents tissus caractérisant ces organes dont la présence de grosses macles d'oxalate de calcium, un nombre important de grain d'amidon ainsi que de gaine périfasciculaire.

La quantification de ces flavonoïdes totaux par spectrophotométrie U.V, nous a permis de constater que les fortes teneurs sont notées dans les écorce suivie par celle des feuilles, ce qui confirme la variation des concentrations en flavonoïdes en fonction de l'extrait flavonoïque lui-même et en fonction de l'organe végétatif. Ces résultats indiquent que notre espèce comme beaucoup d'autres espèces est une source prometteuse en composés phénoliques.

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits flavonoïques extraites à partir des feuilles et écorces de l'espèce *Rhamnus alaternus* L. en comparaison avec les cinq standards commercialisées à fait ressortir que nos extraits flavonoïques présentent moins d'activités par rapport aux antioxydants de test.

L'étude microbiologique avait pour but d'évaluer le pouvoir antibactérien et antifongique des extraits flavonoïques obtenus à partir des deux organes de l'espèce étudiée, ces tests ont été réalisés sur trois souches bactériennes et deux souches fongiques en utilisant la méthode de

Conclusion et perspectives

diffusion en milieu gélosé. Les extraits flavonoïques ont révélé des activités antibactériennes et antifongiques variables vis-à-vis des différentes souches microbiennes testées : en fonction du type d'extrait flavonoïques, l'organe végétatif et sa concentration ainsi que la résistance ou bien la sensibilité de la souche microbienne. Cependant, nous avons constaté que nos extraits flavonoïques des deux parties végétatives (feuille et/ou écorce) présentent une activité antifongique remarquable par rapport à l'activité antimicrobienne ceci offre à la médecine un potentiel qui peut être valorisé dans le cadre d'une étude pharmacologique.

Finalement, le pouvoir des deux extraits aqueux contre une hépatotoxicité induite par le CCl₄. Les résultats obtenus ont permis d'affirmer que l'extrait de la plante étudiée présente des activités hépatoprotectrice assez intéressantes. Une diminution dans la concentration des paramètres biochimiques et des transaminases (TGO et TGP), phosphatase alcaline (PAL) et la bilirubine directe (DBil) est notée chez les souris traitées par rapport à celles des témoins non traitées ceci apporte une confirmation de l'existence d'un effet anti-hépatotoxique de l'espèce *Rhamnus alaternus* L. qui a permis encore une fois de montrer le potentiel de ces composés du métabolisme secondaire des végétaux qui sont dotés d'un pouvoir régénératif et curatif.

Au terme de cette étude et conformément à l'importance des différents résultats obtenus, il ressort que cette plante mérite d'être valorisée et nous souhaitons l'approfondir sur tous les plans, en particulier ;

- Aspect biochimique en utilisant des méthodes d'analyse plus récentes et plus performantes.
- Elargir le spectre des études antimicrobiennes et antifongiques sur d'autres bactéries pathogènes.
- Développer l'axe de recherche de l'hépatotoxicité avec d'autres paramètres biochimiques enzymatiques.
- Projecter d'autres métabolites secondaires impliqués dans le domaine pharmaceutique chez cette espèce.

Références bibliographiques

References bibliographiques

A

- Abegaz, B. M., & Peter, M. G. (1995). Emodin and emodinanthrone rhamnoside acetates from fruits of *Rhamnus prinoides*. *Phytochem.*39: 1411-1414.
- Achliya G.S., Wadodkar S.G., Dorle A.K. (2004). Evaluation of hepatoprotective effect of Amalkadi Ghrita against carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 229-232.
- Addai, Z. R., Abdullah, A., & Mutalib, S.A. (2013). Effet of extraction solvents on the phenolic content and antioxidant properties of two papaya cultivars. *Journal of medicinal plants research*, 7 (47), 3354-3359.
- Afnor, (1987). *Qualité des sols. Méthodes d'analyses*. Recueil des normes Française. Paris. 135p.
- Aganga, A. A. & Mosase, K.W. (2001). Tanins contenent, nutritive value and dry matter of *Lonchocars capussa*, *Ziziphus mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kiria acuminata* and *rhus lancea* seeds. *Animal Feed Science and technologie*. 91: 107-113p.
- Alemayu, G., Abegaz, B., Snatzke, G., & Duddeck, H. (1993). Bianthrones from *Senna longiracemosa*. *Phytochemistry* 32, 1273–1277.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., & Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environ.*, 24, 1447-1344.
- Aliyiannis, N., Kalpotzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I.B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 4168-4170.
- Ammar, R. B., Bhourri, W., Sghaier, M. B., Boubaker, J., Skandrani, I., Neffati, A., Bouhlel, I., Kilani, S., Mariotte, A. M., Chekir-Ghedira, L., Dijoux-Franca, M. G. Đ., & Ghedira, K., (2009). Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. *Food Chem.* 116: 258-264.
- Amic, D., Davidovic-Amic, D., Beslo, D., & Trinajstic, N. (2003). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*, 76, 55-61.

References bibliographiques

Andersen, Y.M., & Markham, K.R., (2006). *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. Ed. CRC, Taylor & Francis, Boca Raton, FL, 553-616p.

APG II, (2003). Angiosperm Phylogeny Group II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot. J. Linn. Soc.* 141: 99-436p.

Ashok Shenoy K., Somayaji S.N., Bairy K.L. (2001). Hepatoprotective effect of Ginkgo biloba against carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 33, 260-266.

Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G., Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions : their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.*, 89, 27-36.

Aubert, G. (1978). *Méthodes d'analyse des sols*. 2^{ème} Edition : CNRP Marseille. 199p.

B

Balandrin, M. F., Kinghorn, A. D. & Farnsworth, N.R. (1993). *Plant-derived natural product in drug discovery: An overview*. In A.D. Kinghorn, & M.F. Batandrin (Eds.), *Human Medicinal Agent from Plants*, Symposium Series No. 534 (pp. 2-12). Washington DC: American Chemical Society Books.

Barbero, M., Bonin, G., Loisel, R., & Quezel, P. (1989). Sclerophyllus Quercus forests of the mediterranean area. Ecological and ethological significance Bielefelder Okol. *Beiter*. 4: 1-23p.

Bary-Lenger, A., Evard, R., & Cathy P. (1979). *La foret varillante-Carmane*. Imprim. Liege. 611p.

Barwick, V.J. (1997). Strategies for solvent selection - a literature review. *Trends in Analytical Chemistry*, 16, 293-309.

Battandier JA, Debray FG, Flagey C, Petit P and Trabut L. *Flore de l'Algérie*. Ed. A. Jourdan, Alger, 1888, p. 189-190.

Becagrom, (2008). *Etude relative à la délimitation et la caractérisation des zones de montagne : Massif montagneux de Trara, Sebaa Chioukh, Berkéche et Tessala. (Wilaya de Tlemcen, Ain Témouchent et Sidi Bel Abbés)*. Prospective de l'état des lieux. Phase II. 144p. Bel Abbes, Algérie. *Mémoire Mag. Univ. Tlemcen*. 154p.

Ben Ammar, R., Kilani, S., Bouhlel, I., Ezzi, L., Skandrani, I., Boubaker, J., Ben Sghaier, M., Naffeti, A., Mahmoud, A., Chekir-Ghedira, L. & Ghedira, K., (2008). Antiproliferative,

References bibliographiques

- Antioxydant, and Antimutagenic Activities of Flavonoid-Enriched Extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L.: Combination with the Phytochemical Composition. *Drug. Chem. Toxicol* 31: 61-80.
- Ben Ammar, R., Kilani, S., Bouhlel, I., Skandrani, I., Naffeti, A., Boubaker, J., Ben Sghaier, M., Bhourri, W., Mahmoud, A., Chekir-Ghedira, L. and Ghedira, K. (2007). Antibacterial and cytotoxic activities of extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L. (*Rhamnaceae*). *Ann. Microbiol.* 57: 453-460.
- Benabdelli, K. (1996). Aspect physionomico-structuraux et dynamique des écosystèmes forestiers face à la pression anthropozoogène dans les monts de Tlemcen et les monts de Dhaya. Algérie occidentale. *Thèse de doctorat. Université de Djillali Liabes. Sidi Bel Abbes.* 356 p+ annexes.
- Bendaanoun, M. (1981). Etude synécologique et dynamique de la végétation halophile et hydro-halophile et de l'estuaire de Bou-reg-Reg (Atlantique du Maroc). Application et perspectives d'aménagement. *Thèse de Doctorat . Université de St Jérôme. Aix-Marseille III.* 221p + Annexes.
- Benhammou, N., Bekkara, F.A., & Panovska, T.K. (2006). Antioxydant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *C. R. Chimie*, 12, 1259-1266.
- Bergogne-Berezin, E., & Dellamonica, P. (1995). *Antibiothérapie en pratique clinique*. Ed. Masson, Paris, 486p.
- Berry, W., Kettering, Q., Antes, S., Page, S., Russell-Anelli, J.O., Rao, R. & Dgrcoria, S. (2007). Soil texture. *J. Agronomy Fact. Sheet Series. 1.* 29: 1-2.
- Besombes, C. (2008). Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse de doctorat. Discipline : Génie des procédés Industriels. Université de la Rochelle. France.* 289p.
- Bhourri, W., Ben Sghaier, M., Kilani, S., Bouhlel, I., Dijoux-Franca, M.G, Ghedira, K., & Chekir Ghedira, L. (2011). Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (*Rhamnaceae*): Kaempferol 3-O-b-isorhamninoside and rhamnocitrin3-O-b- isorhamninoside. *Food and Chemical Toxicology* 49: 1167–1173.
- Bhourri, W., Boubaker, J., Kilani, S., Ghedira, K., & Chekir-Ghedira, L. (2012). Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (*Rhamnaceae*): Kaempferol 3-O- -isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O-B-isorhamninoside. *S. Afr. J. Boot.* 80: 57-62.

References bibliographiques

- Bhoyar, M., Mishra, G., Naik, P., & Srivastava, R. (2011). Estimation of antioxidant activity and total phenolics among natural populations of Caper (*Capparis spinosa*) leaves collected from cold arid desert of trans-Himalayas. *Australian Journal of Crop Science*, 5(2), 912-919.
- Billerbeck, V.G., Roques, C., Vanière, P., & Marquier, P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produit à base d'huiles essentielles. *Hygiènes*, 3, 248-251.
- Billing, J. & Sherman, P. W. (1998). Antimicrobial Functions of Spices: Why some like it hot. *Q. Rev. Biol.* 73: 3-49.
- Bonin, S. (2006). *Connaissance des sols - Introduction à la pédologie*. Doc. Cours pédologie. 21p.
- Bonnet, R., Caron, F., Cavallo, J.D., Chardon, H., Chidiac, C., Courvalin, P., Drugeon, H., Dubreuil, L., Jarlier, V., Jehl, F., Lambert, T., Leclercq, R., Nicolas-Chanoine, M.H., Plesiat, P., Ploy, M.C., Quentin, C., Soussy, C.J., Varon, E., & Weber, P. (2012). *Communiqué de la comité Française de l'antibiogramme*. France : Société Française de Microbiologie, 59 p.
- Bortolomeazzi, R., Sebastianutto, N., Toniolo, R., & Pizzariello, A. (2007). Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food Chem.* 100: 1481-1489.
- Bosh, M., & Waser, N.M. (1999). Effects of local density on pollination and reproduction in *Delphinium nuttallianum* and *Aconitum columbium* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany.* 86: 871-879.
- Braun-Blanquet, J. (1952). Phytosociologie appliquée. *Comm. SIGMA.* 116 : 156-161 p.
- Brette, J. P. (1985). *Phytothérapie traditionnelle Kabylie*. Paris: Edition Ibis Press, 14 p.
- Bronner, W. E., & Beecher, G. R. (1995). Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. *J. Chromatog.A.* 705: 247-256.
- Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales*. Ed. Tec & Doc - Lavoisier, Paris. 925p.
- Bruneton, J. (1999). *Flavonoïdes*. In : *Pharmacognosie, Phytochimie : Plantes médicinales*. 3^{ème} édition. Edition : Technique et Documentation. Paris. 10-353p.
- Bssaibis, F., Gmira, N., & Meziane, M. (2009). Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* L. W. Greuter. *Rev. Microbiol. Ind. San. Environn.*, 3, 44-55.
- Bullock, P., Fedoroff, N., Jongerius, A., Stoops, G., Tursina, T., & Babel U. (1985). Hand book for soil thin section. *Waine Research Publication, Wolverhampton*. 152p.

References bibliographiques

Burlat, V., Oudin, A., Courtois, M., & St-Pierre, B. (2004). Co-expression of three MEP Pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicate multi cellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole Alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites. *The plant journal*. 38: 131-141 p.

C

Careme, C. (1990). Les adventices des cultures méditerranéennes en Tunisie : leurs plantules, leurs semences. Institut National de la Recherche Agronomique. *Publications agricoles*. Edition : AGCD.N° 26. Tunis. 400p.

Celiktas, O.Y., Hames Kocabas, E.E., Vardar Sukan, F., Ozek, T. & Baser, K.H.C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem*. 100: 553-559p.

Chamley, H. (2002). *Environnement biologique et activités humaines*. Edition : Vuibert. Paris 551p.

Chancerel L. *Flore forestière du globe*. Ed. Gauthier-Villars, Paris : 1920, p. 561-562.

Charif, K. (2001). Contribution à une approche de développement agroforestier de la commune de Tessala (Sidi Bel Abbes). *Mémoire Mag. Univ. Sidi Bel Abbes*. 120p.

Chase, M.W. & Albert V.A. (1998). *A perspective on the contribution of plastid rbcL DNA sequences to angiosperm phylogenetics*. In Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ, eds. *Molecular systematics of plants II: DNA sequencing*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 488-507p.

Chase, M.W., & Reveal, J.L. (2009). A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 122–127.

Chase, M.W., Soltis, D.E., Olmstead, R.G. & 39 others. (1993). Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene rbcL. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 80: 528-580.

Chaumont, M., & Paquin, C. (1971). *Carte pluviométrique de l'Algérie*. Bul. Soc. Hist. Afrique du Nord. Alger. 25p.

Chiu H.F., Lin C.C., Yen SM. H., Wu P.S., Yang C.Y. (1992). Pharmacological and pathological studies on hepatic protective crude drugs from Taiwan (V): the effects of *Bombax malabarica* and *Scutellaria rivularis*. *American Journal of Chinese Medicine*, 20, 257- 264.

References bibliographiques

Conservation des forets, (2010). *Rapport sur les incendies de forets dans la wilaya de Sidi Bel ABBES*. 43p.

Chouaieb, H., Ayadi, I., Zouari, S., Fakhfakh, N., Zaidi, S., & Zouari, N. (2012). Effect of phenological stage and geographical location on antioxidant activities of Tunisian horehound: *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae). *JBAPN*, 2(4), 232-238.

Coque, R. (1977). *Géomorphologie*. Ed. Armand collin. Paris. 452p.

Cornet, A. (2002). La désertification un problème d'environnement, un problème de développement. *Résumé de la conférence Agropolis Muséum*. 29 Jun. 2002.

Coskun, M., Satake, T., Hori, K., & Tanker, M. (1990). Anthraquinone glycosides from *Rhamnus libanoticus*. *Phytochemistry* 29, 2018–2020.

Cowan, M. M. (1999). Plant Product as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 564-582.

Cronquist, A. (1988). *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. Second Edition. Bronx, NY: The New York Botanical Garden. 865p.

Culter, S.J., & Culter, H.G. (2000). *Biologically Active Natural Products : Pharmaceutical*. New-York: CRC Press, 277 p.

D

Dacosta, Y. (2003). *Les phytonutriments bioactifs : 669 réféérences bibliographiques*. Ed. Yves Dacosta, Paris, p. 317.

Dager, P., & Poissonet, J. (1991). *Prairies et paturages : Méthodes d'étude*. Ed. Institut de botanique. Montpellier. 354p.

Dager, P., & Poissonet, J. (1997). Biodiversité et végétation pastorales. *Rev. Elev. Med. Pays Trop.* 141-149p.

Dahlgren, R.M.T., Clifford H.T., & Yeo P.F. (1985). *The families of the monocotyledons, structure, evolution and taxonomy*. New York. Berlin: Springer-Verlag. 520p.

Dajoz, R. (1982). *Précis d'écologie*. Ed. Gauthier. Villars. 503p.

Dajoz, R. (2008). *La biodiversité: l'avenir de la Planète et de l'homme*. Éd. Ellipses. 275 p.

De jong, E., Ballantyne, A.K., Cmeron, D.R., & Read, D.W.L. (1979). Measurement of apparent electrical conductivity of soils by an electromagnetic induction probe to aid salinity surveys. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 43: 810-812.

References bibliographiques

Debeaux, J.O. (1984). *Flore de la Kabylie du Djurdjura, ou, Catalogue méthodique et raisonné de toutes les plantes vasculaires et spontanées observées jusqu'à ce jour dans cette contrée*. Ed. P. Klincksieck, Paris. 81-82p.

Delorme, J., & Robert, A. (1997). *Mycologie médicale*. Ed. Centre collégial de développement de matériel didactique, Monterial- Québec. 184p.

Desai, M. R., & Ghosh, S. (2003). Occupational exposure to airborne fungi among rice mill workers with special reference to aflatoxin producing *A. flavus* strains. *Ann. Agric. Environ. Med.* 10: 159-162.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Vidal, N., Lesgards, J. F., & Stocker, P. (2007). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol* 224, 801-809.

Dominguez-Avila, J., Alvarez-Parrilla, E., Gonzalez-Aguilar, G., Villa-Rodriguez, J., Olivas-Orozco, G., Molina-Corral, J., Gomez-Garcia, M., & Rosa, L. (2013). Influence of growing location on the phytochemical content of pecan (*Carya illinoensis*) oil. *Journal of Food Research*, 2(5), 143-151.

D.S.A. (2008). *Annuaire statistique de la Wilaya de S.B.A.* 80p.

Duchaufour, P. (2001). *Introduction à la science du sol: sol, végétation, environnement*. 6^{ème} Edition. Edition : Dunod. Paris. 331p.

Dworkin, M.M., & Falkow, S. (2006). *Proteobacteria: Gamma subclass*. Ed. Springer, New York, NY, 1248p.

E

Ebrahimi, N.S., Hadian, J., Mirjalili, M.H., Sonboli, A., & Yousefzadi, M. (2008). Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanius* at different phenological stages. *Food Chemistry*. 110: 927-931p.

Elberry A.A., Fathalla M., Harraz A., Ghareib S., Ayman A., Nagy S.A., Gabr M.I., Abdel-Sattar E. (2010). Antihepatotoxic effect of *Marrubium vulgare* and *Withania somnifera* extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*. 1 (4): 247-254.

Emberger, L. (1930). La végétation de la région méditerranéenne. Essai d'une classification des groupements végétaux. *Rev. Gén. Bot.* 43 : 641-729.

References bibliographiques

Emberger, L. (1955). Une classification biogéographique des climats. *Trav. Lab. Bot. Géol. Zool. Univ. Montpellier, série Bot.* 7: 3 – 43.

Essawi, T., & Srour, M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharm.*, 70, 343-349.

F

Favier, A. (2003). *Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique*. L'Actualité chimique. 108-117p.

Favier, A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr.* 64: 390-396.

Faye, M.J. (1963). *Milieu Géographique et agronomique de l'Algérie*. Stage de préparation au travail volontaire de la jeunesse (Cherraga). Algérie.

Ferka zazou, N. (2006). Impact de l'occupation spatio-temporelle des espaces sur la conservation de l'écosystème forestier : Cas de la commune de Tessala, wilaya de Sidi bel Abbes. Algérie. *Mémoire Mag. Univ. Tlemcen*. 154p.

Fiorucci, S. (2006). Activités biologiques de composés de la famille de flavonoides : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. *Thèse de Doctorat. Nice*. 211p.

Fleurentin, J., & Pelt, J.M. (1990). Les plantes médicinales. *La recherche*, 21 (222), 811-818.

Fleurentin, j., Lexa, A., Younos, C. (1990). Study of anti-hepatotoxicity of *Eupatorium cannabinum* L. in mice: an adequate method for screening in vivo antihepatotoxic natural principales. *Phytotherapy Researsch*, 4: 145-151.

Floret, C., Galan, M. J., LE Floc'h, E., Orshan, G., & Romane, F. (1990). *Vegetation*. 11: 99-100p.

Frankel, S., Robinson, G.E. & Berenbaum, M.R. (1998). Antioxidant capacity correlated to characteristics of 14 unifloral honeys. *Journal of Apicultural Research*, 37, 27-31.

G

Gabe, M. (1968). *Techniques histologiques*. Edition : Masson et Cie. Paris. 1113p.

Gégout, J.C. (1995). Etude des relations entre les ressources minérales du sol et la végétation forestière dans les vosges. *Thèse de Doctorat. ENGREF I*. 215p.

References bibliographiques

Geogantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., & Georgakis, S.A. (2007). Effet of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C. *Meat Science*. 76: 172-181.

Ghedolf, N., Wang, X.H., & Engeseth, N.J. (2002). Identification and quantification of antioxidant components of honey from various floral sources. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5870-5877.

Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytother*. 3: 162-169.

Ghezlaoui, S.B. (2001). Bio-morphologie et polymorphisme des Appareils aériens de quelques espèces halophiles en Oranie, cas d'*Atriplex halimus* L. et *Tamarix gallica* L. Thèse de doctorat en biologie. Université Abou-Baker Belkaid. Tlemcen. 373p.

Greco, J. (1966). L'érosion, la défense et la restauration des sols. Le reboisement en Algérie. Pub. Ministère de l'agriculture et de la réforme agraire. 393p.

Gubb, A.S. (1913). *La flore algérienne, naturelle et acquise*. Ed. A. Jourdan, Alger. 16-17p.

Guillet, B., Faivre, P., Mariotti, A., & Khobzi, J. (1988). The ^{14}C dates and the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio of soil organic matter of studying the past vegetation in intertropical regions. *Paleogeography, paleoclimatology, paleoecology*. 65 (2): 51-58p.

Guinebert, E., Durand, P., Prost M., Grinand, R. & Bernigault, R. (2005). Mesure de la résistance aux radicaux libres. *Sixièmes Journées de la Recherche Avicole*. 554-558.

Guinochet, M. (1973). *Phytosociologie*. Edition : Masson. 227p.

H

Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1981). The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J. Biol. Chem*. 256: 4494-4497.

Halimi, A. (1980). *L'atlas Blidéen. Climat et les étages végétaux*. O.P.U. 484p.

Hammer, M.U., Brauser, A.M., Olak, C., Brezesinski, G., Goldmann, T., Gutschmann, T., & Andrä, J. (2010). Lipopolysaccharide interaction is decisive for the activity of the antimicrobial peptide NK-2 against *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Biochem. J.*, 427, 477-488.

Harborne, J. B., (1997). Recent advances in chemical ecology. *Nat Prod Rep*. 14: 83-98.

References bibliographiques

Hayouni, E.A., Abedrabba, M., Bouix, M., & Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem* 14, 249–61.

Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M.G., Vincieri, F.F., & Romani, A. (2006). Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chem.*, 99, 464-469.

Henaoui, I.A. (2007). Les cistes dans la région de Tlemcen : aspect écologique et cartographique. *Mémoire de Magister. Université de Tlemcen*. 415p.

Herbinger, K., Tausz, M., Wonisch, A., Soja, G., Sorger, A., & Grill, D. (2002). Complex interactive effects of drought and ozone stress on the antioxidant defense systems of two wheat cultivars. *Plant Physiol. Biochem.*, 40, 691-696.

Hossain, M., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A., & Bunton, N. (2010). Effect of drying method on the antioxidant capacity of six Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*, 123(1), 85-91.

Howard, L., Clark, J., & Brownmiller, C. (2003). Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1238-1247.

Humboldt, A. (1807). *Essai sur la géographie des plantes accompagnées d'un tableau physiques des régions équinoxiales*. Edition : Paris. 155p.

I

I.N.P.N., 2010. *Inventaire National du Patrimoine en France*. Disponible sur internet : <http://www.inpn.mnhn.fr>. Page consulter le 10-01-2010. Mis à jour le 14-07-2009.

J

Jain, A., Sinha, P., & Desai, N. (2014). Estimation of flavonoid, phenol content and antioxidant potential of Indian screw tree (*Helicteres isora* L.). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 5(4), 1320-1330.

Jamagne, M. (1967). Bases et techniques d'une cartographie des sols. Edition : Yvette Dewolf. *Annales de géographie*. Volume 78. N°428. 478p.

Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.E. & Donoghue M.J. (2002). *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA. 576p.

References bibliographiques

K

Kadri, A., Zarai, Z., Békir, A., Gharsallah, N., Damak, M., & Gdoura, R. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. *African journal of biotechnology*, 10 (19), 3908-3914.

Kaper, J.B., Nataro, J.P., & Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2, p.123–140.

Kaufmann, S.H.E., (1997). *Host response to intracellular pathogens*. Ed. Springer; R.G. Landes, New York; Austin, 345p.

Kiekken, R. (1962). *Géologie et stratigraphie des monts de Tessala*. Floquet, Oran, Algérie, 220 p.

Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol. Path.*30: 620-650.

Kolar, P., Shen, J.W., Tsuboi, A., & Ishikawa, T. (2002). Solvent selection for pharmaceuticals. *Fluid Phase Equilibria*, 194(7), 771-782.

Koné, W.M., Kamanzi Atindehou, K., & Terreaux, C. (2004). Traditionnel medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol* 93, 43–9.

Krishna, D., Chaluvadi, M., Raj, N., & Sripal, R. (2011). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.*33: 2-16.

Krishna, K. L., Mruthunjaya, K., & Patel, J.A., (2009). Antioxident and hepatoprotective activity of leaf extract of *Justicia gendarussa* Burm. *International Journal of Biological Chemistry* 3 (3): 99-110.

L

Larson, J., Gottfries, J., Bohiin, L., & Backland, A. (2007). Expanding the ChemGPS chemical space with natural products. *J. Nat. Prod.*, 68 (7), 985-991.

Larwence, A., Hammouda, F., Salah, A., Abada, S. & Oucha__ N. Ñ. (1984). Valeur alimentaire des marcs de raisin. III. - Rôle des tanins condensés dans la faible valeur nutritive des marcs de raisin chez le mouton : effet d'une addition de polyéthylène glycol 4000. *Ann. Zootech.* 33: 533-543.

References bibliographiques

LE FLOC'H, E. (2001). Biodiversité et gestion pastorale en zone aride et semi arides Méditerranéennes du Nord de l'Algérie. *J. Boccone*.13: 223-237p.

Lee, K.H. (2004). Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product leads. *J. of Nat. Prod.*, 67: 273-283.

Letreuch-belarouci, A., Medjahdi, B., letreuch-belarouci, N., & Benabdeli, K. (2009). Diversité floristique des suberaies du parc national de TLEMEN (ALGERIE), *Acta botanica Malacitana*, 34. 77-89.

Letteron, P., Labbe, G., Degott, C., Berson, A., Fromentry, B., Delaforge, M., & Larrey, D. (1990). Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride induced lipid peroxydation and hepatotoxicity in mice. Evidence that silymarin acts both as an inhibitor of metabolic activation and as a chainbreaking antioxidant. *Biochemical pharmacology*, 39: 2027-2034.

Lin, C.N., & Wei, B.L. (1994). Flavonol and naphthalene glycosides from *Rhamnus nakaharai*. *J. Nat. Prod.* 57, 294–297

Lin, J.K., & Weng, M.S. (2006). *Flavonoids as nutraceuticals*. In: Grotwold E (Ed) The science of flavonoids. Springer, Columbus, Ohio, 213–39p.

Loziene, K., Venskutonis, P.R., Sipailiené, A. & Labokas, J. (2007). Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chem.* 103 : 546-559p.

M

Macheix, J.J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, p. 4-5.

Madi, A., (2010). Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. *Mémoire de Magister. Option : Biotechnologie Végétale. Université Mentouri. Constantine. Algérie.* 107p.

Mahroug, S., Courdavaut, V., Thiersault, M., Burlat, V., & Saint Pierre, (2006). Epidermis is a pivotal site of at least secondary metabolic in *Catharanthus roseus* L. Aerial organs. *Planta* 223. 1191-1200p.

References bibliographiques

Mai, L. P., Gu_Ñritte, F. Ī., Dumontet, V., Tri, M. V., Hill, B., Thoison, O., Gu_Ñnard, D., & S_Ñvenet, T. (2001). Cytotoxicity of Rhamnosylanthraquinones and Rhamnosylanthrones from *Rhamnus nepalensis*. *J. Nat. Prod.* 64: 1162-1168.

Male_Éev, D. É., & Kunti_ç, V. (2007). Investigation of metal--flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal--flavonoid complexing reactions. *J. Serb. Chem. Soc.* 72: 921-939.

Markham, K.R. (1982). *Techniques of flavonoid identification*. Ed Academic Press, London.

Marzouki, M. S., El-Toumy, S. A. A., Merfort, I., & Nawwar, M. A. M. (1990). Polyphenolic metabolites of *Rhamnus disperma*. *Phytochem.* 52: 943-946.

Maurice, N. (1997). *L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle*. Ed. Lavoisier, Paris. 12-14p.

Merghem, R. Jay, M., Viricel, M.R. (1995). Five 8-C benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiatae). *Phytochemistry* 38: 637-40

Miliauskas, G., Vensutonis, P.R., & Van Beek, T.A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food Chemistry.* 85: 231-237.

Mohammedi, Z. (2006). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoides de quelques plantes de région de Tlemcen. *Mémoire de Magister en Biologie. Option : Produits Naturels, Activité Biologiques et Synthèse. Université Abu Bakr Belkaid. Tlemcen.* 105p + Annexes.

Mohd-Esa, N., Shin Hern, F., Ismail, A., & Lye Yee, C. (2010). Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds. *Food Chemistry,* 122, 1055-1060.

Moreira, M.R., Ponce, A.G., Del Valle, C.E. & Roura, S.I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT.* 38: 565-570p.

N

Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R., & Krishina, D.R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J Pharmacol* 33, 2-16.

Natarajan, D., John Britto, S., Srinivasan, K., Nagamurugan, N., Mohanasundari, C., & Perumal, G. (2005). Antibacterial activity of *Euphorbia fusiformis*: a rare medicinal herb. *J. Pharmacol.,* 33, 2-16.

References bibliographiques

Ngoune, L.T., Tanedjeu, K.S., Mbofung, C.M.F. (2009). Impact de l'utilisation des antibiotiques sur la sensibilité des bactéries pathogènes de poules dans la ville de Ngaoundéré. *Cameroon Journal of Experimental Biology*, 5(2), 52-61.

Ni, Q., Xu, G., Wang, Z., Gao, Q., Wang, S., & Zhang, Y. (2012). Seasonal variations of the antioxidant composition in ground bamboo *Sasa argenteostriatus* leaves. *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 2249-2262.

Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., van Norren, K., & van Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American J. Clinic. Nutr.* 74: 418-425.

Novelli, G. P., (1997). Role of free radicals in septic shock. *J. Physiol. Pharmacol.* 48: 517-527.

O

O.N.M. (2010). Organisation nationale de météorologie. Recueil des données climatiques de la wilaya de Sidi Bel Abbés. *Feuilles de relevés quotidiens de la période 1980-2009*, Alger, Algérie.

Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I. C. F. R., Bento, A., Estevinho, L., & Pereira, J. A. (2008).

Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2326–2331.

Orhan, I., S_enol, F. S., Gulpinar, A. R., Kartal, M., S_ekeroglu, N., Deveci, M., et al. (2009). Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Cyclotrichium niveum*, *Thymus praecox* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* *Echinacea purpurea* and *E. pallida*. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1304–1310.

Osawa, T., Sugiyama, Y., & Inayoshi, M. (1995). Antioxidative activity of tetrahydrocurcuminoids. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59, 1609-1612.

Ozenda, P. (1982). *Les végétaux dans la biosphère*. Ed. Doin, Paris. 431p.

Ozturk, I.C., Ozturk, F., Gul, M., Ates, B., & Cetin, A. (2009). Protective effects of ascorbic acid on hepatotoxicity and oxidative stress caused by carbon tetrachloride in the liver of Wistar rats. *Cell Biochemistry and Function*. 27: 309–315.

References bibliographiques

P

Parente, C.P., Reis Lima, M.J., Teixeira-Lemos, E., Moreira, M.M., Barros, A.A., & Guido, L.F. (2013). Phenolic Content and Antioxidant Activity Determination in Broccoli and Lamb's Lettuce. *Int. J. Biol. Vet. Agric. Food Eng.*, 7(7), 275-278.

P.D.A.U. (2005). *Plan de développement et d'aménagement urbain de la commune de Tessala*. 43p.

Pedneault, K., Léonhart, S., Angers, P., Gosselin, A., Ramputh, A., Arnason, J.T. & Dorais M. (2001). Influence de la culture hydroponique de quelques plantes médicinales sur la croissance et la concentration en composés secondaires des organes végétaux. Texte de conférence. 5^{ième} colloque sur les produits naturels d'origine végétale. Université Laval. Canada. 2p.

Penzig O. *Flore colorée de poche du littoral méditerranéen*. Ed. P. Klincksieck, Paris, 1902, p. 27-28.

Percival, S.L. (2004). *Microbiology of waterborne diseases*. Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston, p. 480.

Perez, M. B., Banek, S. A., & Croci, C. A. (2011). Retention of antioxidant activity in gamma irradiated argentinian sage and oregano. *Food Chemistry*, 126, 121–126.

Perna, A., Intaglietta, I., Simonetti, A., Calbi, P., & Gambacorta, E. (2014). Effect of geographical provenance on the physico-chemical, antioxidant characteristics and sensory evaluation of chestnut honeys. *IJFANS.*, 3(6), 86-96.

Petet, A.A., & Casimir, I.O. (2010). Hepatoprotective effect of the solvent fractions of the stem of *Hoslundia opposita* Vahl (Lamiaceae) against carbon tetrachloride and paracetamol induced liver damage in rats. *Int. J. Green. Pharm.*, 4: 54-58.

Peyret, M. (1991). Mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques. *Lyon pharmaceutique Elsevier*, 42, 31-41.

Pineli, L.L., Moretti, C.L., Rodrigues, J.S., Ferreira, D.B., & Chiarello, M.D. (2012). Variations in antioxidant properties of strawberries grown in Brazilian savannah and harvested in different seasons. *J. Sci. Food Agric.*, 92(4), 831-838.

Piquemal, G. (2008). Les flavonoïdes (en ligne) : http://www.detoursante.com/index.php?Option=com_content&view=article&id=166&Itemid=215.

References bibliographiques

Poirot, R. (2007). Méthodologie pour le passage en continu d'extraction de soluté à partir de matière végétale. *Thèse de Doctorat. Option : Mécanique, Energétique, Génie Civil, Procédés. Spécialité : Génie des procédés et Environnement. L'institut National Polytechnique de Toulouse.* 129p.

Polumin, N. (1967). *Eléments de géographie botanique.* Ed. Ganthiers Willars. Paris. 535p.

Pouquet, J. (1952). Les monts du Tessala (chaîne sud-tellienne d'Oranie). *De geogr. Alpine.* 40 (4): 691 – 694.

Putod, R. (1962). Moyens complémentaires de la lutte contre l'érosion dans le cadre de la rénovation rurale. *Ann. Du centre Algérien de recherche et d'expérimentation forestière n°1.* Déc. 1962

Q

Quezel, P. (1983). Flore et végétation de l'Afrique du Nord, leurs signification en fonction de l'origine de l'évolution et des migrations des flores et structures de végétation passés. *Revue. Bothalia.* 14: 411-416.

Quezel, P., & Santa, S. (1962). *Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales.* Tome I. Edition : CNRS, Paris. France. 565p.

Quezel, P., & Santa, S. (1963). *Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales.* Tome II. Edition : CNRS, Paris. France. 605p.

Quezel, P., Barbero, M., Benabid, A. Loisel, R. Rivas Martinez, S. (1988). Contribution à l'étude des groupements pré-forestières et des matorrals Rifains. *Ecologia Mediterranea* 1(2), 76-122.

R

Rantley, M.B., Mavraganis, K., & Eckert, C.G. (1999). Effect of population size on the mating system in a self compatible, antoganons plant; *Aquilegia Canadensis* (Ranunculaceae). *Revue. Heredity.* 82: 518-528.

Rao, K.S, Mishra, S.H, (1997). Hepatoprotective activity of *Inula racemosa* root. *Fitoterapia,* 68 (6): 510-514.

Rasooli, I., & Abyaneh, M. R. (2004). Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food. Control.* 15: 479-483.

References bibliographiques

- Rathi A., Srivastava A.K., Shirwaikar A., Rawat A.K.S. & Mehrotra S. (2008). Hepatoprotective potential of *Fumaria indica* Pugsley whole plant extracts fractions and an isolated alkaloid protopine. *Phytomedicine*, 15: 470-477.
- Ray, S. D., Wong, V., Rinkovsky, A., Bagchi, M., Raje, R. R., & Bagchi, D., (2000). Unique organoprotective properties of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cadmium chloride-induced nephrotoxicity, dimethylnitrosamine (DMN)-induced splenotoxicity and mocap-induced neurotoxicity in mice. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*107: 105-128.
- Remsy, C., Manach, C., Texier, O., & Regeat, F. (1996). Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. *Med. Nutr.* 32: 17-27.
- Rex, J.H., Rinaldi, M.G., & Pfaller, M.A. (1995). Resistance of *Candida* species to fluconazole (Minireview). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39, 1-8.
- Richardson, J.E., Fay, M.F., Cronk, Q.C.B., Bowman, D., & Chase M.W. (2000). A molecular analysis of Rhamnaceae using *rbcL* and *trnL-F* plastid DNA sequences. *American Journal of Botany* 87: 1309-1324.
- Rieu, M., & Chevery, C. (1976). Mise au point bibliographique sur quelques recherches récentes en matière de sols salés. *Cah.O.R.S.T.O.M. Sér. D. 281* : 123-126.
- Romane, F. (1987). Effectiveness of the Distribution of Growth Forms for Vegetation Analysis at the Regional Level. *Ph. D. Thesis, Aix-Marseille III*.
- Roose, E., Arabi, M., Chebbani, R., Mazour, M. & Morsli, B. (1998). Les montagnes méditerranéennes d'Algérie. Impact de l'intensification de l'agriculture de montagne sur l'environnement et les revenus. *Revue. OSTROM, N° 56*, 26-27p.
- S**
- Saccardyl, I. (1949). Note générale sur la lutte contre les érosions des sols en Algérie. *Rev. Terre et eaux n°9*, Alger.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglian, M., Manfredini, S., Radice, M. & Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. *Food Chem.* 91: 621-632.
- Sagdic, O. & Ozcan, M. (2003). Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control.* 14: 141-143.

References bibliographiques

Sallie R., Tredger J.M. & William R. (1991). *Drugs and the liver*. Part I. "Testing liver function". *Biopharm Drug Disp*; 12, pp.251-259.

Sanmugapriya, E., Venkataraman, S. (2006). Studies on hepatoprotective and antioxidant actions of *Strychnos potatorum* Linn. seeds on CCl₄-induced acute hepatic injury in experimental rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 105, 154-160

Sarada, K., Jothibai Margret, R., & Mohan, V.R. (2012). Hepatoprotective and Antioxidant Activity of Ethanol Extracts of *Naringi crenulata* (ROXB) NICOLSON against CCL₄ induced hepatotoxicity in rats, *IJPSR* 3 (03), 874-880.

Sarni-Manchado, P., & Cheynier, V. (2006). *Les polyphénols en agroalimentaire*. Ed. Tec & Doc, Paris. 2-10p.

Seigler, D.S. (1998). *Plant secondary metabolism*. Ed. Kluwer Academic, Boston. 193-205p.

Seltzer, S. (1946). *Le climat d'Algérie*. Ed. Alger. 219p.

Senhadji, O., Faid, M., Elyachioui, M., & Dehhaoui, M. (2005) Etude de l'activité antifongique des divers extraits de cannelle. *Journal de Mycologie Médicale*. 15: 220-229p.

Shah P.A., Parmar MY, Thakkar V.T. & Gandhi T.R. (2010). Protective effect of *Hordeum vulgare* Linn. on acetaminophen-induced Liver Damage. *J. Young Pharm*, Vol 1, N° 4, 336-340.

Sharma, O.P., & Bhat, T.K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113, 1202-1205.

Shizuka, S., & Kawabata, J.J. (2005). Effects of electron-withdrawing substituents on DPPH radical scavenging reactions of protocatechuic acid and its analogues in alcoholic solvents. *Tetrahedron*, 61, 8101-8108.

Singh, B., Saxena, A.K., Chandan, B.K., Anand, K.K., Suri, O.P., SuriSatti, K.A., & SuriSatti, N.K. (1998). Hepatoprotective activity of verbenalin on experimental liver damage in rodents. *Fitoterapia*. 69: 134–140.

Sourabié, T.S, Nikiéma, J.B, Nacoulma, O.G, & Guissou, I.P, (2006). Etude préliminaire du pouvoir antihépatotoxique d'une plante de la pharmacopée burkinabé préconisé dans le traitement traditionnel de la jaunisse : cas d'Argemone mexicana L. (Papaveraceae). *J. Soc. Path. Exot.*, 2-3 Novembre, Ouagadagoudou.

Sourabié, T.S, Nikiéma, J.B, Nacoulma, O.G, & Guissou, I.P, (2012). Etude comparée des effets antihépatotoxiques d'extraits d'Argemone mexicana (Papaveraceae) une plante utilisés

References bibliographiques

dans le traitement traditionnel de la jaunisse au Burkina Faso. *Int. Biol. Chem. Sci.* 6(3) : 1139-1147.

Spichiger, R. (2004). Préface. In: Aeschimann, D., Lauber, K., Moser, D.M. & Theurillat, J-P. *Flora alpina. Atlas des 4500 plantes vasculaires des Alpes*. 1: 7-8. Belin, Paris.

Spichiger, R., Savolainen, V., Figeat, M. & Jeanmonod, D. (2004). *Systematic Botany of Flowering Plants*. Science Publisher, Inc. Genève. 184p.

Srebotnik, E., & Messner, K. (1994). A simple onethod that use differential staining and light microscopy to assess the selectivity of wood delignification by white rot fungi. *Appl-Environ. Microbiol.* 60: 1383-1386.

Stapleton, P.D., Shah, S., Hamilton-Miller, J.M.T., Hara, Y., Nagaoka, Y., Kumagai, A., Uesato, S., & Taylor, P.W. (2004). Anti- *Staphylococcus aureus* activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-*O*-acyl-catechins. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 24, 374-380

St-Pierre, B., Vazquez-Flota, F.A., & De Luca, V. (1999). Multi cellular action of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. *The Plant Cell*. 11: 887-900.

Subramanian, S., Stacey, G., & Yu, O. (2007). Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends Plant Sci.* 12: 282-285.

T

Takahashi, H., Kamimura, H., & Ichinoe, M. (2004). Distribution of Aflatoxin-Producing *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in Sugarcane Fields in the Southernmost Islands of Japan. *J. Food Prot.* 67: 90-95.

Thorne, R. F. (1992). Classification and geography of the flowering plants. — *Bot. Rev.*, 58, 225–348.

Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 98-106.

Tlili-Ait Kaki, Y., Bennadja, S., & Chefrou, A. (2013). Revalorisation d'une essence endémique : le sapin de Numidie (*Abies numidica*). *Fl. Medit.*, 23, 123-129.

Tohge, T., Matsui, K., Ohme-Takagi, M., Yamazaki, M., & Saito, K. (2005). Enhanced radical scavenging activity of genetically modified *Arabidopsis* seeds. *Biotechnol. Lett.* 27: 297-303.

References bibliographiques

Toukara, A. (2006). Etude de l'activité hépatoprotectrice de deux plantes médicinales du Mali. *Thèse de doctorat, Faculté de Médecine, pharmacie et d'odontostomatologie, Mali*. P.188.

Traoré, Y., Ouattara, K., Yéo, D., Doumbia, I., & Coulibaly, A. (2012). Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). *J. Appl. Biosci.*, 58, 4234-4242.

Treki, S., Merghem, R. & Dehimat, L. (2009). Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne d'une labiée : *Thymus hirtus* L. *Science et Technologie*. 9 : 25-29p.

Tricart, J. (1978). *Géomorphologie applicable*. Ed. Masson. Collection de géographie.

Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T., & Inuma, M. (1996). Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.*, 50, 27-34.

Turkmen, N., Velioglu, Y.S., Sari, F. & Polat, G. (200). Effect of Extraction Condition on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*. 12: 484-496.

U

Ulanowska, K., Majchrzyk, A., Moskot, M., Jak__bkiewicz-Banecka, J., & W_Âgrzyn, G. (2007). Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia*: 62: 132-135.

Urquiaga, I. N. E. S., & Leighton, F. E. D. E. (2000). Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biol. Res*. 33: 55-64.

V

Valles, V. (2006). Support de cours en pédologie. *Doct. Univ. Avignon*. 15p.

Valnet, J. (2001). *Les médecins secrètent les sciences occultes et divinatoires*. Phytothérapie. Ed. 6. Vigot, Paris, 701p.

Valsaraj, R., Pushpangadan, P., Smitt, U. W., Adersen, A., Christensen, S. r. B. g., Sittie, A., Nyman, U., Nielsen, C., & Olsen, C. E. (1997). New Anti-HIV-1, Antimalarial, and Antifungal Compounds from *Terminalia bellerica*. *J. Nat. Prod*. 60: 739-742.

Van Delden, C., & Iglewski, B. H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis*. 4: 551-560.

References bibliographiques

Vanden Bosshe, H., Marichal, P., Odds, F.C., Le Jeune, L., & Coene, M.C. (1992). Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36, 2602-2610.

Verpoorte R., (2002). *La pharmacognosie du nouveau millénaire: pistes et biotechnologies. Des sources du savoir aux médicaments du futur*, 4^o congrès européen d'ethnopharmacologie. IRD Ed: Paris, 274 p.

Vinod, K.G., Amit, R., Vikas, K.N., & Kalishankar, M. (2010). Antimicrobial activity of *Spondias pinnata* resin. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(16), 1656-1661.

W

Wächter, G. A., Hoffmann, J. J., Furbacher, T., Blake, M. E., & Timmermann, B. N. (1999). Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochem.*52: 1469-1471.

Walle, T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biol. Med.* 36: 829-837.

Wang, H., Gao, X.D., Zhou, G.C., Cai, L., & Yao, W.B. (2008). In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. *Food Chem.*, 106, 888-895.

Wei, B. L., Lin, C. N., & Won, S. J. (1992). Nakahalene and Cytotoxic principles of Formosan *Rhamnus* Species. *J. Nat. Prod.* 55: 967-969.

Williams, B.G., & Honey, D. (1982). An electromagnetic induction, technique for reconnaissance surveys of soil salinity hazards. *Austr. J. Soil Res.* 20. 107-118.

Y

Yang, J., Chen, C., Zhao, S., Ge, F., & Liu, D. (2014). Effect of solvents on the antioxidant activity of walnut (*Juglans regia* L.) shell extracts. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(9), 621-626.

Yekhlef, G., Laroui, S., Hambaba, L., Aberkane, M.C., & Ayachi, A. (2011). Evaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. *Phytothérapie*, 9, 209-2018.

Yu, L., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., & Haley, S. (2003). Antioxidant properties of bran extracts from "Akron" wheat grown at different locations. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1566-1570.

References bibliographiques

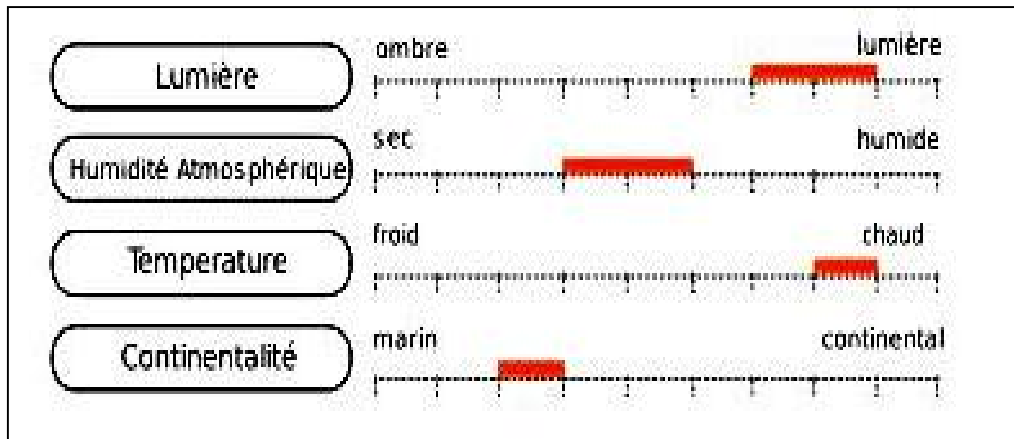
Yu, L., Haley, S., Perret, J., & Harris, M. (2004). Comparison of wheat flours grown at different locations for their antioxidant properties. *Food Chem.*, 86, 11-16.

Z

Zhishen, J, Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scanenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.*, 64: 555-559.

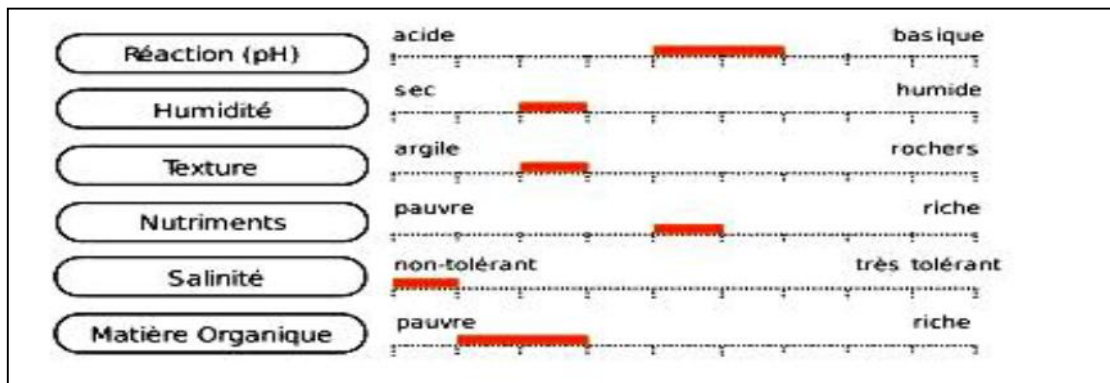
Zhou, K., Laux, J.J., & Yu, L. (2004). Comparison of Swiss red wheat grain, and fractions for their antioxidant properties. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 1118-1123.

Annexes



a) : Optimum climatique pour l'espèce *Rhamnus alaternus* L.

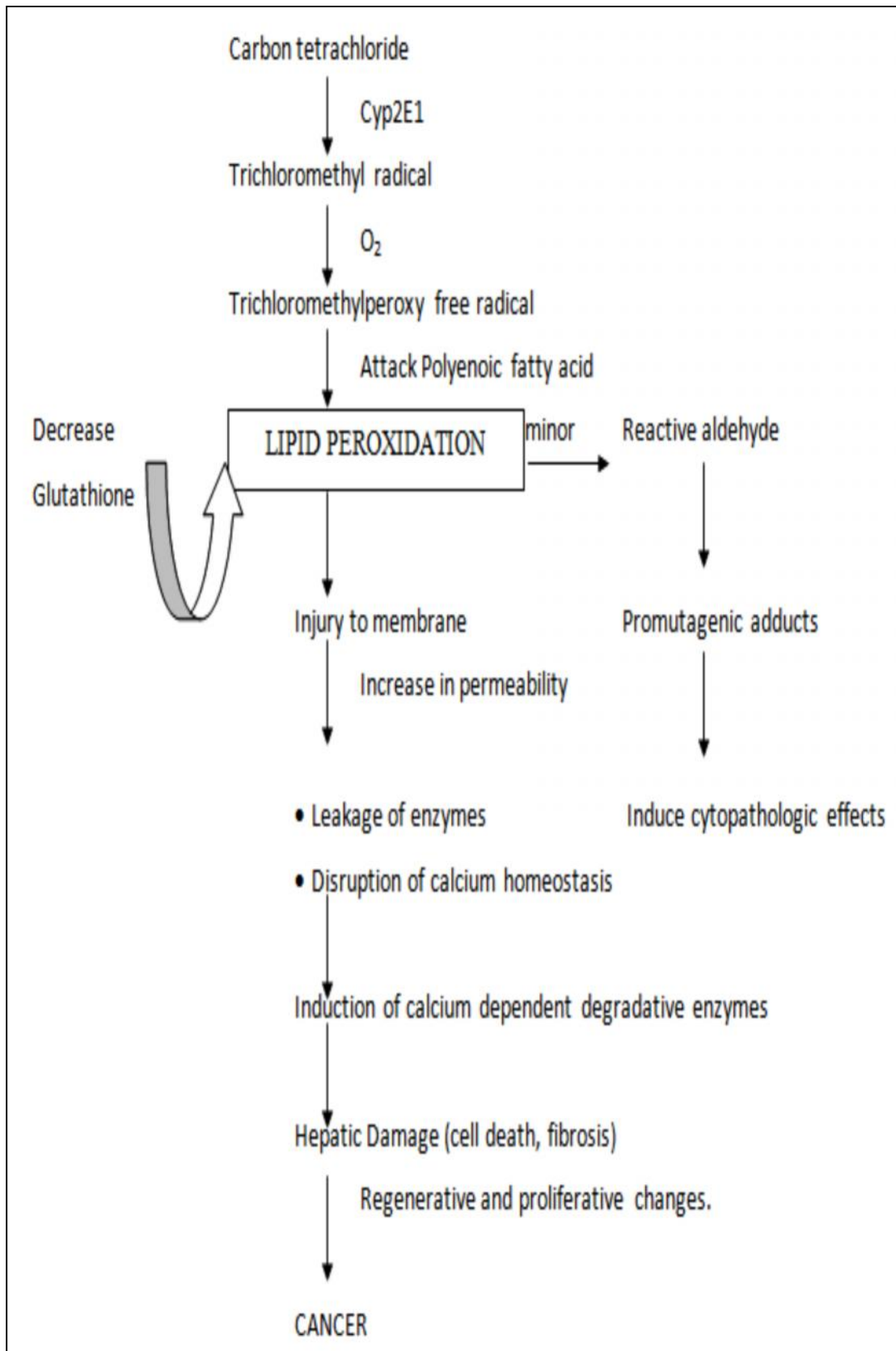
Lumière 1 : hypersciaphiles 2 : sciaphiles 3 : intermédiaires 4 : hémisciaphiles 5 : intermédiaires 6 : hémihéliophiles 7 : intermédiaires 8 : héliophiles 9 : hyperhéliophiles **Température** 1 : alpines à nivales, altiméditerranéennes 2 : subalpines, oroméditerranéennes 3 : montagnardes 4 : collinéennes, psychroatlantiques 5 : planitiales à montagnardes 6 : planitiales thermophiles, thermoatlantiques, thermocontinentales, subméditerranéennes, supraméditerranéennes 7 : euryméditerranéennes, méditerranéo-atlantiques 8 : mésoméditerranéennes 9 : thermoméditerranéennes à subdésertiques **Humidité atmosphérique** 1 : aéroxérophiles 2 : intermédiaires 3 : aéromésoxérophiles 4 : intermédiaires 5 : aéromésohydriques 6 : intermédiaires 7 : aéromésohygrophiles 8 : intermédiaires 9 : aérohydrophiles **Continentalité** 1 : marines à maritimes 2 : hyperocéaniques 3 : océaniques 4 : subocéaniques 5 : intermédiaires 6 : précontinentales 7 : subcontinentales 8 : continentales 9 : hypercontinentales



b) : Optimum édaphique pour l'espèce *Rhamnus alaternus* L.

Réaction (pH) 1 : hyperacidophiles 2 : acidophiles 3 : intermédiaires 4 : acidoclines 5 : intermédiaires 6 : neutroclines 7 : neutrophiles 8 : basophiles 9 : hyperbasophiles **Humidité** 1 : hyperxérophiles 2 : perxérophiles 3 : xérophiles 4 : mésoxérophiles 5 : mésohydriques 6 : mésohygrophiles 7 : hygrophiles 8 : hydrophiles 9 : amphibies saisonnières 10 : amphibies permanentes 11 : aquatiques superficielles 12 : aquatiques profondes **Texture** 1 : argile 2 : intermédiaire 3 : limon 4 : sable fin 5 : sable grossier 6 : graviers 7 : galets 8 : blocs, fentes des parois 9 : dalle **Nutriments** 1 : hyperoligotrophiles 2 : oligotrophiles 3 : intermédiaires 4 : mésooligotrophiles 5 : mésotrophiles 6 : mésoeutrophiles 7 : intermédiaires 8 : eutrophiles 9 : polytrophiles **Salinité** 0 : ne supportant pas le sel 1 : hyperoligohalines, [0-0,1% Cl⁻] 2 : peroligohalines, [0,1-0,3% Cl⁻] 3 : oligohalines, [0,3-0,5% Cl⁻] 4 : mesooligohalines, [0,5-0,7% Cl⁻] 5 : mesohalines, [0,7-0,9% Cl⁻] 6 : mesoeuhalines, [0,9-1,2% Cl⁻] 7 : euhalines, [1,2-1,6% Cl⁻] 8 : polyhalines, [1,6-2,3% Cl⁻] 9 : hyperhalines, [>2,3% Cl⁻] **Matière Organique** 1 : lithosol, arénosol 2 : mull carbonaté 3 : mull actif 4 : mull acide 5 : moder 6 : mor, hydromor, xéromor 7 : ranker, tangel 8 : anmoor, gyttja 9 : tourbe.

Annexe 1 : Optimum écologique pour l'espèce *Rhamnus alaternus* L.



Annexe 2 : Proposition de mode d'action principal du tétrachlorure de carbone.

Annexes

a) : Statistiques descriptives

Variable	Observations	Obs. avec données manquantes	Obs. sans données manquantes	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type
FLA	20	0	20	0,070	224,982	31,989	56,706

Variable	Modalités	Effectifs	%
ORGANE	1	10	50,000
	2	10	50,000
EXTRAITS	1	4	20,000
	2	4	20,000
	3	4	20,000
	4	4	20,000
	5	4	20,000

b) : Matrice de corrélation

Variables	ORGANE-1	ORGANE-2	EXTRAITS-1	EXTRAITS-2	EXTRAITS-3	EXTRAITS-4	EXTRAITS-5	FLA
ORGANE-1	1,000	-1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	- 0,357
ORGANE-2	-1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,357
EXTRAITS-1	0,000	0,000	1,000	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	- 0,225
EXTRAITS-2	0,000	0,000	-0,250	1,000	-0,250	-0,250	-0,250	- 0,110
EXTRAITS-3	0,000	0,000	-0,250	-0,250	1,000	-0,250	-0,250	- 0,064
EXTRAITS-4	0,000	0,000	-0,250	-0,250	-0,250	1,000	-0,250	0,658
EXTRAITS-5	0,000	0,000	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	1,000	- 0,260
FLA	-0,357	0,357	-0,225	-0,110	-0,064	0,658	-0,260	1,000

c) : Régression de la variable : Coefficients d'ajustement

Observations	20,000
Somme des poids	20,000
DDL	10,000
R²	0,964
R² ajusté	0,933
MCE	216,959
RMCE	14,730
MAPE	255,327
DW	2,967
Cp	10,000
AIC	113,731
SBC	123,689
PC	0,107

d) : Analyse Type I Sum of Squares

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
ORGANE	1	7765,600	7765,600	35,793	0,000
EXTRAITS	4	27736,551	6934,138	31,961	< 0,0001
ORGANE*EXTRAITS	4	23423,108	5855,777	26,990	< 0,0001

Annexe 3 : Traitement statistique concernant la teneur en flavonoïdes des 2 parties végétatifs pour les 5 extraits flavonoïques.

a) : Statistiques descriptives :

Variable	Observations	Obs. avec données manquantes	Obs. sans données manquantes	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type
Antioxydant	120	0	120	-1,677	85,754	42,170	22,251

Variable	Modalités	Effectifs	%
Organe	1	60	50,000
	2	60	50,000
Extrait	1	24	20,000
	2	24	20,000
	3	24	20,000
	4	24	20,000
	5	24	20,000
Concentration	1	20	16,667
	2	20	16,667
	3	20	16,667
	4	20	16,667
	5	20	16,667
	6	20	16,667

b) : Régression de la variable Antioxydant : Coefficients d'ajustement

Observations	120,000
Somme des poids	120,000
DDL	60,000
R²	0,941
R² ajusté	0,882
MCE	58,327
RMCE	7,637
MAPE	15,512
DW	2,959
Cp	60,000
AIC	524,749
SBC	691,999
PC	0,178

Annexe 4 : Traitement statistique concernant l'activité antioxydante des 5 extraits flavonoïques des 2 parties végétatifs

a) : Statistiques descriptives

Variable	Observations	Obs. avec données manquantes	Obs. sans données manquantes	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type
Antimicrobien	200	0	200	0,000	5,000	2,113	2,132

Variable	Modalités	Effectifs	%
Organe	1	100	50,000
	2	100	50,000
Extrait	1	40	20,000
	2	40	20,000
	3	40	20,000
	4	40	20,000
	5	40	20,000
Concentration	1	40	20,000
	2	40	20,000
	3	40	20,000
	4	40	20,000
	5	40	20,000
Souche	4	100	50,000
	5	100	50,000

b) : Régression de la variable Antimicrobien : Coefficients d'ajustement

Observations	200,000
Somme des poids	200,000
DDL	116,000
R²	0,705
R² ajusté	0,493
MCE	2,305
RMCE	1,518
MAPE	27,664
DW	1,981
Cp	84,000
AIC	226,043
SBC	503,102
PC	0,723

c) : Analyse de la variance

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	83	637,554	7,681	3,333	< 0,0001
Erreur	116	267,343	2,305		
Total corrigé	199	904,897			

d) : Analyse Type I Sum of Squares

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Organe	1	2,423	2,423	1,756	0,186
Extrait	4	19,692	4,923	3,567	0,007
Concentration	4	2,539	0,635	0,460	0,765
Souche	4	780,056	195,014	141,313	< 0,0001
Organe*Extrait	4	11,575	2,894	2,097	0,081
Organe*Concentration	4	12,234	3,059	2,216	0,067
Organe*Souche	4	7,260	1,815	1,315	0,264
Extrait*Concentration	16	19,309	1,207	0,874	0,599
Extrait*Souche	16	32,479	2,030	1,471	0,109
Concentration*Souche	16	10,027	0,627	0,454	0,966
Organe*Extrait*Concentration	16	30,442	1,903	1,379	0,150
Organe*Extrait*Souche	16	36,342	2,271	1,646	0,056
Organe*Concentration*Souche	16	38,142	2,384	1,727	0,041
Extrait*Concentration*Souche	64	63,126	0,986	0,715	0,948

Annexe 5 : Traitement statistique concernant l'activité fongique des 5 extraits flavonoïques des 2 parties végétatifs

Annexes

a) : Statistiques descriptives

Variable	Observations	Obs. avec données manquantes	Obs. sans données manquantes	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type
Essais	40	0	40	0,000	1008,000	332,150	317,209

b) : Régression de la variable Essais : Coefficients d'ajustement

Observations	40,000
Somme des poids	40,000
DDL	20,000
R ²	1,000
R ² ajusté	1,000
MCE	20,000
RMCE	4,472
MAPE	5,119
DW	3,135
Cp	20,000
AIC	132,103
SBC	165,881
PC	0,000

c) : Analyse Type I Sum of Squares:

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Groupe	4	184415,350	46103,837	2305,192	< 0,0001
Paramètre	3	3459727,300	1153242,433	57662,122	< 0,0001
Groupe*Paramètre	12	279688,450	23307,371	1165,369	< 0,0001

Annexe 6 : Traitements statistiques concernant l'activité antihépatotoxique des deux extraits lyophilisés de *Rhamnus alaternus* L.

Publications Internationales

Publication N° 1

Benchiha Walid, Mahroug Samira, Bennaoum Zineb and Bouterfas Karim. Characterization of Habitat of *Rhamnus alaternus* L. at the Jebel Tessala (North-Western Algeria). **J. Chem. Chem. Eng. 8 (2014) 1036-1048**. doi: 10.17265/1934-7375/2014.11.004.

Site:

<http://www.davidpublisher.org/Public/uploads/Contribute/55067f33d5617.pdf>



From Knowledge to Wisdom

Journal of Chemistry and Chemical Engineering

International Standard Serial Number: ISSN 1934-7375

Paper Acceptance Notice

240 Nagle Ave #15C, New York, NY 10034, USA

19/12/2014

BENCHIHA WALID

Laboratoire de biodiversite vegetale : valorisation et conservation, Departement de l'environnement, Faculte des sciences de la nature et de la vie, Sidi Bel Abbes.

Dear BENCHIHA WALID,

Thank you very much for your support and contribution to our journal!

We are pleased to inform you that your paper titled Characterization of habitat of Rhamnus alaternus L. at the Jebel Tessala (Wilaya de Sidi Bel Abbes, North Western Algeria) paper No.: JCHE-E2014120802 (authors): BENCHIHA WALID, MAHROUG SAMIRA, BENNAOUM ZINEB, BOUTERFAS KARIM) has passed the examination of our Journal's Peer-Review Committees, it will be published on the Journal of Chemistry and Chemical Engineering recently.

Thank you very much for your cooperation!

Best wishes!

Sincerely,

Journal of Chemistry and Chemical Engineering, ISSN 1934-7375, USA

David Publishing Company

<http://www.davidpublishing.com>

E-mail: chemistry@davidpublishing.org; chemistry@davidpublishing.com;

chemistry_davidpublishing@yahoo.com

Address of Headquarters: David Publishing Company, 240 Nagle Ave #15C, New York, NY 10034, USA

Tel.: 1-323-9847526; fax: 1-323-9847374 (USA).

E-mail: chemistry@davidpublishing.org; chemistry@davidpublishing.com ; chemistry_davidpublishing@yahoo.com

Characterization of Habitat of *Rhamnus alaternus* L. at the Jebel Tessala (North-Western Algeria)

Benchiha Walid*, Mahroug Samira, Bennaoum Zineb and Bouterfas Karim

Department of Environment, Faculty of Nature and Life, Djillali Liabes University, Sidi Bel Abbès 22000, Algeria

Abstract: In this study, the authors were interested to the evaluation of biodiversity in the Jebel Tessala. Ten stations were selected based on altitudinal gradient, inside each station, identified flora has been conducted and a soil sample was taken from. A floristic inventory was carried out from all stations characterizing habitat of our studied taxon which is *Rhamnus alaternus* L. The authors established a list of plants represented by 94 species, distributed in 46 botanical families that are dominated by *Asteraceae*. The biological spectrum of these species reveals the dominance of hemicryptophytes and therophytes. The biogeographical element which predominates the vegetation is the Mediterranean-type. Statistical processing PCA (principal component analysis) from the pedological analysis of the examined stations reveals the formation of three groups defining a set of station that are marked by the presence of some components of the soil. Data processing obtained by FCA (factorial correspondence analysis) and the ascending hierarchical classification had underscored the existence of two groups of strata according to the soil substrate.

Key words: Altitudinal gradient, FCA, Jebel Tessala, PCA, statement flora.

1. Introduction

The Mediterranean area is highly diversified by plant species and presents a great interest to any scientific research. Its high floristic richness is related to the heterogeneity of paleogeographic, geological and ecological aspects [1], but the current situation is dramatic in various North African countries [2]. In Algeria, the recent work on the Mediterranean formation affirms the regression of this floristic diversity [3]. Disruptions to the origin of this regression are complex and difficult to quantify on phytosociologic and geobotanic terms [4]. The mounts of Tessala located at the west of Algeria, is a space which combines climatic, geographical and lithological factors. It is also noted that the distribution of different plant formations from that synchronizes our species study, in these mountains remains poorly studied to this day despite the many works carried [5-7]. In this context, the authors were interested on the study of a characteristic plant of our

region: *Rhamnus alaternus* L., this study presents a specific originality with phytoecological characters that used major ecologic variants: climate, altitude, soil and vegetation due to its important distribution of the north of Algeria. *Rhamnus alaternus* L. in a polymorphic plant in the form of a tree or a sub-shrub with non-thorny branches of 1 m to 5 m easily recognized by its red berries at first, then black at maturity, characteristic species of mediterranea scrublands [8]. These formations are represented by a species complex of particular interest but which remain subject to continuous uncontrolled human pressures [9]. These constitute a direct risk to the renewal of biological resources as well as to the equilibrium of our study area.

2. Experiments

2.1 Study of Area and Selection of Stations

The mounts of Tessala are one of the important chains of the Tellian Atlas of Algeria. Lying on a hundred kilometers from the south west to the north east, they rise above the hills of Ain Témouchent and plain sebkha Oran (Mléta) to the north, Isser and the

*Corresponding author: Benchiha Walid, Ph.D. Student, research field: valorization of biologic diversity. E-mail: benchihawalid@gmail.com.

plain of Sidi-bel-Abbes in the south. They provide fairly modest relief from 500 m to 1,000 m, where the soft and flattened forms for most of the peaks and ridges contrast with the youth of some valleys and landslides and gullies of certain aspects. It is in the east of Tessala mountain where the peak of 1,061 m that the chain has the most mountainous [10]. The pleated structure seems scarcely revealed only by the overall direction of the solid and that of the main ridge lines [11]. The climate is a Mediterranean type in cool winters, with average annual rain fall of 290 mm to 420 mm. Average monthly temperatures are between 9.4 °C and 26.6 °C, the average minimum temperature of the coldest month ranges between 2.5 °C and 3.3 °C and average maxima of the month most hot rarely exceed 30 °C [12]. Several field surveys allowed us a good prior knowledge of Jebel Tessala (Tessala Mountain). Then, we selected 10 stations (Table 1) at the north and south sides according to an altitudinal gradient.

2.2 Soil and Plant Analysis

The soil samples were taken from each station to the horizon surface depth of 10 cm to 20 cm, they are then allowed to dry the open air for 15 days. After drying, the soil is sifted with a mesh sieve of 2 mm separating the gross elements of less than 2 mm fine soil. After the sifting, the authors will access the physico-chemical analysis by Aubert methods [12] in his manual of soil test. Different parameters were

examined: the granulometry, the degree of humidity the total rate of limestone, the active limestone, pH, conductivity and the rate of organic matter. For floristic inventory, the authors used the method recommended by phytosociological approach, Braun-Blanquet [14], also called sigmatist methodology. This approach, widely used in ecology for the diagnosis of different vegetation communities, the authors allowed the elaboration of floristry table. In this study, the minimum area shall be 100 m². This area was adopted in all station samples by referring to certain phytoecological studies undertaken on the vegetation of our study area [9-15]. On each of the selected stations, an exhaustive list of species is made during the period of optimal vegetation from April to May, 2012. The species are identified by reference to the flora [16-18] dried and then placed in herbarium and archived.

2.3 Statistical Treatment

The mean values of the different physico-chemical parameters of the examined soil samples and the number of species and botanical families were identified with comparison of the test of ANOVA (analysis of variance) and Tukey’s test by using the software Minitab 16. The similarity in species composition between the studied stations is performed by β Sorensen similarity index of [17, 18] and J (Jaccard) index [19]. Statistical analyses that can meet the primary objective of this ecological study include:

Table 1 Geographical coordinates of stations sampled.

Station	North latitude	West longitude	Altitude (m)	Exposition
St 1	35°16’34”	0°46’253”	797	South-East
St 2	35°16’161”	0°46’570”	842	South-East
St 3	35°16’729”	0°47’246”	874	North-West
St 4	35°16’186”	0°46’962”	891	South-West
St 5	35°16’249”	0°47’079”	907	South-East
St 6	35°16’504”	0°46’784”	929	North-East
St 7	35°16’378”	0°47’103”	941	South-West
St 8	35°16’370”	0°46’879”	967	South-West
St 9	35°16’511”	0°46’540”	986	South-West
St 10	35°16’482”	0°46’555”	990	South-West

the FCA (factorial correspondence analysis), AHC (ascending hierarchical classification) and PCA (principal component analysis).

3. Results and Discussion

3.1 Edaphic Studies

The observed physico-chemical analysis variations that appear on different soils are summarized (Table 2).

The soil analyses were performed at the level of soil laboratory of the NIAR (National Institute of Agronomic Research) in Sidi Bel Abbès. For each station, the authors took a single sample of the horizon surface, as the composition of the latter is the most important to study the vegetation. The sand is the dominant element in most soils, with rates varying between 45% and 68% at the stations (St 2 and St 4), this percentage is likely due to their location on rather steep where the runoff contributes to the depletion elements purposes of soil. The proportion of silts and clays varies with smaller percentages. The rate of up to 32% silts at the station (St 7) and clay content of no more than 25% by stations (St 9 and St 10). The structure is a balanced type, it is situated between Silty-Sand for the following stations (St 2-St 3-St 4-St 7-St 8) Silty-Clay to Sandy for the stations (St 1-St 5-St 6-St 10) and silt for the station (St 9). The authors note a humidity which reaches 30.51% and 23.3%, respectively in St 1 and St 8, this is because of the

important altitude. The importance of these percentage stations (St 3 and St 6) is explained by their location in the North Slope. However, there has been a low level, this is due to the evaporation of humidity which is due to exposure at lighting and hot wind. The pH is generally between 7.42 and 7.98 which defines alkaline pH where the biological activity of the soil is high and rapid. Only the station sample (St 5) has a substantially acid pH (6.75). The conductometer measures indicate on-saline soil (conductivity less than a 0.6 Ms/cm. Most samples define proportions of organic carbon higher than 4% indicating a relative richness in organic matter. The other stations are hovering around 2% to 4% that reflects soil with an average grade except for the station (St 2) where it is poorly represented with a content of only 1.53%. This wealth related to the humidity is relatively high and the rate of recovery of the studied plants. For the total limestone contents, the sketch of our results revealed on-limy soil for plants (St 6 and St 7), other medium limestone stations (St 4-St 8-St 9-St 10) and finally strongly limy stations (St 2 and St 5). The levels of active limestone are less than 4%, it reached 3.74 in St 4 and 3.75 in St 5. The statistical treatment was based on the soil cover and predestined that aims to PCA stations. This process is used to analyze quantitative numerical data tables to reduce the dimensionality of the main interaction between variable and plotting

Table 2 Physico-chemical analysis of different soils.

Sample	pH	EC	Total lime	Active lime limestone	OM	Sand	Limon	Clay	Humidity
St 1	7.42	0.29	4.4	/	4.2	50	25	25	30.51
St 2	7.58	0.15	28.57	1.12	1.59	65.59	6.56	8.65	8.25
St 3	7.68	6.06	4.7	/	6.46	65	29	15	12.8
St 4	7.98	8.08	7.8	3.47	2.8	68	15	17	3.36
St 5	6.74	0.13	60.14	3.75	2.46	59.63	9.51	10.93	8.11
St 6	7.55	0.14	2.8	/	8.58	45	28	27	13.51
St 7	7.66	0.06	2.3	/	7.68	50	32	18	7.07
St 8	7.77	7.07	6.2	3.32	8.64	56	25	19	23.3
St 9	7.76	0.06	5.1	2.40	8.35	45	27	28	10.05
St 10	7.78	8.08	5.3	2.42	8.36	47	25	28	14

St: station; pH: hydrogen potential; EC: electric conductivity; OM: organic matter.

the interaction factors. The implementation of the CPA (principal component analysis) is performed using the software Statistiqua 6.0.

The circle of correlation shown in Fig. 1 gives us the formation of different groups. Thus, the F1 factorial axis which represents a percentage of inertia about 57.71% demonstrates three groups:

- G1: consists of St 9 and St 10 which offers high levels of clay, silt and organic matter. They are no saline soils with an alkaline pH;
- G2: defining a set of St 1, St 3, St 6, St 7 and St 8 correlated positively with active limestone which is absent in the whole set, although the structure is no discernible difference and the higher rate of humidity which is in relation with coincident altitude, these stations are marked by the importance of altitudinal gradient;
- G3: represented only by St 4, this isolation is due to the importance of the sand that is on the order of 68%.

3.2 Floristry Study

Surveys conducted in the field have allowed us to quantify the floristic richness and diversity of the ecosystem of Tessala Mountain. The systematic characterization of this plant diversity has shown that the total of 94 recorded species distributed over 39 different families, the family which is best represented is the *Liliaceae* with a rate of 10.59%, followed by *Asteraceae* (9.41%), then the *Poaceae* (8.62%) and the *Lamiaceae* (6.66%). The *Alliaceae*, *Amaryllidaceae*, *Crasulaceae*, *Orobanchaceae*, *Hyacinthaceae* and *Illecebraceae* are less represented in this flora with a proportion of 0.8%. The *Arecaceae*, *Liliaceae* and *Poaceae* dominate St 1, St 2 and St 6; the *Lamiaceae* and *Liliaceae* are better figured in station St 5, St 6, St 8, St 9 and St 10. The *Cistaceae* fits better in St 5 and St 10, a plant is the result of the vegetative part of his body, of all biological processes.

The therophytes are clearly dominating all stations.

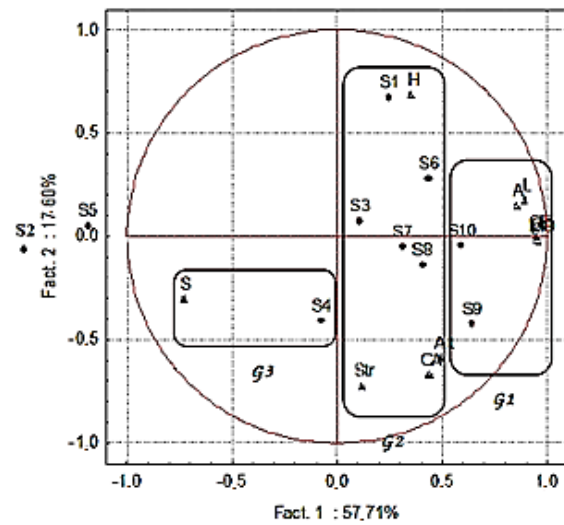


Fig. 1 Circle correlation (PCA) from the soil analysis of the studied plants.

Table 3 Distribution of biological types of the inventoried vegetation.

Biological type	Rate (%)
Therophytes	39.25
Hemichryptophytes	23.14
Chamaephytes	6.2
Geophytes	11.16
Phanerophytes	20.25

The analysis of Table 3 shows that the hemichryptophytes are more present in St 4, St 5 and St 10. The phanerophytes and the geophytes marked the St 5, St 6, St 7 and St 9. The chamaephytes are less represented. The annual herbaceous plants define the highest (58.37%) rate, followed by perennial herbaceous plants with 22.45%.

Ligneous plants and biennial herbaceous plants, respectively 17.96%, 1.22%. Perennial herbaceous plants dominate St 3 and St 10 and perennial ligneous plants are better St 5 and St 7. The biennial herbs are the least represented.

The results of the phytoecological study for 10 stations are shown in Table 4.

For 94 inventoried species those affected by a factor of 5 and 4 are defined as very abundant species, we recorded only two species, respectively *Eucalyptus globulus* in St 2 and *Pinus halepensis* in St 9. They represent rarely grouped isolated individuals. Most

Table 4 Phytoecological rebuilt of different stations.

Species	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	F (%)
<i>Aegylops triuncialis</i> L.	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
<i>Allium ampeloprasum</i> L.	-	-	-	-	-	1.2	-	-	-	1.3	20
<i>Ammi visnaga</i> L.	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1	20
<i>Ampelodesma mauritanicum</i> (Bir) et Schiz		1.1		++	1.2	1.1	1.1			++	60
<i>Anacyclus clavatus</i> (Desf.) Person	1.1	1.+	-	-	-	-	-	-	1.1	-	30
<i>Anacyclus cyrtolpidoides</i> (Pomel) Humphries	-	-	-	-	-	-	-	1.1	-	-	10
<i>Anagallis arvensis</i> L.	2.3	1.3	1.2	1.1	2.3	1.3	1.2	2.1	-	-	80
<i>Anthyllis tetraphylla</i> L.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2	10
<i>Arum</i> sp.	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	10
<i>Asparagus acutifolius</i> L.	-	++	-	++	++	++	-	-	++	++	60
<i>Asparagus stipularis</i> . Forsk.	++	-	++	-	-	-	-	-	-	++	30
<i>Asperula hirsuta</i> Desf.	-	-	-	++	++	-	-	++	-	-	30
<i>Asphodelus microcarpus</i> Sal et Viv.	++	++	-	++	-	-	++	++	++	++	70
<i>Astragalus vogelli</i> . (Webb) Bornm	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	10
<i>Avena sterilis</i> L.	1.1	-	-	-	-	-	-	-	1.1	-	30
<i>Ballota hirsuta</i> Benth.	1.1	++	-	1.+	-	-	++	1.+	-	1.2	60
<i>Bellis anua</i> L.	1.1	1.1	-	-	++	1.1	1.2	-	-	1.2	60
<i>Borago officinalis</i> L.	-	-	-	-	1.+	-	++	1.+	-	-	30
<i>Bromus rubens</i> L.	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	10
<i>Calycotome villosa</i> (Poirot) Link	1.1	++	1.2	-	1.2	++	1.2	1.1	-	-	70
<i>Centaurea acaulis</i> L.	1.+	-	-	-	-	-	++	++	-	1.+	40
<i>Centaurea calicitrappa</i> L.	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	10
<i>Centaurea euriophora</i> L.	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
<i>Cerinthe major</i> L.	-	-	-	-	1.+	++	-	-	-	-	20
<i>Chamaerops humilis</i> L.	1.1	++	++	-	1.+	1.1	++	2.+	-	-	70
<i>Cistus albidus</i> L.	-	-	-	-	++	-	-	1.+	-	-	20
<i>Cistus crispus</i> L.	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	10
<i>Cistus salviifolius</i> L.	-	-	1.1	-	-	-	-	-	-	1.1	20
<i>Convolvulus althaeoides</i> L.	1.1	2.1	++	++	++	1.1	++	++	-	1.+	90
<i>Cynoglossum</i> sp.	-	-	-	++	-	++	-	-	++	-	30
<i>Dactylis glomerata</i> L.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	10
<i>Daphne gnidium</i> L.	++	-	-	-	++	-	++	++	-	-	40
<i>Daucus carota</i> L.	-	-	-	-	-	-	-	++	-	1.1	20
<i>Echium plantaginum</i> de Coincy	-	-	-	++	++	-	++	-	-	-	30
<i>Eeuphorbia</i> sp.	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	10
<i>Erodium chium</i> (L) Willd	-	-	-	++	-	1.1	-	-	-	-	20
<i>Erodium</i> sp.	-	-	-	++	-	-	-	-	++	++	30
<i>Eryngium tricuspdatum</i> L.	-	++	-	-	-	-	-	++	-	-	20
<i>Eucaliptus globulus</i> Labill.	-	5.4	-	-	-	-	-	-	-	-	10
<i>Fracsinus angustifloria</i> L.	-	1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	10
<i>Fumaria caprioliata</i> L.	-	-	-	-	-	1.2	-	-	1.2	++	30
<i>Helianthemum polyanthum</i> (L.) Mill.	-	-	1.4	-	-	-	-	-	-	1.1	20
<i>Helianthemum appeninum</i> (L.) Mill.	-	-	-	-	1.+	-	-	-	-	++	20
<i>Hordeum murinum</i> L.	++	-	++	-	-	++	++	++	++	-	60
<i>Juniperus oxycedrus</i> L.	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	10
<i>Lagurus ovatus</i> L.	1.+	-	-	-	-	++	-	-	-	-	20

Table 4 continued

Species	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	F (%)
<i>Launea nudicaulis</i> L.	-	-	++	++	-	1.+	-	-	-	++	40
<i>Lavatera cretica</i> L.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	10
<i>Lobularia maritima</i> (L.) Desvaux.	1.1	1.1	-	++	-	-	1.1	-	-	1.1	50
<i>Muscari comosum</i> L. Mill.	++	1.+	++	-	-	++	-	-	1.1	++	60
<i>Olea europaea</i> L. Var. oléaster.	-	++	-	++	1.1	++	++	-	-	-	50
<i>Ornithogallum umbellatum</i> L.	-	-	++	-	-	-	-	-	++	-	20
<i>Orobanche</i> sp.	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	10
<i>Pallensis spinosa</i> (L.) Cass.	1.1	-	-	-	-	-	++	-	-	1.2	30
<i>Paoaver roheoas</i> L.	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	10
<i>Paronychia argentea</i> (Pour.) Lamk.	1.2	-	1.1	-	-	-	-	-	-	-	20
<i>Phlomis crinite</i> Cav.	1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
<i>Pinus halepensis</i> Mill.	-	-	-	-	++	-	-	-	4.4	-	20
<i>Pistacia atlantica</i> Desf.	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	10
<i>Pistacia lentiscus</i> L.	-	-	++	-	++	-	++	++	-	++	50
<i>Plantago logopus</i> L.	1.2	-	-	++	1.1	++	-	-	-	-	40
<i>Plantago major</i> L.	-	-	1.1	-	-	-	1.1	-	-	-	20
<i>Plantago</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	10
<i>Quercus ilex</i> L.	-	-	1.1	++	1.1	1.1	1.2	++	-	++	70
<i>Raphanus raphanistrum</i> L.	1.1	++	++	-	++	++	++	++	++	++	90
<i>Reseda alba</i> L.	1.1	-	-	-	-	-	-	-	1.2	1.2	30
<i>Rhamnus alaternus</i> L.	-	-	++	-	1.+	1.1	++	-	-	1.2	50
<i>Rubia peregrina</i> L.	-	++	-	-	-	++	-	-	-	++	30
<i>Rubus ulmifolius</i> Schott.	-	-	-	-	-	++	-	-	-	++	20
<i>Rumex bucephalophorus</i> L.	++	-	1.1	++	-	-	++	-	-	-	40
<i>Rumex thyrsoides</i> Desf	-	-	++	-	-	++	-	-	-	-	20
<i>Ruta chalepensis</i> L.	1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
<i>Ruta Montana</i> (Cluss.) L.	-	-	++	-	-	-	-	-	++	-	20
<i>Scarbiosa stellata</i> L.	++	-	-	++	-	-	-	-	-	++	30
<i>Scilla peruviana</i> L. Speta	-	-	++	-	-	-	-	-	1.2	-	20
<i>Sederitis incana</i> L.	-	-	++	-	1.+	-	-	1.+	-	++	40
<i>Sedum</i> sp.	-	-	++	-	++	1.1	-	-	-	-	30
<i>Silene colorata</i> L.	++	-	-	-	1.1	-	++	-	-	++	40
<i>Silybum marianum</i> L. Gaertn	-	-	-	++	-	-	-	-	++	-	20
<i>Sinapsis arvensis</i> L.	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
<i>Smilax aspesa</i> Var. altissima	-	-	++	-	-	++	-	-	-	-	20
<i>Smilax aspera</i> Var. genuina	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	10
<i>Stachys ocymastum</i> (L.) Briq.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	10
<i>Stellatum</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	10
<i>Stipa tenacissima</i> L.	-	-	-	-	1.1	-	-	-	-	-	10
<i>Teucrium pollium</i> L.	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	10
<i>Teucrium pseudochamaepitys</i> L.	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	10
<i>Thymus ciliatus</i> Desf.	-	-	-	-	-	-	-	1.1	-	-	10
<i>Thymus vulgaris</i> L.	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
<i>Trifolium angustifolium</i> L.	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
<i>Trifolium stelatum</i> L.	++	1.2	-	-	++	-	-	-	-	-	30
<i>Urginea maritima</i> (L.) Baker.	1.2	1.1	1.1	++	-	++	++	1.1	-	-	70
<i>Urtica membranica</i> L.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	10
Number of species	35	21	26	24	30	30	25	23	18	35	

Table 5 Indices of diversity.

Stations	St 1	St 2	St 3	St 4	St 5	St 6	St 7	St 8	St 9	St 10
Number of species	35	21	26	24	30	30	25	23	18	35
ShI (bit/individual)	1.66	2.07	1.95	1.76	2.03	1.75	2.07	1.94	2.02	2.07
<i>E</i>	0.15	0.32	0.25	0.24	0.22	0.19	0.27	0.28	0.37	0.20

ShI: the Shannon index; *E*: equitability index.

species are assigned by an index ranging between 1 and 2 where the recovery is from less than 25% to less than 5%, the latter species are abundant or may be present as: *Anagalis arvensis*, *Ballota hirsuta*, *Ruta chalepensis*, *Calycotum spinosa*, *Convolvulus althaeoides*, *Phlomis crinita*, *Quercus ilex* and *Helianthemum polyanthum*.

With regard to the frequency of species, we can distinguish very constant species such as *Convolvulus althaeoides*, *Raphanus raphanistrum*. This class corresponds to the species found in all records. This category corresponds to homogeneous vegetation and brings together the most commonly answered species:

- Abundant species; they indicate *Ampelodesma mauritanicum*, *Anagalis arvensis*, *Ballota hirsuta*, *Calycotome villosa*, *Cerentia major* and *Quercus ilex*;
- Frequent species such as *Anagalis monelli*, *Centaurea acoulis*, *Daphne gnidium*, *Launea nudicaulis*, *Lobularia maritima*, *Olea europea*, *Pistacia lentiscus*, *Rumex bucephalophorus* and *Silene colorata*;
- Rare species; we cite *Trifolium stelatium*, *Smilax aspesa*, *Silybum marianum*, *Sedum* sp., *Scabiosa stellata* and *Rubia peregrina*;
- Very rare species; this is the case of *Sinapis arvensis*, *Stachys ocymastum*, *Plantago major* and *Lavatera cretica*.

For the last two classes, the rarity of a species may be due to three reasons: either it is typical of an environment other than the one studied and there is an accident, or it is naturally rare and its frequency is low in all ecological conditions, or finally, it has very narrow ecological conditions: it is very low, it is frequent in a very small range of environments and absent elsewhere [20].

To evaluate the floristic diversity of the study site, the calculated species richness through the Shannon diversity index and equitability index was designed (Table 5).

The Shannon diversity index calculated for each station varies between 2.07 bit/individual for St 2, St 7, St 10 and 1.66 bit/individual for St 1. This variability is related to the heterogeneity of species. That said, the importance of the Shannon diversity index coincides with the environmental conditions favoring the installation of many species.

These variations in the equitability index are related primarily to the multiple human pressures and pastures. In our study, the stations are defining an equitability index relatively important between 0.20 and 0.37 (St 2, St 3, St 4, St 5, St 7, St 8, St 9, St 10) defining weakly distributed species. In contrast, those with low equitability index (0.15, 0.19) define evenly distributed species. The calculation of the Sorensen similarity index allows us to know the two stations.

The formation of groups is done by evaluating the similarity coefficient:

- G1: defining a set which is less than 0.5 (0.12-0.45), this plant formation indicates low similarity thus heterogeneity between stations by the point of view of specific richness that is clearly appeared in Fig. 2;
- G2: having a high similarity (0.50-0.56), these stations show homogeneity in terms of floristic composition.

3.3 Characterization of the Habitat of *Rhamnus alaternus* L.

The factorial analysis of correspondences is an approach that is well suited to phytosociological

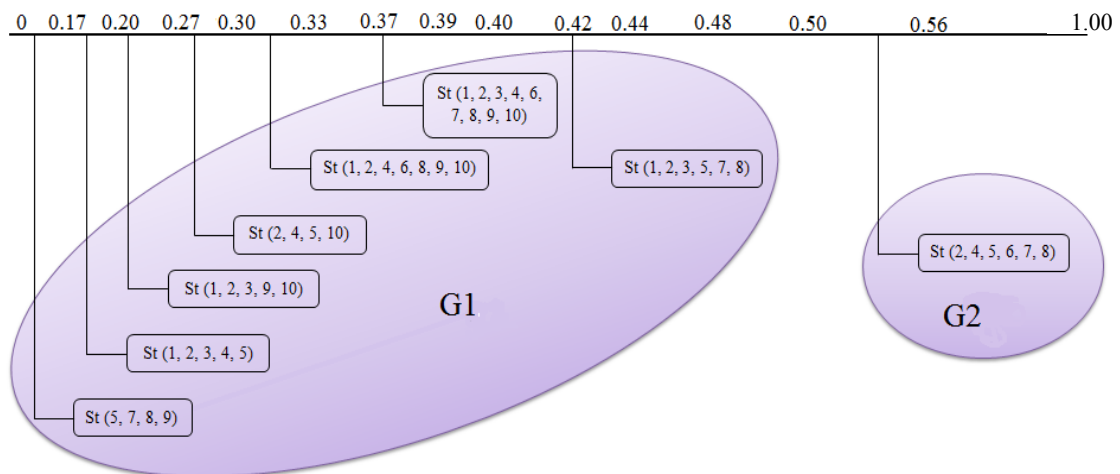


Fig. 2 Schematic of the formation of similar groups.

studies, as it allows to jointly treating floristic variables and soil variables [21]. This type of analysis allows discriminating objectively particular entities or comparing stations in pairs [22]. However, the projection points “species” and “variables” in the axes plane F1 (17.77% of inertia) and F2 (16.75%) reveals two large groups (G1 and G2) in Fig. 3.

In its negative part, the F1 axis is related to the G1 which forms the floristic cortege which are present in our study. The following species that are present: *Asparagus stipularis*, *Ammi visnaga*, *Avena sterilis*, *Anagallis monelli*, *Asphodelus microcarpus*, *Bellis anua*, *Centaurea acaulis*, *Cynoglossum* sp., *Erodium* sp., *Launea nudicaulis*, *Paoaver roheoas*, *Raphanus rafanistrum*, *Reseda alba*, *Rhamnus alaternus*, *Rumex bucephalophorus*, *Scarbiosa stellata*, *Urginea maritima*, *Ballota hirsuta*, *Pinus halepensis*, *Pallensis spinosa*, *Asparagus stipularis*, *Phlomis crinite* and *Helianthemum polyanthum*, had affinities with the fine soil (contents in silt and clay), humidity, altitude and organic matter. These species are emerging as scarce in these species in St 1, St 2, St 4, St 5 and St 10 on soil texture that is relatively balanced. They consist of degraded scrubs on slopes facing south. The tree stratum is virtually nonexistent. This project marks two endemics *Phlomis crinite* and *Helianthemum polyanthum* which is defined as rare species.

As the one progresses along the axis, we have the

formation of another group G2 characterizing its positive side, we have a succession of species formed. *Ampelodesma mauritanicum*, *Calycotome villosa*, *Chamaerops humilis*, *Teucrium pollium*, *Asparagus acutifolius*, *Anagallis arvensis*, *Cerinthe major*, *Helianthemum polyanthum*, *Stipa tenacissima*, *Pistacia atlantica*, *Daphne gnidium*, *Arum* sp., *Trifolium stelatum*, *Bromus rubens*, *Eucaliptus globules*, *Juniperus oxycedrus*, *Pistacia lentiscus*, *Quercus ilex* and *Thymus ciliatus*.

The dendrogram of HCA (ascending hierarchical classification) (Fig. 4) after the floristic analysis of the studied plants highlights two main groups (GA and GB):

- GA: divided itself into two groups; the first A1 is distinguished by its rich flora where the majority of species belong to the shrub and herbaceous strata (*Asphodelus microcarpus*, *Ballota hirsuta*, *Ampelodesma mauritanicum*, *Calycotome villosa*, *Chamaerops humilis*, *Paronychia argentea* and *Urginea maritima*), this does not preclude the presence of the stratum trees such as *Pistacia lentiscus* and *Quercus ilex* with a remarkable presence. The St 1 discerned by its altitude is less important than other stations. The second subgroup A2 consists of stations where the altitudinal gradient is very important, thus benefiting from precipitation and humidity. There are species such as: *Convolvulus althaeoides*, *Doucus*

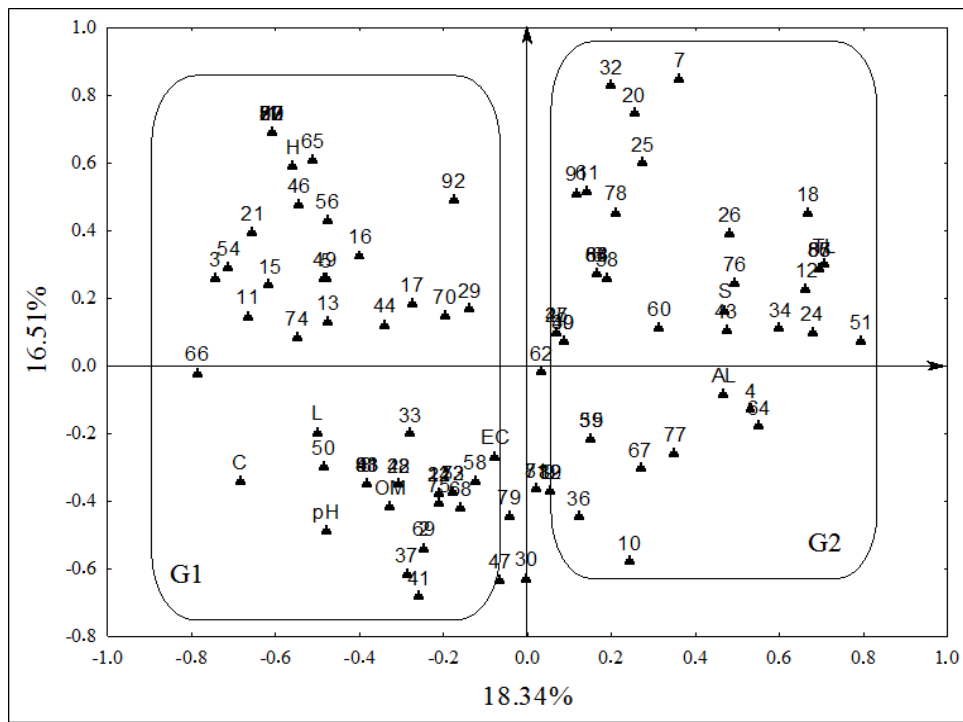


Fig. 3 Factorial analysis of the correspondences.

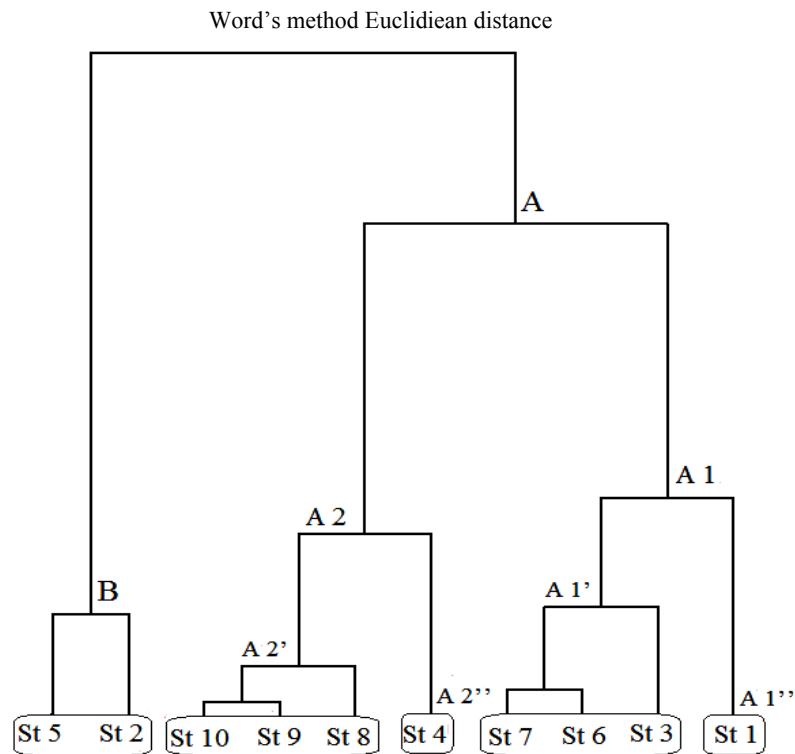


Fig. 4 Dendrogram of HCA.

carota, *Fumaria caprioliata*, *Pistacia* and *Pinus halepensis*. These formations are characteristic of scrubland;

- GB: according to the dendrogram, the group is considered as an out group. He is represented by two stations (St 2 and St 5) in southeast exposure, they are characterized by limestone substrate where species of herbaceous, shrub and tree *Eucalyptus globulus* which is very abundant in St 2 sync, *Olea europaea* Var. *Oleaster* and *Pinus halepensis*.

3.4 Discussion

3.4.1 Edaphic Analysis

The physico-chemical characteristics of the 10 stations have a high percentage of sand and a significant amount of silt. Previous work in the area of Tessala evoke the color of the soil is very heterogeneous, there are yellowish, blackish soil, others reddish brown and clear land [14]. Pouquet [11] asserted that the lumpy structures predominate on different soils. He added that the sandy texture and balanced texture were characteristic of soils in the region of Tessala. Our results corroborate those of the author; since the prevalence of balanced structure was observed on 10 stations. The hydrogen potential (pH) is a slightly alkaline soil, with the exception of the station which defines St 5 as slightly acidic soil. According to Dajoz [23], the pH is not a stable characteristic of the soil but depend on different cations absorbed of the nature of the vegetation and climatic conditions. It is also related to the amount of limestone in the soil, the mineral composition and soil salinity [24]. However, statistical analysis (PCA) revealed a correlation between pH and total calcium, it is quite important at St 2, St 4, St 5 and St 8.

The electrical conductivity indicates unsalted soils in all samples. The humidity is very variant on the studied soils. It depends on the nature of the substrate, the nature of humus and the sampling period [25]. However, the soil content of organic matter evokes the rich and medium quantities. Fluctuating soil

conditions can affect the floristic cortege that accompanies these species. According to Quezel et al. [1], species richness is the first approach to assess biodiversity.

3.4.2 Index Calculation

This wealth is uneven on all stations with a maximum value of 35 (St 1, St 10) and a minimum value of 18 at St 9. This heterogeneity is due to the distribution of the floras with relation to different environmental factors, sheep grazing and cuts that strongly contribute to the degradation of vegetation. This plant has an average of 24 species/station, it is there by qualified by average according to the classification of Daget and Poisson [26]. The Shannon diversity index calculated for each station varies between 2.07 bit/individual and 1.66 bit/individual. This facilitates the installation of many species. In contrast, the calculated of equitability index (*E*) reflects a weak presence of the dominant species in most stations except for St 1 and St 6 where species are well distributed.

The Sorensen similarity index shows that the majority of stations group a plant formation defining a low similarity where heterogeneity of stations is clearly observed. Lists of plants represented by 94 species were inventoried, they relate to 39 different botanical families with a predominance of *Liliaceae*, *Asteraceae*, *Poaceae* and *Alliaceae*. This importance is due to their overall contribution in Tessala flora and their Mediterranean area distribution.

3.4.3 Floristic Analysis

According to the floristic analysis, annual species and perennial herbaceous plants hold the first place. This increase is due to the invasion of therophytes and hemicryptophytes. For Roman [27], there is a good correlation between biological types and many phenomorphologic characters.

In addition, human action influences the morphological species distribution. However, Lefloc'h [28] claimed that, the sheep and goats differently like species classified by main

morphological types (Ligneous, erect, perennial herbaceous plants, annual, etc.). Sheep like annuals and almost regardless of the life stage where they are, while goats instead consume only little annuals plant.

The composition of the biological spectrum shows a predominance of therophytes (39.25%). This high proportion is due to the soil conditions and microclimate especially where the winter and spring period is relatively wet, alternating with a rather prolonged drought [29] period. Likewise, Floret et al. [30] reported that, when a system is influenced by man, therophytes are growing, reflecting the strong anthropic pressure experienced by the region of Tessala. Despite the importance of therophytes, hemicryptophytes keep a particularly important place with a rate of 23.14%. This can be explained by the richness of soil of organic matter; this phenomenon was confirmed by Barbero et al. [22]. The phanerophytes come in the third position with a share of about 20.25%. The geophytes and chamaephytes are the least represented. The chamaephytes type is described as best suited to the dry and settles proportionally and present a adaptation of forest environments [31]. Biogeographically, we have considered the inventory of present species at the mountains of Tessala. The latter is characterized by a heterogeneous distribution of species where dominate the formations of matorrals and scrublands. The formation that still plays a pre-forest and forest role is mainly the green oak. The distribution of phytochoric elements is very heterogeneous. Quezel [32] explains the biogeographical diversity of Africa hit by climate change suffered severely in this region since the Miocene, resulting in the migration of tropical flora. The Mediterranean type is very high with a rate of 43.81%, followed by the Euro-Mediterranean with 7.62%.

Concerning the frequency of occurrence, recovery varies across species stations. However, *Calycotome villosa*, *Ballota hirsuta*, *Chamaerops* and *Quercus ilex* by their presence in almost all stations stands-out as

being the abundant species. However, rare species are the majority in this inventory. We note for example, *Phlomis crinite*, *Pistacia atlantica*, *Juniperus oxycedrus*, *Thymus ciliatus* and *Helianthemum polyanthum*.

Dethier et al. [33] indicated that, rare species were generally stenoeccious species with very specific ecological requirements, both for their habitat and their food needs. In addition, they often have a slow and complex cycle. Many species are not yet known by only a few occurrences (sometimes older) and are thus sometimes wrongly called "rare". The rarity of species is sometimes connected to specialists by ignorance or failure of identification of this species. On the phytoecological plan, a statistical treatment through the FCA and HCA provides additional information for the distribution of plant communities. This allowed us to distinguish two facets on both side of the flaxis: the first group shows the major characteristics of the two species (*Phlomis crinite* and *Helianthemum polyanthum*), the latter is distinguished by the presence of taxa present in low abundance and by the abundance of herbaceous and shrub species. For soil parameters, this group is negatively correlated with the hydrogen potential ($R_2 = -0.72$) with organic matter ($R_2 = -0.72$), with electrical conductivity ($R_2 = -0.71$), the clay ($R_2 = -0.80$) and moisture ($R_2 = -0.53$). This is explained by the development of these taxa most often near croplands where organic matter is often important, and on soils where the fine fraction is needed (clay, silt), thus promoting the increase of moisture in the soil. In contrast, the second group characterized by the presence of four species (*Pistacia atlantica*, *Juniperus oxycedrus*, *Thymus ciliatus* and *Quercus ilex*) corresponds to a fairly advanced fascinated degradation. This formation defines generally scrublands with *Calycotome*.

4. Conclusions

Following this work, it is clear that the frequent heterogeneity of vegetation in a mountainous

environment, annual and even seasonal variations of the floristic richness and the condition of this one raise many problems of the final interpretation.

Through this ecological study that aims to assess the biodiversity of Jebel Tessala, we were able to identify in the entire inventory 94 species belonging to 46 families of vascular plants, the study of the species *Rhamnus alaternus* L. showed that this species is associated with scrubland to *Calycotome*, with great repartitions at low altitude. This species is related to light soil, moderately to strongly rich in organic matter, slightly humid with alkaline pH.

This shows very clearly that the study sites and the mountains of Tessala in general area important reservoir for either the amount of the flora presenter to the stock of medicinal plant species and aromatic characters, profitability offered by medicinal plants in this mountainous ecosystem, and is certain to be an economic priority that should be exploited, provided that all measures of accompaniments, conservation and recycling are met to ensure the protection of the plant heritage.

References

- [1] Quezel, P.; Barbero, M.; Benabid, A.; Loisel, R.; Rivas Martinez, S. Contribution to the Study of Forest Pre Groups and Matorrals Rif. *Ecologia Mediterranea* **1988**, *1(2)*, 76-122.
- [2] Quezel, P. *Reflections on the Evolution of the Flora and Vegetation in the Maghreb Mediterranean*; Ibis Press: Paris, 2000; p 117.
- [3] Medail, F.; Quezel, P. *Ecology and Biogeography of Forests of the Mediterranean Basin*; Elsevier Coll, Environnement: Paris, 2003; p 573.
- [4] Hasnaoui, O. Study of Groups of *Chamaerops* Subsp. *Argentae* L. in the Tlemcen Region. Magister Thesis, Abu Bekr Belkaid University, October 1998.
- [5] Baraka, K. Inventory and Medicinal Plants Characterization Jebel Tessala (Wilaya of Sidi Bel Abbes). Magister Thesis, Djillali Liabes University, June 2008.
- [6] Bouzidi, M. A.; Latreche, A.; Attaoui, I.; Mehdadi, Z.; Benyahia, M. Characterization of Matorrals and Garrigues to *Urginea* Pancration (Steinh) Phil. in Jebel Tessala (Western Algeria). *Physical Geography and Environment* **2009**, *3*, 131-149.
- [7] Ouici, H. Inventory and Analysis of Plant Biodiversity on the South Side of Mount Tessala (Western Algeria). Magister Thesis, Djillali Liabes University, July 2011.
- [8] Quezel, P.; Santa, S. *Flores News of Algeria and Desert Regions Meridional*; CNRS (National Centre for Scientific Desired): Paris, 1963; p 586.
- [9] Cherifi, K.; Mehdadi, Z.; Latreche, A.; Bashir Bouiadjara, S. H. Action Anthropolozogene Impact on Forest Ecosystem Mont Tessala (Western Algeria). *Drought* **2011**, *22*, 197-206.
- [10] Kiekken, M. *Geology and Stratigraphy of the Monte of Tessala*; Floquet: Oran, 1962; p 220.
- [11] Pouquet, J. Mounts Tessala (String South Tellian of Oran). *J. Geogr Alpine* **1952**, *40(4)*, 691-694.
- [12] *Climatic Data Series of the Wilaya of Sidi Bel Abbes, Daily Readings Leaves the 1980-2009 Periods*; Algeria ONM (National Organization of Meteorology): Algiers, January, 2010.
- [13] Aubert, H. *On Soil Test Methods*; C.N.D.P (National Center for Educational Documentation): Marseille, 1987; p 99.
- [14] Braun-Blanquet, J. *Applied Phytosociology* **1952**, *116*, 156-161.
- [15] Ferka-Zazou, N. Impact of Spatiotemporal Occupancy of Parking on the Conservation of Forest Ecosystem: The Case of the Commune of Tessala, Wilaya of Sidi Bel Abbes, Algeria. Magister Thesis, Abu Bekr Belkaid University, June 2006.
- [16] Quezel, P.; Santa, S. *Flores News of Algeria and Desert Regions Meridional*; CNRS: Paris, 1962; p 1700.
- [17] Gaujour, E.; Amiaud, B.; Fiorelli, J. L.; Mignolet, C.; Coquil, X. Effects of Dynamic Cultural Practices When Converting to Organic Farming on Permanent Grassland Vegetation. *Agricultural Innovations* **2009**, *4*, 229-238.
- [18] Masharabu, T.; Noret, N.; Lejoly, J.; Bigendako M. J.; Bogaert, J. Comparative Study of Floristic Parameters Ruvubu National Park, Burundi. *Geo-Eco-Trop.* **2001**, *34*, 29-44.
- [19] De Bello, F.; Leps, J.; Sebastia, M. T. Grazing Effects on the Species-Area Relationship: Variation along a Climatic Gradient in NE (North-East) Spain. *Journal of Vegetation Science* **2007**, *18*, 25-34.
- [20] Gegout, J. L. Study of the Relationship between the Mineral Soil and Forest Vegetation in the Vosges. Ph.D. Thesis, Nancy I University, March 1995.
- [21] Djebaili, S. *Algerian Steppe, Phytosociology and Ecology*; OPU (Office of University Publications): Algiers, 1984; p 171.
- [22] Barbero, M.; Bonin, G.; Loisel, R.; Quezel, P. Sclerophyllus *Quercus* Forest of the Mediterranean Area: Ecological and Ethological Significance. *Bielefelder Ocol Beiter* **1989**, *4*, 1-23.

- [23] Dajoz, R. *Accurate Ecology*; Gauthier Villars: Paris, 1982; p 503.
- [24] Valles, P. *Support Courses in Soil Science*; Doct. Univ.: Avignon, 2006; p 15.
- [25] Bonin, P. *Knowledge of Soil-Introduction to Soil Science*; Doc. Soil Science Courses: Grenoble, 2006; p 21.
- [26] Daget, P.; Poissonet, J. Biodiversity and Pastoral Vegetation. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* **1997**, *50*, 141-149.
- [27] Romane, F. Effectiveness of the Distribution of Growth Forms for Vegetation Analysis at the Regional Level. Ph.D. Thesis, Aix-Marseille III, 1987.
- [28] Lefloc'h, E. Biodiversity and Management in Arid Pastoral Zone and Semi arid Mediterranean in Northern Algeria. *J. Bocconea* **2001**, *13*, 223-237.
- [29] Henaoui, A. Cysts in the Region of Tlemcen Ecological and Cartographic Appearance. Magister Thesis, University of Tlemcen, December 2013.
- [30] Floret, C.; Galan, M. J.; Le Floc'h, E.; Orshan, G.; Romane, F. Holm Oak. Dynamics of (*Quercus ilex* L.) Coppies after Clear Cutting in Southern France. *Vegetation* **1990**, *11*, 99-100.
- [31] Barbero M.; Loisiel, R.; Quézel, P. Contribution of Phyto-Ecology in the Interpretation of Changes and Disturbances Induced by Man on Mediterranean Forest Ecosystems. *Mediterranean Forests* **1990**, *2*, 194-215.
- [32] Quezel, P. Flora and Vegetation of North Africa and Their Significance in the Original Function of the Evolution and Migration of Flores and Structures of Vegetations Past. *Rev. Bothalia* **1983**, *14*, 411-416.
- [33] Dethier, M.; Fagot, J.; Walravens, E. Rare Species. *Wildlife Notes Gembloux* **2000**, *41*, 51-60.

Publication N° 2

W. Benchiha, S. Mahroug, L. Aoued, K. Bouterfas.
Antimicrobien et Antioxydant Activités des Flavonoïdes
Extraits des Écorces de *Rhamnus alaternus* L. du mont
de Tessala (Algérie Occidentale). European Journal of
Scientific Research. Vol. 130 No 4 March, 2015,
pp.396-406. ISSN 1450-216X / 1450-202X.

Site:

<http://www.europeanjournalofscientificresearch.com>

Ref: EJSR130408

Date: 25-04-2015

W. Benchiha

Laboratoire de Biodiversité Végétale : Conservation et Valorisation
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Université Djillali-Liabes
BP 89, Haï Larbi Ben M'Hidi, Sidi Bel Abbés, 22000, Algérie

S. Mahroug

Laboratoire de Biodiversité Végétale : Conservation et Valorisation
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Université Djillali-Liabes
BP 89, Haï Larbi Ben M'Hidi, Sidi Bel Abbés, 22000, Algérie

L. Aoued

Laboratoire de Synthèse de L'information Environnementale
Faculté de Médecine, Université Djillali-Liabes
Sidi Bel Abbés, 22000, Algérie
E-mail: benchihawalid@gmail.com
Tel: +213-542-19-59-20.

K. Bouterfas

Laboratoire de Biodiversité Végétale : Conservation et Valorisation
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Université Djillali-Liabes
BP 89, Haï Larbi Ben M'Hidi, Sidi Bel Abbés, 22000, Algérie

Dear Authors,

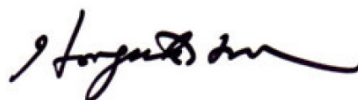
After having carefully evaluated your article titled “**Antimicrobien et Antioxydant Activités des Flavonoïdes Extraits des Écorces de *Rhamnus alaternus* L. du mont de Tessala (Algérie Occidentale)**” and taken the referees' advice into consideration, the editors came to the conclusion that your paper is suitable for publication in our Journal.

As part of our evaluation process, we normally ask the opinion of two referees who are experts in the relevant field of research. The paper is also read by the editor. If both of the referees and an editor concur in their view, their decision is final. We consult a third referee if there is a difference of opinion. The choice of referees and the fact that we require a consensus view between the referees and an editor ensures, however, that the process is as fair as possible.

Your article has been accepted for publication based on the reports of two referees and will be published in **European Journal of Scientific Research**, Volume **130** Issue **4**.

Thank you very much for choosing us as an outlet for publishing your research.

Yours sincerely,



Adrian Marcus Steinberg, PhD
Managing Editor



Antimicrobien et Antioxydant Activités des Flavonoïdes Extraits des Écorces de *Rhamnus alaternus* L. du mont de Tessala (Algérie Occidentale)

W. Benchiha

*Laboratoire de Biodiversité Végétale : Conservation et Valorisation
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Université Djillali-Liabes
BP 89, Haï Larbi Ben M'Hidi, Sidi Bel Abbés, 22000, Algérie*

S. Mahroug

*Laboratoire de Biodiversité Végétale : Conservation et Valorisation
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Université Djillali-Liabes
BP 89, Haï Larbi Ben M'Hidi, Sidi Bel Abbés, 22000, Algérie*

L. Aoued

*Laboratoire de Synthèse de L'information Environnementale
Faculté de Médecine, Université Djillali-Liabes
Sidi Bel Abbés, 22000, Algérie
E-mail: benchihawalid@gmail.com
Tel: +213-542-19-59-20.*

K. Bouterfas

*Laboratoire de Biodiversité Végétale : Conservation et Valorisation
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Université Djillali-Liabes
BP 89, Haï Larbi Ben M'Hidi, Sidi Bel Abbés, 22000, Algérie*

Résumé

Rhamnus alaternus L. est un arbuste qui appartient à la famille des *Rhamnaceae*. C'est une plante médicinale largement utilisée en médecine traditionnelle en Algérie. Cinq extraits flavonoïques obtenues des écorces de *Rhamnus alaternus* L. Les flavonoïdes ont été évalués par la méthode utilisant les chlorures d'aluminium AlCl₃ pour chaque extrait la teneur est estimée à 192.74 (Extrait. Acétatique), 31.47 (Extrait. Chloroformique), 20.38 (Extrait. Héxanique), 10.41 (Extrait. Brute), 3.49 (Extrait. Aqueux) mg Equivalent quercétine / gram d'extrait. L'activité antioxydant a été réalisée par le test anti radicalaire évalué en utilisant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH.), les concentrations inhibitrices à 50 % (CI50) sont estimées à 74.78 (Vitamine C), 143,78 (Catéchine), 101.78 (Acide gallique), 205.41 (Acide tannique), 210 (Acide caféique) µg/ml ; 48.37 (Ex.Br), 4.02 (Ex.Aq), 9.79 (Ex.Héx), 1.78 (Ex.Ac), 27.16 (Ex.Ch) mg/ml. L'activité antimicrobienne a été déterminée sur trois souches bactériennes (*Escherichia coli* ATTC 25922, *Bacillus cereus* ATTC 10876 et *Proteus mirabilis* ATTC 35659) et deux souches fongiques (*Aspergillus brasiliensis* ATTC 16404 et *Candida albicans* ATTC 10231).

Motsclés: *Rhamnus alaternus* L., flavonoïdes, activité antioxydant, activité antimicrobienne.

Abstract

Rhamnus alaternus L. is a shrub that belongs to the family of Rhamnaceae. It is a medicinal plant that is largely used in traditional medicine in Algeria. Five flavonoid extracts obtained of *Rhamnus alaternus* L. barks. The flavonoids were evaluated by a method that uses aluminum chloride $AlCl_3$ of each extract; the content is estimated at 19.33 for (Hexanic. Extract), 18.42 (Chloroformic.extract), 16.75 (Acetat.extract), 3.9 (Brut. Extract) and 3.02 (Aqueous. Extract) mg E quercetine/gram of extract. The antioxydant activity was realized by the antiradical test that was evaluated by using DPHH, the inhibitory concentration at 50% (CI50) were estimated at 74.78 (Vit.C), 143.78 (Catechine), 101.78 (Gallic acid), 205.41 (Tannic acid), 210 (Caffeic acid) $\mu\text{g/ml}$; 74.16 (Br.extr), 9.98 (Aq.extr), 54.08 (Hex.extr), 8.64 (Ac.extr), 30.49 (Ch.extr) mg/ml . The antimicrobial activity was determined on three bacterial strains (*Escherichia Coli* ATTC 25922; *Bacillus Cereus* ATTC 10876 and *Proteus Mirabilis* ATTC 35695) and two fungal strains (*Aspergillus brasiliensis* ATTC 16404 and *Candida Albicans* ATTC 10231).

Keywords: *Rhamnus alaternus* L., flavonoids, antioxydant activity, antimicrobial activity,

1. Introduction

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments par le billet de la découverte des nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de ce derniers (Maurice, 1997). Les premières recherches sur les propriétés antimicrobiennes des plantes utilisée en médecine traditionnelles, donnant une base scientifique à ces pratiques empiriques (Loubaki et al., 1999). Le genre *Rhamnus* (*Rhamnaceae*) inclut des espèces végétales médicinales bien connue possédants diverses propriétés biologiques (Mai et al., 2001). *Rhamnus alaternus* L. est un Arbuste à feuilles luisantes, ovoïdes ou lancéolées, alternes, lisses, pétiolées (3-6 sur 2-3), fleurs dioïque verdâtres, baie ou fruit petite c'est est une drupe à 2 ou 3 sillons extérieurs, rouge puis noire, à 4 noyaux, partout, broussailles, haies (Battandier et al., 1988). Les propriétés thérapeutiques de l'espèce *Rhamnus alaternus* L. ont été mises en évidence *in vitro*, elles sont dues à des composés actifs tels que les polyphénols (Ammar et al., 2008).

Certains auteurs ont entrepris des études limitées sur cette plante : Trois types de flavonoïdes ont été isolés à partir des feuilles de (*Rhamnus alaternus* L.) dans les travaux de Bhourri et al., 2011 ; Ammar et al., 2009) il s'agit de : Kaempferol 3O-isorhamnoside (K3O-ir); Rhamnocitrin 3O-isorhamnoside (R3O-ir) ; Rhamnetin 3O-isorhamnoside en évaluant l'activité antioxydant et activité génotoxique et antigénotoxique. En ce qui concerne le les propriétés antimicrobienne de *Rhamnus alaternus* L. l'activité antimicrobienne est déterminée par un extrait méthanolique obtenue à partir des écorce de la même espèce (Kosalec et al., 2013).

Le but de ce travail est d'estimer la teneur de cette plante en ces composées actifs principalement les flavonoïdes, et évaluer leurs pouvoir biologiques.

2. Matériel et Méthode

2.1 Matériel Biologique

Des écorces de *Rhamnus alaternus* L. ont été récoltées en Avril 2014 dans le mont de Tessala (Algérie occidentale). Elles ont été lavées à l'eau distillée, séchées à l'air libre et à l'ombre pendant une dizaine

de jours puis broyées avec un broyeur à couteau muni d'un filtre à mailles. Les souches microbiennes utilisées dans l'activité antimicrobienne proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection), cinq souches sont utilisées : trois bactériennes (*Escherichia coli* ATTC 25922, *Bacillus cereus* ATTC 10876 et *Proteus mirabilis* ATTC 35659) et deux fongiques (*Aspergillus braseliensis* ATTC 16404 et *Candida albicans* ATTC 10231). Les souches utilisées font partie de deux groupes de microorganismes : pathogènes et contaminants.

2.2 Extraction des Flavonoïdes

Les écorces broyées ont été macérées dans un mélange méthanol/ eau (7/3 : v/v) avec un rapport 1/10 (masse/v), sous agitation douce pendant une nuit à température ambiante. L'extrait hydroalcoolique est filtré sous vide, et le méthanol est évaporé à sec à l'évaporateur rotatif. L'extrait obtenu correspond à l'extrait brut (Ex.Br) des écorces. Cinquante millilitres de cet extrait ont été congelés puis lyophilisés afin de déterminer le rendement d'extraction (Markham, 1982 ; Merghem, 1995). L'EBr restant a été extrait par l'hexane (1/1, v/v) plusieurs fois jusqu'à ce que la phase hexanique devienne transparente. Après évaporation à sec à l'évaporateur rotatif, on obtient un extrait hexanique (Ex.Héx). La phase aqueuse est ensuite extraite plusieurs fois par le chloroforme puis par l'acétate d'éthyle pour donner les extraits (Ex.Ch) et (Ex.Ac). Ces deux extraits sont évaporés à sec à l'évaporateur rotatif. Cinquante millilitres de chaque extrait concentré (Ex.Héx, Ex.Ch, Ex.Ac et la phase aqueuse résiduelle (Ex.Aq) ont été congelés puis lyophilisés afin de déterminer les rendements d'extraction. Tous les lyophilisats ont été conservés à -20 °C jusqu'à leurs utilisations.

2.3 Rendements en Flavonoïdes

Les différents extraits obtenus après lyophilisation sont pesés pour déterminer le poids sec résultant. Les rendements ont été rapportés à 50 g de poudre d'écorce.

2.4 Teneur en Flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par (Zhishen et al., 1999) avec le trichlorure d'aluminium et la soude. La teneur en flavonoïdes totaux des extraits de plante étudiée est exprimée en milligramme (mg) équivalent de la catéchine par gramme d'extrait (mg EC/g d'extrait).

2.5 Activités Antioxydants: Test de Piégeage du Radical Libre DPPH

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par (Benhamou et al., 2009).

2.6 Tests Antimicrobiens

2.6.1 Test Antibactérien

Cette méthode permet de mettre en évidence l'effet antibactérien des extraits testés sur les souches bactériennes, ainsi que la détermination de la résistance où la sensibilité de ces souches vis-à-vis des différents extraits (Essawi and Srour, 2000 ; Bssaibis et al., 2009).

2.6.2 Test Antifongique

Ce test met en évidence la sensibilité des souches fongiques vis-à-vis des extraits testés, permettant ainsi de les classer selon leurs diamètres d'inhibition (Senhadji et al., 2005 ; Traoré et al., 2012 ; Vinod et al., 2010).

3. Résultats et Discussion

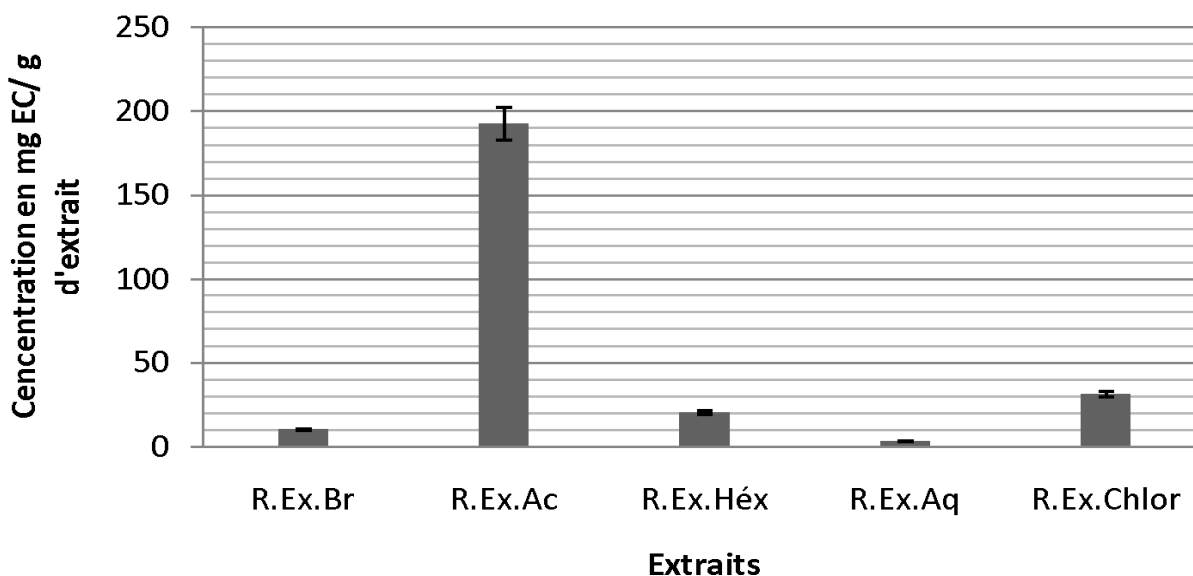
3.1 Rendement des Extraits Flavonoïques

Les extraits flavonoïques obtenus présentent différents aspects : pâteux, huileux et poudreux, de diverses couleurs marron foncé, marron clair. Ex.Br représente 31.28% du poids de matière sèche des écorces, suivi Ex.Héx 9.12%, Ex.Chl 8.16%, Ex.Aq 7.76%, Ex.Ac 0.52%. Par rapport à l'extrait brut les rendements sont : 24.08%, 1.66%, 26.08%, 29.15% respectivement pour Ex.Aq, Ex.Ac, Ex.Chl, Ex.Héx.

3.2 Teneur en Flavonoïdes

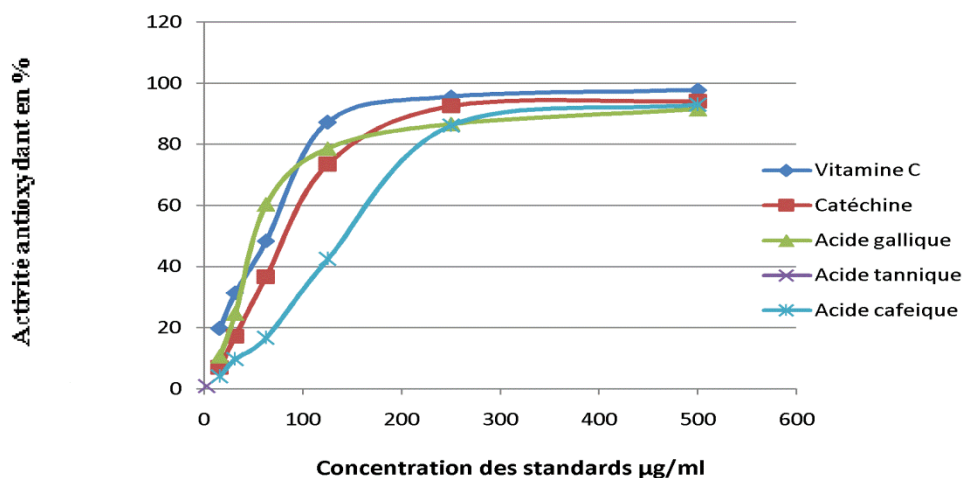
Les taux des flavonoïdes des cinq extraits ont été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage qui suit une équation de type : $y = 0.010 x + 0.064$ sachant que $R^2 = 0.990$. Les concentrations des flavonoïdes (Fig.1) sont relativement importantes dans les extraits dans leur majorité, les teneurs en flavonoïdes sont de 192.74 mg EQ/g d'extrait dans l'extrait acétatique suivi de : (31.47 ; 20.38 ; 10.41 ; 3.44) mg EQ/ g d'extrait respectivement pour les extraits suivant : Ex.Chl, Ex.Héx, Ex.Br, Ex.Aq.

Figure 1 : Teneur en flavonoïdes totaux pour les cinq extraits des écorces de *Rhamnus alaternus* L.

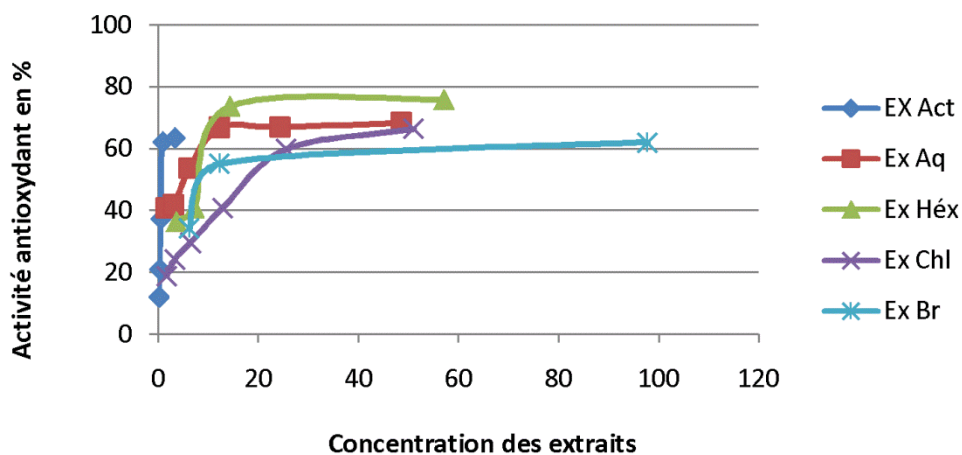


3.3 Test de Piégeage du Radical Libre DPPH

L'activité anti radicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH-H est formée. L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration des différents extraits utilisés et du témoin il s'agit de : vitamine C, catéchine, acide gallique, acide tannique, acide caféique (500 ; 250 ; 62.5 ; 31.25 ; 15.62) µg/ml. L'activité antioxydant des témoins utilisés est exprimée en CI50 et de l'ordre de : (74.56 ; 143.78 ; 101.78 ; 205.41 ; 210) µg/ml.

Figure 2: Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration des standards.

L'activité antioxydant des extraits est exprimée en CI50 (Abdulmajed et al., 2005 ; Ahmed et al., 2012 ; Ranga et al., 2009) est de (1.78 ; 4.08 ; 9.79 ; 27.16 ; 48.37) mg/ml respectivement pour les extraits : Ex.Ac, Ex.Aq, Ex.Héx, Ex.Ch, Ex .Br.

Figure 3: Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration des extraits flavonoïques des écorces de *Rhamnus alaternus* L.

3.4 Test Antimicrobien

Le test de la sensibilité des bactéries et des champignons est réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé, encore appelée méthode des disques (Celiktas et al., 200

Tableau 1: Diamètres moyens des zones d'inhibition en mm (Moyenne ± écart-type) des extraits flavonoïques

Extraits Flavonoïques	µg/ml	Diamètres des zones d'inhibition (en mm) et sensibilité des souches microbiennes											
		Bactéries						Champignons					
		<i>E. Coli</i>		<i>B. Cereus</i>		<i>P. mirabilis</i>		<i>A. brasiliensis</i>		<i>C. albicans</i>			
		D	S	D	S	D	S	D	S	D	S		
Ex.Br	100	0	-	0	-	0	-	25 ± 0.5	+	0	-		
	80	0	-	14.4 ± 1.26	+	0	-	16 ± 1.38	+	17.3 ± 1.50	+		
	60	0	-	8.3 ± 1.44	±	0	-	25.5 ± 0.42	+	15 ± 1.32	+		
	40	0	-	9.1 ± 1.57	±	0	-	8.3 ± 1.44	±	15.8 ± 1.01	-		
	20	0	-	0	-	0	-	15 ± 1.5	+	9 ± 0.79	±		
Ex.Hé x	100	0	-	0	-	0	-	IT	++	9 ± 1.55	±		
	80	0	-	0	-	0	-	IT	++	5.3 ± 0.92	±		
	60	0	-	5 ± 0.81	±	0	-	IT	++	0	-		
	40	0	-	9.3 ± 1.61	±	0	-	IT	++	21.8 ± 0.62	+		
	20	0	-	5.6 ± 0.98	±	0	-	IT	++	21.6 ± 0.28	+		
Ex.Ch	100	14 ± 0.14	+	9.7 ± 1.69	±	0	-	IT	++	24.2 ± 0.38	+		
	80	0	-	7.7 ± 1.34	±	0	-	IT	++	6.4 ± 1.11	±		
	60	0	-	25 ± 0.5	+	0	-	IT	++	15.6 ± 1.40	+		
	40	0	-	0	-	0	-	IT	++	11.6 ± 1.04	+		
	20	0	-	16.6 ± 1.44	+	0	-	IT	++	13.3 ± 1.25	+		
Ex.Ac	100	10.5 ± 1.07	+	0	-	0	-	IT	++	8.3 ± 1.44	±		
	80	0	-	0	-	0	-	IT	++	12.7 ± 1.11	+		
	60	0	-	5 ± 0.86	±	0	-	IT	++	16.4 ± 1.42	+		
	40	0	-	0	-	0	-	IT	++	5 ± 0.86	±		
	20	0	-	12 ± 0.07	+	0	-	IT	++	20.2 ± 0.73	+		
Ex.Aq	100	0	-	0	-	0	-	IT	++	5 ± 0.86	±		
	80	0	-	7.8 ± 1.37	±	0	-	IT	++	11.9 ± 1.04	+		
	60	0	-	8.3 ± 1.44	±	0	-	IT	++	22.4 ± 0.23	+		
	40	0	-	0	-	0	-	IT	++	20.4 ± 0.47	+		
	20	0	-	26 ± 0,17	+	0	-	IT	++	5 ± 0.86	±		

IT : inhibition totale de la croissance fongique, D : diamètre d'inhibition, S : Sensibilité, + : sensible, - : résistante, ± : intermédiaire.

Figure 4 : Effet inhibiteur des extraits (Ex.Br et Ex.Chl) et des antibiotiques vis-à-vis de *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis*.

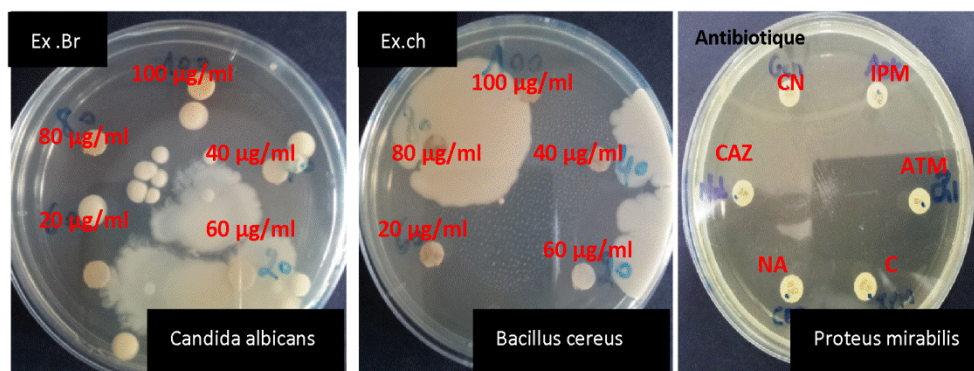


Tableau 2: Diamètres moyens des zones d'inhibition en mm (moyenne \pm écart-type) et sensibilité des souches microbiennes vis-à-vis des antibiotiques et antifongiques commercialisés

Antibiotiques	$\mu\text{g/ml}$	Diamètres des zones d'inhibition et sensibilité					
		<i>B. cereus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. mirabilis</i>	
		D	S	D	S	D	S
CN	10	25	+	25	+	IT	++
ATM	30	0	-	30	+	IT	++
NA	30	25	+	25	+	IT	++
CAZ	30	0	-	27	+	IT	++
C	30	25	+	30	+	IT	++
IPM	10	30	+	30	+	IT	++
Antifongiques	$\mu\text{g/ml}$	<i>A. brasiliensis</i>		<i>C. albicans</i>			
		D	S	D	S		
AMB	100	IT		++	0	-	
	50	IT		++	0	-	
	20	IT		++	0	-	
	10	IT		++	0	-	
FLC	100	0		-	0	-	
	50	0		-	0	-	
	20	35		+	0	-	
	10	25		+	0	-	
TER	100	IT		++	0	-	
	50	IT		++	0	-	
	20	IT		++	0	-	
	10	IT		++	0	-	

CN : Gentamicine, ATM : Aztréonam, NA : Acide nalidixique, C : Chloramphénicol, CAZ : Ceftazidime, IPM : Imipénème, NA : Nitrate d'éconazole, AMB : l'amphotéricine B, FLC : Fluconazole, TER : terbinafine.

L'utilisation des antifongiques et des antibiotiques commercialisés a permis d'établir un antibiogramme et un antifongogramme, à partir desquels sont classées les souches microbiennes selon leurs sensibilités (Tableau 2). Les souches microbiennes choisies ne présentent aucune résistance vis-à-vis des antibiotiques et antifongiques commercialisés sauf pour l'antibiotique ATM (Aztréonam) et CAZ (Ceftazidime) qui n'ont aucun effet sur la bactérie *Bacillus cereus*, ainsi que la résistance totale de l'espèce fongique *Candida albicans* face aux antifongiques utilisés (AMB, FLC, TER). On enregistre des diamètres d'inhibition qui varient entre 25-35 mm. Les extraits flavonoïques ne présentent aucun effet sur la bactérie *Proteus mirabilis*. Ex.Ac, Ex.Chl, exerce un effet sur la bactérie *E. Coli* qui représente une sensibilité (+) à la concentration 100% où son diamètre d'inhibition varie entre (10.5-14) mm. Le test antifongique a révélé une inhibition totale de tous les extraits flavonoïques vis-à-vis l'espèce fongique *Aspergillus brasiliensis* sauf pour l'extrait Brute où le diamètre d'inhibition varie entre (8.3-25) mm et des diamètres d'inhibition entre (5-24.2) mm pour les mêmes extraits face à *Candida albicans*.

Tableau 3: Classement des extraits flavonoïques selon leurs effets antibactérien et antifongique et des souches microbiennes selon leurs sensibilités.

Type de test et de souches		Sensibilités		Intermédiaire (±)		Sensible (+)		Totaux		
		Résistante (-)				N	%	N	%	N
		N	%	N	%					
Test antibactérien	Ex.Br	12	80	2	13	1	6	15	100	
	Ex.Héx	12	80	3	20	0	0	15	100	
	Ex.Chl	10	66	2	13	3	20	15	100	
	Ex.Ac	12	80	1	6	2	13	15	100	
	Ex.Aq	12	80	2	13	1	6	15	100	
Test antifongique	Ex.Br	2	20	2	20	6	60	10	100	
	Ex.Héx	1	10	2	20	7	70	10	100	
	Ex.Chl	0	0	1	10	9	90	10	100	
	Ex.Ac	0	0	2	20	8	80	10	100	
	Ex.Aq	0	0	2	20	8	80	10	100	
Bactéries	Souches microbienne									
		<i>Bacillus cereus</i>	10	40	10	40	5	20	25	100
		<i>Escherichia coli</i>	23	92	0	0	2	8	25	100
		<i>Proteus mirabilis</i>	25	100	0	0	0	0	25	100
	Champignons	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	0	0	1	4	24	96	25	100
<i>Candida albicans</i>		3	12	8	32	14	56	25	100	

Discussion

L'EBr représente le meilleur rendement en flavonoïdes, il est suivi respectivement par l'extrait héxanique, l'extrait chloroformique, l'extrait aqueux et l'extrait d'acétate d'éthyle. Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement d'extraction n'est que relatif et semble être lié aux propriétés génétiques de l'espèce utilisée, à la nature des organes pour une même espèce (Bruneton, 1999) à l'origine géographique (Narayana et al., 2001) aux conditions de récolte (Lin et Weng, 2006) et aux méthodes d'extraction appliquées (Markham, 1982).

L'extrait acétatique présente la plus grande teneur en flavonoïdes estimé de 192.74 mg EC/ gr d'extrait suivi par l'extrait chloroformique, extrait héxanique, extrait brute, et extrait aqueux. Ces résultats peuvent être ajoutés à celle trouvé par (Djeridane et al., 2007) qui est de 1 mg EQ/ g de MF pour un extrait éthanolique de la même espèce de la région de Laghouat, (Ben ammar et al., 2007) qui sont respectivement 28 et 21 mg EQ/100g de matière fraîche pour les extraits méthanolique et aqueux des feuilles de la même espèce de la région de la Tunisie, (Ben ammar et al., 2008) soit des teneurs de 15 et 20 mg EQ/g de matière fraîche pour des extraits méthanoliques des écorces des racines et des feuilles respectivement.

Tous les extraits ont un pouvoir anti-radicalaire envers le DPPH. (Fig. 3), plus la valeur de l'IC50 est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant.

L'extrait acétatique présente une forte activité antioxydante par rapport aux autres extraits utilisés avec des valeurs de (1.78) mg/ml mais ces résultats restent plus au moins proches à celles trouvées chez les antioxydants commercialisés notamment à la vitamine C (Acide ascorbique) qui est de 74.78 µg/ml. Une étude menée (Ben ammar et al., 2008) sur la même espèce de plante de la Tunisie a montré des IC50 de 7 et 19 µg/ml des écorces des racines et des feuilles respectivement, lorsque l'extraction a été menée par le méthanol suivie par une extraction dans le butanol saturé en eau. Cette valeur est nettement inférieure à celle trouvée avec nos extraits.

L'activité antibactérienne des extraits flavonoïques et les tests de sensibilité réalisés permettent de classer les extraits flavonoïques selon leurs effets. Toutes les souches bactériennes présentent une sensibilité intermédiaires avec un pourcentage de 6% jusqu'au 20% et des zones d'inhibition de 5 jusqu'au 26 mm sauf pour la souche bactérienne *Proteus Mirabilis* qui est une bactérie Gram – présente une résistance totale vis-à-vis des différents extraits flavonoïques.

Plusieurs travaux mettent en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram + par rapport aux bactéries Gram - (Hayouni et al., 2007 ; Koné et al., 2004). Cela peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram -. En effet, les bactéries Gram – possèdent une couche additionnelle à la membrane externe, composée de phospholipides ; de protéines et de lipopolysaccharides formant une barrière imperméable à la plupart des molécules hydrophobes (Georgantelis et al., 2007).

Les extraits flavonoïques des écorces de *Rhamnus alaternus* L. sont plus efficaces sur les champignons que sur les bactéries testées. En comparant nos résultats d'activité antifongique des extraits avec ceux des antifongogrammes il ressort que toutes les deux ont inhibé totalement la croissance de l'espèce fongique *Aspergillus brasiliensis* par contre l'espèce fongique *Candida albicans* présente une sensibilité de 80% vis-à-vis de tous les extraits flavonoïques utilisés avec un diamètre d'inhibition de 5 jusqu'au 24.2 mm et quasiment résistance face aux antifongiques commercialisés utilisés dans ce test.

Conclusion

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la teneur en flavonoïdes ainsi que le pouvoir antioxydant, antimicrobien des flavonoïdes extraits des écorces de *Rhamnus alaternus* L., plante médicinale largement utilisée en médecine traditionnelle dans de nombreux pays au monde.

À la lumière des résultats obtenus, il ressort que la teneur en flavonoïdes effectuée par la méthode d'AlCl₃ varie d'un extrait à un autre, l'ensemble d'extraits flavonoïques de *Rhamnus alaternus* L., exercent des effets antibactériens et antifongiques sur les souches microbiennes testées. Ces effets varient en fonction du type d'extrait flavonoïques et de ses concentrations, de la résistance ou la sensibilité des souches utilisées et présente un pouvoir antioxydant vis-à-vis du DPPH.

Ces résultats confortent l'utilisation de cette espèce en médecine traditionnelle en offrant à la médecine occidentale un potentiel qui peut être valorisé dans plusieurs domaines tels que les industries pharmacologiques.

References Bibliographiques

- [1] Abdulmajed, K., McGuigan, C. and Heard, C.M, 2005. "Topical delivery of retinyl ascorbate: 4. Comparative anti-oxidant activity towards DPPH. Free Radic.". Res 39: pp. 491-498.
- [2] Ahmad, N., Fazal, H., Abbasi, B.H, Anwar, S. and Basir, A., 2012 "DPPH free radical scavenging activity and phenotypic difference in hepatoprotective plant (*Silybum marianum* L.). Toxicol. Ind. Health.
- [3] Ammar, R.B, Bhourri, W., Sghaier, M.B, Boubaker, J., Skandrani, I., Neffati, A., Bouhlel, I., Kilani, S., Mariotte, A.M, Chekir-Ghedira, L., Dijoux- Franca M.G.Đ and Ghedira, K. 2009

- “Antioxidant and free radical-scavenging properties of three Flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): A structure-activity relationship study”. *Food Chem* 116: pp. 258-264.
- [4] Ammar, R. B, Sghaier, M.B, Boubaker, J., Bhouiri, W., Naffeti, A., Skandrani, I., Bouhlel, I., Kilani, S., Ghedira, K. and Chekir-Ghedira, L. 2008 “Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B1-, nifuroxazide-, and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus* L.” *Chem.-Biol. Inter* 174: pp. 1-10.
- [5] Battandier, J.A, Debray, F.G, Flagey, C., Petit, P. and Trabut, L. 1988 “Flore de l'Algérie”. Ed. A. Jourdan, Alger, pp. 189-190.
- [6] Ben Ammar, R., Kilani, S., Bouhlel, I., Ezzi, L., Skandrani, I., Boubaker, J., Ben Sghaier, M., Naffeti, A., Mahmoud, A., Chekir-Ghedira, L. and Ghedira, K., 2008 “Antiproliferative, Antioxydant, and Antimutagenic Activities of Flavonoid-Enriched Extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L.: Combination with the Phytochemical Composition”. *Drug. Chem. Toxicol* 31: pp. 61-80.
- [7] Ben Ammar, R., Kilani, S., Bouhlel, I., Skandrani, I., Naffeti, A., Boubaker, J., Ben Sghaier, M., Bhouiri, W., Mahmoud, A., Chekir-Ghedira, L. and Ghedira, K. 2007 “Antibacterial and cytotoxic activities of extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L. (*Rhamnaceae*)”. *Ann. Microbiol.* 57: pp. 453-460.
- [8] Benhammou, N., Bekkara, F.A and Panovska, T.K, 2009 “Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*”. *C. R. Chimie* 12: pp. 1259-1266.
- [9] Bhouiri, W., Ben Sghaier, M., Kilani, S., Bouhlel, I., Dijoux-Franca, M.G, Ghedira, K., Chekir Ghedira, L., 2011. “Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (*Rhamnaceae*): Kaempferol 3-O-b-isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O-b- isorhamninoside”. *Food and Chemical Toxicology* 49: pp. 1167–1173.
- [10] Bruneton, J., 1999 “Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales”. 3^e Ed Technique et Documentation, Paris.
- [11] Bssaibis, F., Gmira, N. et Meziane, M., 2009. “Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* L’”. *W. Greuter. Rev. Microbiol. Ind. San. Environn.* 3: pp. 44- 55.
- [12] Celiktas, O.Y, Hames Kocabas E.E, Bedir, E., 2007. “Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., depending on location and seasonal variations”. *Food Chem* 100: pp. 553–9
- [13] Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Vidal, N., Lesgards, J.F. and Stocker, P. 2007. “Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity”. *Eur. Food Res. Technol* 224: pp. 801- 809.
- [14] Essawi, T. and Srour M., 2000. “Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity”. *J. Ethnopharm* 70: pp. 343-349.
- [15] Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou P., 2007. “Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C”. *Meat Sci Elsevier* 76: pp. 172– 81
- [16] Hayouni, E.A, Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M. 2007 “The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts”. *Food Chem* 14: pp. 249–61
- [17] Koné, W.M., Kamanzi Atindehou, K., Terreaux, C., 2004. “Traditional medicine in North Côte-d’Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity”. *J Ethnopharmacol* 93: pp.43–9
- [18] Kosalec, I., Kremer, D., Locatelli, M., Epifano, F., Genovese, S., Carlucci, G., Randić, M. and Zovko Končić M., 2013. “Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial activity of bark extracts of *Rhamnus alaternus*, *R. fallax*, *R. intermedia* and *R. pumila*”. *Food Chemistry* 136: pp. 335–341.

- [19] Lin, J.K, Weng, M.S, 2006. "Flavonoids as nutraceuticals". In: Grotwold E (Ed) "the science of flavonoids". Springer, Columbus, Ohio, pp. 213–39
- [20] Loubaki, B.C, Ouattara, A.S, Ouattara, C.A.T., 1999. "Activités antimicrobiennes des extraits aqueux totaux de *Detarium microcarpum* [Cesalpinaceae (Guil et Perr)] sur huit espèces bactériennes impliquées dans certaines maladies infectieuses au Burkina Faso". *Sci Med* 1: pp. 66–73
- [21] Mai, L.P, Gu_Ñritte, F.İ, Dumontet, V., Tri, M.V, Hill, B., Thoison, O., Gu_Ñnard, D. and S_Ñvenet T 2001. "Cytotoxicity of Rhamnosylanthraquinones and Rhamnosylanthrones from *Rhamnus nepalensis*. J". *Nat. Prod.* 64: pp. 1162- 1168.
- [22] Markham KR (1982) *Techniques of flavonoid identification*. Ed Academic Press, London. 113p.
- [23] Maurice, N., 1997. "L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle". Ed. Lavoisier, Paris, pp. 12-14.
- [24] Merghem, R., Jay, M., Viricel, M.R, 1995. " Five 8-C benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiatae)". *Phytochemistry* 38: pp. 637–40
- [25] Narayana, K.R, Reddy, M.S, Chaluvadi, M.R, Krishina, D.R, 2001. "Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential". *Indian J Pharmacol* 33: pp. 2–16
- [26] Ranga, R.R, Tiwari, A.K, Prabhakar, R.P, Suresh, B.K, Ali, A.Z, Madhusudana, K. and Madhusudana, R J., 2009. "New furanoflavanoids, intestinal alpha- glucosidase inhibitory and free-radical 64 (DPPH) scavenging, activity from antihyperglycemic root extract of *Derris indica* (Lam.)". *Bioorg. Med. Chem.* 17: pp. 5170-5175.
- [27] Senhadji, O., Faid, M., Elyachioui, M. et Dehhaoui, M., 2005. "Etude de l'activité antifongique des divers extraits de cannelle". *Journal de Mycologie Médicale.* 15: pp. 220-229.
- [28] Traoré, Y., Ouattara, K., Yéo, D., Doumbia, I. et Coulibaly, A., 2012. "Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae)". *J. Appl. Biosci.* 58: pp. 4234-4242.
- [29] Vinod, K.G, Amit, R., Vikas, K.N and Kalishankar, M., 2010. "Antimicrobial activity of *Spondias pinnata* resin". *Journal of Medicinal Plants Research* 4 (16): pp. 1656-1661.
- [30] Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W., 1999." The determination of flavonoid contents in mulberry and their scanenging effects on superoxide radicals". *Food Chem.* 64: pp. 555-559.

Publication N° 3

W. Benchiha, S. Mahroug, L. Aoued, K. Bouterfas.
Activité antihépatotoxique des extraits des feuilles de
Rhamnus alaternus L. (Rhamnaceae).
Phytothérapie DOI 10.1007/s10298-015-1012-5.
PHARMACOGNOSIE.

Les éditions Lavoisier attestent avoir accepté pour publication :

Activité antihépatotoxique des extraits de feuille de *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae)

W. Benchiha, S. Mahroug, L. Aoued, K. Bouterfas

L'article sera mis en ligne prochainement et paraîtra dans la revue *Phytothérapie, de la recherche à la pratique* à une date qui sera précisée ultérieurement aux auteurs.



Librairie



Éditions



Diffusion



Datec

Patricia Bateau

Éditions Lavoisier

14, rue de Provigny - 94236
Cachan cedex, France

www.lavoisier.fr

Tél : +33 (0) 1 47 40 67 07

Fax : 33 (0) 1 47 40 67 02

Siège social :

14 rue de Provigny

94236 Cachan cedex - France

tél. : +33 (0)1 47 40 67 00

fax : +33 (0)1 47 40 67 02

web : www.lavoisier.fr

e-mail : info@lavoisier.fr

SAS au capital de : 1.527.900 €

RCS : Gréteil 542 029 376

Siret : 542 029 376 00044

N° de TVA / VAT : FR 25542029376

Activité antihépatotoxique des extraits des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae)

Antihepatotoxic activity of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) leaves extracts

W. Benchiha · S. Mahroug · L. Aoued · K. Bouterfas

© Lavoisier SAS 2015

Résumé *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) a fait l'objet de nombreuses indications thérapeutiques en médecine traditionnelle dans la région méditerranéenne. Notre étude projette de comparer les effets anti-hépatotoxiques de deux extraits de la plante notamment deux extraits aqueux lyophilisés (décocté et macéré) ; tous administrés à différents lots de rats rendus initialement ictériques par injection de l'hépatotoxique. Le produit de référence antihépatotoxique utilisé est la silymarine (100 mg/kg). Les deux extraits (250 mg/kg) ont témoigné une action antihépatotoxique significative ($p < 0,05$) exprimée par un pourcentage de réduction des marqueurs biochimiques enzymatiques notamment les transaminases (ASAT/GOT, ALAT/GPT), la phosphatase alcaline (PAL) et la bilirubine directe (DBil). Les pourcentages moyens de réduction de l'activité antihépatotoxique ont été de : 76,28% (décocté lyophilisé), 74,16% (macéré lyophilisé), 44,68% (silymarine). Ces résultats illustrent l'action pharmacologique antihépatotoxique des deux extraits utilisés de la plante.

Mots clés Effet antihépatotoxique · *Rhamnus alaternus* L. · Extraits lyophilisé · Silymarine

Abstract *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) had been the object of number of therapeutic indications in traditional medicine in the Mediterranean area. Our study intends to compare the hepatotoxic effects of two plant extracts especially two aqueous lyophilized extracts (decocted and macerated); all administered to different batch rats initially jaundiced made by injection of the hepatotoxic. The reference

antihepatotoxic product used is the silymarine (100 mg/kg). The two extracts (250 mg/kg) had witnessed a significative antihepatotoxic action ($p < 0,05$) expressed by enzymatic biochemical markers reduction percentage, especially the transaminases (ASAT/SGOT; ALAT/SGPT), the alkaline phosphatase (ALP) and direct bilirubine (DBil). The reduction mean percentages of antihepatotoxic activity were: 76,28% (lyophilized decocted); 74,16% (lyophilized macerated); 44,68% (silymarine). These results illustrate the antihepatotoxic pharmacological action of two extracts used of this plant.

Keywords Antihepatotoxic effect · *Rhamnus alaternus* L. · Lyophilized extracts · Silymarine

Introduction

L'ictère est un syndrome qui se caractérise par une coloration jaune plus ou moins intense de la peau et des muqueuses due à l'imprégnation des tissus par un excès de la bilirubine produite. Bien que la prise en charge thérapeutique de la jaunisse par la médecine soit bonne car il existe des médicaments modernes capables de traiter efficacement la maladie, il subsiste toujours des patients qui ont recours à la médecine traditionnelle. En effet, des enquêtes ethnobotaniques et ethnopharmacognosiques ont permis d'inventorier plusieurs centaines d'espèces de plantes médicinales efficaces dans le traitement de l'ictère ou jaunisse. Parmi ces essences : *Tinospora bakis* (Menispermaceae), *Cochlospermum tinctoria/planchonii* (Cochlospermaceae), *Nauclea latifolia* Sm (Rubiaceae) ou *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae), *Silybum marianum* (Asteraceae), *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) etc. Le genre *Rhamnus* (Rhamnaceae) inclut des espèces végétales médicinales bien connues possédants diverses propriétés biologiques [1]. Les propriétés thérapeutiques de l'espèce *Rhamnus alaternus* L. ont été mises en évidence *in vitro*, elles sont dues à des composés actifs tels que les polyphénols [2]. Certains auteurs ont

W. Benchiha (✉) · S. Mahroug · K. Bouterfas
Laboratoire de biodiversité végétale : conservation et valorisation,
faculté des sciences de la nature et de la vie,
université Djillali-Liabes, BP 89, Hai Larbi Ben M'Hidi,
Sidi Bel Abbés, 22000, Algérie
e-mail : benchihawalid@gmail.com

L. Aoued
Laboratoire de synthèse de l'information environnementale,
faculté de médecine, université Djillali-Liabes,
Sidi Bel Abbés, 22000, Algérie

entrepris des études limitées sur cette plante : trois types de flavonoïdes ont été isolés à partir des feuilles de (*Rhamnus alaternus* L.) dans les travaux de [3,4] il s'agit de : Kaempferol 3O-isorhamnoside (K3O-ir) ; Rhamnocitrin 3O-isorhamnoside (R3O-ir) ; Rhamnetin 3O-isorhamnoside en évaluant l'activité antioxydante et activité génotoxique et antigénotoxique. En ce qui concerne les propriétés antimicrobiennes de *Rhamnus alaternus* L., l'activité antimicrobienne est déterminée par un extrait méthanolique obtenue à partir des écorces de la même espèce [5]. Le présent travail a donc pour objectif de comparer les effets anti-hépatotoxiques de deux extraits des feuilles de la plante *Rhamnus alaternus* L. récoltées le mois de mai au niveau des monts de Tessala (Algérie occidentale) : il s'agit du macéré aqueux lyophilisé et le décocté aqueux lyophilisé. Les extraits ont été testés sur plusieurs rats (Wistar) intoxiqués par une administration intra-péritonéale de tétrachlorure de carbone CCL_4 (0,5 ml/kg) en présence d'un témoin de référence (silymarine), de témoins intoxiqués et non intoxiqués.

Matériels et méthodes

Préparation des extraits

Dans le souci d'être en conformité avec la forme galénique traditionnelle d'utilisation de la drogue telle que préconisée par les thérapeutes traditionnelles, nous avons procédé à une décoction et macération aqueuse pour l'obtention des extraits d'étude.

Le décocté aqueux lyophilisé

Cinq cent grammes (500 g) de matière sèche (poudre de feuille) ont été mis en décoction dans un ballon contenant 2000 ml d'eau distillée ; la décoction maintenue sous reflux continu pendant deux heures. Au terme de cette opération, le décocté obtenu après refroidissement a été filtré à travers un entonnoir contenant du coton hydrophile puis centrifugé à 2500 tours/min pendant 5 minutes. Une partie aliquote du produit de centrifugation a été réservée pour servir à la caractérisation des principaux groupes chimiques tandis que l'autre moitié a été lyophilisée grâce un lyophilisateur de pailasse au bout de 72 heures à l'issue desquelles le décocté lyophilisé a été récupéré puis pesé en vue d'en déterminer le rendement.

Le macéré aqueux lyophilisé

Il a été obtenu dans les mêmes conditions que le lyophilisat du décocté à la seule différence qu'ici l'on a procédé à une

macération (extraction à froid) sans aucune opération de chauffage de la prise d'essai (500 g).

Le matériel biologique

Le matériel biologique est, quant à lui, constitué de rat espèce : *Rattus norvegicus*, souche : Wistar, sexe : femelles, pesant entre 180 et 230 g, provenant de l'institut Pasteur d'Alger où ils ont été achetés. Avant les essais pharmacologiques proprement dits, ils sont gardés dans des cages métalliques au niveau de l'animalerie de la faculté dans une ambiance d'air conditionné (25-28°C). Ils sont nourris au granulé (aliment pour bétail) avec accès libre à l'eau. Ils bénéficient en outre des conditions de veille/sommeil (12h/12h). Les animaux sont sélectionnés puis répartis par lots de 6, seront pesés peu avant le début des essais pharmacologiques.

Test antihépatotoxique

Vu la grande diversité des protocoles d'études constatées dans les publications internationales [6] en ce qui concerne la détermination des propriétés hépato-protectrices des drogues végétales, nous avons privilégié la démarche méthodologique de [7] après adaptation aux conditions de travail du laboratoire où nous allons effectuer les différents essais. Pour ce faire, les animaux sont répartis en 6 groupes de 6.

Le groupe I (témoin normal) reçoit une administration quotidienne du véhicule c'est-à-dire une solution aqueuse à 1% p/v de gomme arabique (1 ml/kg) et ce pendant 9 jours. Le groupe II (témoin normal intoxiqué) se voit administrer également chaque jour la solution aqueuse de gomme arabique à 1% (p/v) par voie orale durant tout le temps de l'expérience. Les rats du groupe III reçoivent par gavage le produit de référence, la silymarine (100 mg/kg). Les rats des groupes tests eux aussi se voient administrer une fois par jour durant le temps que durent les essais respectivement, le décocté aqueux lyophilisé (groupe IV), le macéré aqueux lyophilisé (groupe V) administré à la même dose de 250 mg/ml. Au septième jour, tous les rats des différents groupes à l'exception de ceux du groupe I (témoin normal) ont reçu le tétrachlorure de carbone CCL_4 (0,5 ml/kg). Au dixième jour de l'épreuve, tous les rats ont été sacrifiés après anesthésie à l'éther. Le sang prélevé par ponction cardiaque est destiné à l'estimation des marqueurs biochimiques de l'intoxication hépatique notamment les transaminases (ALAT/GPT ; ASAT/GOT), la phosphatase alcalines (ALP) et la bilirubine directe (DBil).

Résultats

Les rendements d'extraction obtenus en termes d'extrait sec lyophilisé ont été respectivement de 11,88% (décocté

aqueux), 6,57% (macéré aqueux), plus importants à ceux trouvés par [8-10] sur les différents extraits de la drogue (organique, alcoolique et aqueux).

Essais pharmacologiques anti-hépatotoxiques

L'administration de tétrachlorure CCL_4 (0,5 ml/kg) provoque une montée significative ($p < 0,01$) des marqueurs sériques enzymatiques en particulier les transaminases (GOT/AST et GPT/ALT) et la phosphatase alcaline (ALP). De même on observe une augmentation significative de la bilirubine directe (DBil). Ce phénomène est surtout observé avec les rats du groupe témoin intoxiqué (groupe II) en comparaison avec les rats du groupe témoin normal (groupe I) comme indiqué dans le tableau 1.

Les extraits aqueux lyophilisés (décocté et macéré) administrés à la même dose (250 mg/ml) entraînent une baisse significative du taux des enzymes sériques de la bilirubine directe (DBil) comparativement aux animaux du groupe contrôle intoxiqué (groupe II). Du point de vue de l'activité pharmacologique, la régression des paramètres biologiques (transaminases, phosphatases alcaline et bilirubine directe) constatée dans les groupes tests notamment les groupes IV, V intoxiqués et traités est un signe qui se manifeste de la capacité de ces extraits à réduire l'hépatotoxicité provoquée par l'administration du toxique organochloré (CCL_4 , 0,5 ml/kg). Ce pouvoir réducteur intrinsèque des extraits étudiés vis-à-vis de l'intoxication provoquée est exprimé en pourcentage de réduction de l'hépatotoxique. Le tableau 1 résume les effets anti-hépatotoxiques des extraits de la drogue sur les différents paramètres biochimiques impliqués dans l'hépatointoxication.

Effets anti-hépatotoxiques comparatifs

Le pourcentage de réduction du toxique par l'extrait de drogue est un critère d'appréciation de l'effet antihépatotoxique

de ces derniers (extraits). Le pourcentage moyen de réduction obtenu à partir des résultats du tableau 1 permet de classer les extraits étudiés selon leur degré d'efficacité antihépatotoxique pour les 4 paramètres biochimiques déterminés (Tableau 2).

Pour la mise en évidence de l'effet des extraits testés (groupe : III, IV, V) sur les paramètres biochimiques du test antihépatotoxique, des analyses de la variance à deux critères de classification sont réalisées au seuil de 5%. Nous considérons que la différence est non significative ($P > 0,05$), significative ($P \leq 0,05$). Ces analyses sont exécutées par logiciel XLSTAT 2015 en utilisant le test de Tukey pour les comparaisons deux à deux indiquées dans le tableau 3.

Discussion

L'ictère provoqué expérimentalement chez les rats (Wistar) dans le cas de la présente étude est une conséquence de la toxicité du tétrachlorure de carbone CCL_4 , un toxique organochloré à tropisme essentiellement hépatique et agent potentiel cité par plusieurs chercheurs [11,12]. En outre, les

Tableau 2 Comparaison des effets antihépatotoxiques des extraits étudiés au regard du pourcentage moyen de réduction de l'hépatotoxique (CCL_4 ; 0,5 ml/kg).

Extraits testés	Doses (mg/kg)	Pourcentage moyen de réduction/ensemble des 4 paramètres biochimiques
Silymarine	100	44,68%
Décocté lyophilisé	250	76,28%
Macéré lyophilisé	250	74,16%

Tableau 1 Effet des extraits lyophilisés des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) sur les paramètres biochimiques enzymatiques des groupes contrôle normal, contrôle intoxiqué et des groupes tests (intoxiqués et traités).

Traitements	Doses (mg/kg)	SGOT (UI/L)	GPT (UI/L)	ALP (UI/L)	DBil (mg/dL)
Groupe I	-	403 ± 7,07	497 ± 4,24	65 ± 1,41	0
Groupe II	-	1004,5 ± 4,95	628 ± 1,41	121 ± 8,48	1,33 ± 2,30
Groupe III	100	797 ± 2,82 (34,49%)	552,5 ± 6,36 (57,63%)	97 ± 1,41 (42,85%)	0,75 ± 0,95 (43,75%)
Groupe IV	250	536 ± 4,24 (43,39%)	512 ± 5,65 (88,54%)	80 ± 7,07 (73,21%)	0 (100%)
Groupe V	250	745,5 ± 6,36 (43,06 %)	518 ± 2,82 (83,97%)	82 ± 1,41 (69,64%)	0 (100%)

Chaque valeur est une moyenne et son écart-type (N=6) ; valeur déterminée après 3 essais successifs.

changements associés à des lésions hépatiques induites par CCl_4 sont similaires à celui de l'hépatite virale aiguë [13].

Son mécanisme d'action physiopathologique décrit par plusieurs auteurs, entre autres [14-16], permet de mieux appréhender les dommages hépatiques dont il est responsable. En effet, la métabolisation hépatique du tétrachlorure de carbone (CCL_4) commence par sa transformation en ses métabolites primaires (Trichlométhyl et Trichlométhylperoxyde) grâce à cytochrome P_{450} oxydase hépatique, principal système enzymatique responsable des réactions d'oxydoréduction des xénobiotiques au niveau du foie. Le trichlorométhylperoxyde est un radical libre hautement réactif qui va initier une lipoperoxydation autrement dite oxydation des acides gras polyinsaturés des phosphomembranes lipidiques des hépatocytes.

Une conséquence de cette activité radicalaire est la désagrégation des membranes des hépatocytes dont les enzymes intra-cytoplasmiques entre autres, les transaminases (ASAT/GOT et ALT/GPT) et la phosphatase alcaline (ALP), vont se déverser dans le milieu extracellulaire (plasma sanguin) en cas de cellules endommagées [17,18], toute chose entraînant une élévation significative des marqueurs sériques enzymatiques et de la bilirubine directe constatée avec les rats du groupe intoxiqué [19]. Selon [20], la lésion hépatique peut être attribuée à l'endommagement de l'intégrité structurale du foie, parce que ces enzymes ont une localisation cytoplasmique et libérées dans la circulation après dommages cellulaires, indiquant le développement de l'hépatotoxicité.

La silymarine inhibe le cytochrome P450 hépatique oxydase (cytochrome P450), la principale enzyme responsable de l'activation du tétrachlorure de carbone (CCl_4) et sa transformation en ses métabolites, notamment radical trichlorométhyle qui conduit à trichlorométhyle peroxyde, des radicaux libres. Ce radical libre (trichlorométhyl peroxyde) dérivé joue un grand rôle dans la peroxydation des lipides conduisant à des dommages au foie. *Silybum marianum* et la silymarine agissent mieux en préventif et sont dépourvus d'effet thérapeutique en traitements aigus [6].

Les résultats de notre étude ont révélé une augmentation significative des activités sériques de GOT, GPT, ALP et les niveaux de bilirubine sur l'exposition à CCl_4 , indiquant des dommages considérables hépatocellulaires, l'augmentation

des niveaux des marqueurs sériques GOT, GPT, ALP et de la bilirubine directe (DBil) libérée par le foie dans le sang [21,22] sont les signes qui montraient des lésions hépatiques importantes dans le groupe des rats intoxiqués (groupe II), comme indiqué dans le tableau 1.

L'administration des extraits végétaux (lyophilisats) aux rats des groupes tests provoque un processus de restauration des marqueurs biochimiques vers une évolution à la normale comme celle du traitement à la silymarine. Ceci illustre la capacité des extraits à assurer une protection de l'intégrité des membranes des hépatocytes contre l'intoxication organochloré (CCL_4) ; laquelle intoxication est jugée responsable de la fuite des substrats enzymatiques intra-cytoplasmiques des hépatocytes vers le milieu extérieur (plasma).

Sur le plan comparatif, les résultats du présent travail corroborent ceux obtenus par [8,9] qui avait permis de mettre en évidence une activité antihépatotoxique globale du décocté et du macéré aqueux lyophilisés de feuilles d'*Argemone mexicana* L. (Papaveraceae).

Le mécanisme d'action de l'effet anti-hépatotoxiques présenté par les feuilles d'*Argemone mexicana* L., il peut être attribué à des éléments phytochimique mis en évidence dans les extraits de suspension en poudre. En effet, selon [23] protopine, l'un des alcaloïdes isoquinoleic d'*A. mexicana* exerce une action inhibitrice sur la formation de peroxydes lipidiques. Et on sait que la peroxydation des lipides est l'une des étapes importantes du CCl_4 métabolisation conduisant à la dégradation des membranes des cellules hépatocytes. L'action exercée par protopine (alcaloïde isoquinoleic de *A. mexicana*) est similaire à celle de la silymarine, considérée comme l'un des inhibiteurs du cytochrome P450 [14]. Le rôle inhibiteur de la silymarine a été effectivement confirmé par [24] concernant le métabolisme du tétrachlorure de carbone (CCl_4).

Par contre nos résultats concernant le pourcentage de réduction des extraits de notre espèce étudiée (*Rhamnus alaternus* L.) sont plus importants à ceux enregistrés pour les extraits méthanoliques aux différentes concentrations (150, 300, 500 mg/kg) pour l'espèce *Justicia gendarussa* Borm [25] ainsi que extrait éthanolique des feuilles et des écorces de l'espèce *Narina crenulata* (Roxb) Nicolson aux concentrations (250, 500 mg/kg) [14].

Tableau 3 Comparaison des différents groupes (normal, normale intoxiqué, groupe test) avec les différents paramètres biochimiques (TGP/TGO, ALP, DBil) en utilisant le test de Tukey.

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	P > F
Groupe	4	184 415,350	46 103,837	2 305,192	<0,0001
Paramètre	3	3 459 727,30	115 3242,433	57 662,122	<0,0001
Groupe*Paramètre	12	279 688,450	23 307,371	1 165,369	<0,0001

Le mécanisme de l'effet anti-ictère peut également être dû à certains phytoconstituants tels que les sucres et les glycosides présents. Ces composants selon [26,27] dérivés de polysaccharides que certains d'entre eux ont été bien documentés dans la littérature au sujet de leur propriétés anti-hépatotoxiques. En outre, la capacité d'un médicament hépatoprotecteur afin de réduire les effets dommageables ou de préserver le mécanisme physiologique hépatique normale, qui ont été perturbés par un hépatotoxine (CCl₄ ; 0,5 ml/kg), est l'indice de l'effet de protection selon [28].

Conclusion

Les affections hépatiques par leur fréquence et leur impact sur la santé publique méritent une prise en charge de qualité.

Notre travail nous a permis de confirmer l'innocuité des extraits aqueux de la plante, d'apporter une preuve biologique mesurable de l'activité hépatoprotectrice des décoctés et des macérés des feuilles de *Rhamnus alaternus* L. suite à une perturbation dans les paramètres biochimiques sériques et hépatiques analysés, intoxiqués par le produit xénobiotique CCl₄.

Le résultat enregistré au cours du présent travail apporte une confirmation de l'existence d'un effet anti-hépatotoxique de l'espèce *Rhamnus alaternus* L. qui a permis encore une fois de montrer le potentiel de ces composés du métabolisme secondaire des végétaux qui sont dotés d'un pouvoir régénératif et curatif.

Nous espérons, avec nos résultats, avoir participé à la valorisation de la médecine traditionnelle pour parvenir à la disponibilité des médicaments à base de plantes médicinales locales, efficaces et accessibles pour le traitement des affections hépatiques.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts

Références

- Mai LP, Gu Ñritte FĪ, Dumontet V, et al (2001) Cytotoxicity of Rhamnosylanthraquinones and Rhamnosylanthrones from *Rhamnus nepalensis*. J Nat Prod 64: 1162–8
- Ammar RB, Sghaier MB, Boubaker J, et al (2008). Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B1-, nifuroxazide-, and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus* L. Chem Biol Inter 174:1–10
- Bhourri W, Ben Sghaier M, Kilani S, et al (2011) Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): Kaempferol 3-O-b-isorhamnoside and rhamnocitrin 3-O-b-isorhamnoside. Food Chem Toxicol 49: 1167–73
- Ammar RB, Bhourri W, Sghaier MB, et al (2009) Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. Food Chem 116: 258–64
- Kosalec I, Kremer D, Locatelli M, et al (2013) Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial activity of bark extracts of *Rhamnus alaternus*, *R. fallax*, *R. intermedia* and *R. pumila*. Food Chem 136: 335–41
- Fleurentin J, Lexa A, Younos C (1990) Study of anti-hepatotoxicity of *Eupatorium cannabinum* L. in mice: an adequate method for screening in vivo antihepatotoxic natural principes. Phytother Res 4:145–51
- Rao KS, Mishra SH (1997) Hepatoprotective activity of *Inula racemosa* root. Fitoterapia 68:510–4
- Sourabié TS, Nikiéma JB, Nacoulma OG, et al (2006) Etude préliminaire du pouvoir antihépatotoxique d'une plante de la pharmacopée burkinabé préconisé dans le traitement traditionnel de la jaunisse : cas d'*Argemone mexicana* L. (Papaveraceae). J Soc Path Exot 2-3 Novembre, Ouagadougou
- Sourabié TS, Nikiéma JB, Nacoulma OG, et al (2012) Etude comparée des effets antihépatotoxiques d'extraits d'*Argemone mexicana* L. (Papaveraceae) une plante utilisés dans le traitement traditionnel de la jaunisse au Burkina Faso. Int Biol Chem Sci 6: 1139–47
- Lega I (2010) Evaluation des propriétés antibactériennes in vitro d'extraits de feuilles d'*Argemone mexicana* L. (Papaveraceae) Thèse de doctorat en pharmacie, UFR/SDS, Université de Ouagadougou, p. 62
- Shah PA, Parmar MY, Thakkar VT, et al (2010) Protective effect of *Hordeum vulgare* Linn. on acetaminophen-induced Liver Damage. J Young Pharm 1:336–40
- Sanmugapriya E, Venkataraman S (2006) Studies on hepatoprotective and antioxidant actions of *Strychnos potatorum* Linn. seeds on CCl₄-induced acute hepatic injury in experimental rats. J Ethnopharmacol 105:154–60
- Suja SR, Latha PG, Pushpangadan P, et al (2004) Evaluation of hepatoprotective effects of *Helminthostachys zeylanica* (L) Hook against carbon tetrachloride induced liver damage in Wistar rats. J Ethnopharmacol 92: 61–6
- Sarada K, Jothibai Margret R, Mohan VR (2012) Hepatoprotective and Antioxidant Activity of Ethanol Extracts of *Naringi crenulata* (ROXB) NICOLSON against CCl₄ induced hepatotoxicity in rats. IJPSR 3:874–80
- Petet AA, Casimir IO (2010) Hepatoprotective effect of the solvent fractions of the stem of *Hoslundia opposita* Vahl (Lamiaceae) against carbon tetrachloride and paracetamol induced liver damage in rats. Int J Green Pharm 4: 54–8
- Letteron P, Labbe G, Degott C, et al (1990) Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice. Evidence that silymarin acts both as an inhibitor of metabolic activation and as a chainbreaking antioxidant. Biochem Pharmacol 39:2027–34
- Singh B, Saxena AK, Chandan BK, et al (1998) Hepatoprotective activity of verbenalin on experimental liver damage in rodents. Fitoterapia 69: 134–40
- Ozturk IC, Ozturk F, Gul M, et al (2009) Protective effects of ascorbic acid on hepatotoxicity and oxidative stress caused by carbon tetrachloride in the liver of Wistar rats. Cell Biochem Function 27:309–15
- Elberry AA, Fathalla M, Harraz A, et al (2010) Antihepatotoxic effect of *Marrubium vulgare* and *Withania somnifera* extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. J Basic Clin Pharm 1:247–54
- Sallie R, Tredger JM, William R (1991) Drugs and the liver. Part I. "Testing liver function". Biopharm Drug Disp 12:251–59
- Ashok Shenoy K, Somayaji SN, Bairy KL (2001) Hepatoprotective effect of *Ginkgo biloba* against carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. Ind J Pharmacol 33: 260–6

22. Achliya GS, Wadodkar SG, Dorle AK (2004) Evaluation of hepatoprotective effect of *Amalkadi Ghrita* against carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. *J Ethnopharmacol* 90: 229–32
23. Rathi A, Srivastava AK, Shirwaikar A, et al (2008) Hepatoprotective potential of *Fumaria indica* Pugsley whole plant extracts fractions and an isolated alkaloid protopine. *Phytomedicine* 15:470–7
24. Letteron P, Labbe G, Degott C, et al (1990) Mechanism for the protective effects of Silymarin against carbon tetrachloride induced lipid and hepatotoxicity in mice. Evidence that Silymarin acts both as an inhibitor of metabolic activation and as a chain-breaking antioxidant. *Biochem Pharmacol* 39:2027–34
25. Krishna KL, Mruthunjaya K, Patel JA (2009) Antioxidant and hepatoprotective activity of leaf extract of *Justicia gendarussa* Burm. *Internat J Biol Chem* 3:99–110
26. Chiu HF, Lin CC, Yen SMH, et al. (1992) Pharmacological and studies on hepatic protective crude drugs from Taiwan (V): the effects of *Bombax malabarica* and *Scutellaria rivularis*. *Am J Chin Med* 20:257–64
27. Ye YN, Liu ES, Li Y, et al (2001) Protective effect of polysaccharides-enriched fraction from *Angelica sinensis* on hepatic injury. *Life Sci* 69: 637–46
28. Yudav NP, Dixit VK (2003) Hepatoprotective activity of leaves of *Kalanchoe pinnata* Pers. *J Ethnopharmacol* 86:197–202