



Université Mohamed Khider de Biskra  
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie  
Département des sciences de la nature et de la vie

# MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie  
Filière : Sciences biologiques  
Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. : .....

---

Présenté et soutenu par :  
**Salima MORGHAD**

Le : mercredi 10 juillet 2019

## Thème

### **Contribution à l'étude des activités biologiques de l'extrait aqueux et méthanolique des feuilles de *Cassia angustifolia* Vahl.**

---

#### Jury :

Mme. Asma BOUCIF	MAA	Université de Biskra	Président
M. Abdelouahab DEHIMAT	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme. Mouna GUEROUI	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2018 - 2019

## **Remerciements**

*Avant toutes choses, je remercie Dieu, le Tout Puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.*

*J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive connaissance à Mr*

*DEHIMAT Abdelouahab, pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il m'a accordés m'ont permis de réaliser ce travail.*

*J'adresse mes sincères remerciements à BOUCIF. A d'avoir accepté de présider le jury. Je tiens également mes vifs remerciements à GUEROUI. M pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.*

*Aux personnels du laboratoire du département de biologie El Hadjeb pour leur aide, en particulier ma sœur Alima*

*Je remercie les professeurs du Département de Biologie (El Hadjeb)*

*En particulier Mme BENGUERAICHI. F et Mr BENBELAID. F*

## Dédicace

*À la bougie qui est la source de la lumière de ma vie, qui se fond toujours pour éclairer ma route, à mon cher père je dédie ce travail et je lui souhaite une longue belle vie*

*À la fleur qui rehausse et aromatise mes jours, qui garde les nuits pour que je me rendorme, à ma très chère mère je dédie ce travail et je lui souhaite une longue belle vie*

*À mes frères et sœurs*

*A ma belle-sœur et ses enfants : Arwa et Khalil*

*A mes cousins et cousines*

*A mes chères amies : Roumila, Ibtissam, Aicha, Alia, Alima, Amani B, Amani R, Farida, Romaisa , Meriem, Nabila, Rania, Safa, Safia*

*A mes ami(e)s et camarades*

*A tous les membres de ma famille*

# Sommaire

Liste des tableaux .....	I
Liste des figures .....	II
Liste des abréviations .....	III
Introduction .....	1

## Etude bibliographique

### Chapitre 1 Généralité sur la plante

1.1. Famille.....	3
1.2. Description botanique .....	3
1.3. Classification .....	4
1.4. Nom vernaculaire et synonymes .....	4
1.5. Distribution géographique .....	4
1.6. Usages traditionnelle .....	4
1.7. Constituants chimiques .....	5

### Chapitre 2 métabolites secondaires

2.1. Généralité .....	6
2.2. Les composés phénoliques .....	6
2.2.1. Les flavonoïdes .....	6
2.2.2. Les tanins .....	6
2.3. Les alcaloïdes .....	7
2.4. Les anthraquinones .....	7

### Chapitre 3 Les activités biologiques

3. 1. Antimicrobienne .....	8
3.1.1. Les infections microbiennes.....	8
3.1.2. Les antibiotiques.....	8
3.1.3. Les antimicrobiens d'origine végétale.....	8
3.2. Antioxydants.....	8

3.2.1. Le stress oxydant .....	8
3.2.2. Radicaux libres .....	9
3.2.3. Antioxydants .....	9
3.3. Anti- inflammatoire.....	9
3.3.1. L'inflammation.....	9
3.3.2. Anti-inflammatoires d'origine végétale .....	9

## **Partie expérimentale**

### **Chapitre 4 Matériel et méthodes**

4.1. Matériel .....	10
4.1.1. Réactif et appareillages.....	10
4.1.2. Matériel biologique.....	10
4.2. Méthodes .....	11
4.2.1. Préparation des extraits.....	11
4.2.2. Profil chimique .....	12
4.2.3. Etude l'activité antimicrobienne des différents extraits.....	13
4.2.4. Détermination de la capacité antioxydant totale (TAC) .....	14
4.2.5. Etude de l'activité dénaturation des bovine serum albumin (BSA).....	15

### **Chapitre 5 Résultats et discussion**

5.1. Rendement .....	16
5.2. Dosage des métabolites secondaire .....	16
5.2.1. Dosage des polyphénols totaux .....	16
5.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	17
5.3. Activité antimicrobienne .....	18
5.4. Capacité antioxydant totale TAC.....	20
5.5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> .....	22
5.4.1. Dénaturation thermique de BSA.....	22
Conclusion.....	24
Référence bibliographique.....	26

Annexes

## Liste des tableaux

Tableau 1. Différent souches microbiennes utilisées dans le test antimicrobien. ....	11
Tableau 2. Résultats pourcentages, couleurs et aspect des extraits de <i>C.angustifolia</i> . ....	16
Tableau 3. Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits de <i>C. angustifolia</i> .....	19

## Liste des figures

Figure 1. <i>Cassia angustifolia</i> Vahl (Peter <i>et al.</i> , 2012).....	3
Figure 2. Structure chimique de base des flavonoïdes (Heller et Forkmann, 1993). ....	6
Figure 3. Structure des tanins (Guignard, 1996).....	7
Figure 4. Formule générale des anthraquinones (Hans et Kothe, 2007). ....	7
Figure 5. Les feuilles et poudre de <i>C.angustifolia</i> (Balasankar <i>et al.</i> , 2013). ....	10
Figure 6. Teneur des extraits de <i>C.angustifolia</i> en polyphénols totaux. ....	17
Figure 7. La teneur des extraits de <i>C.angustifolia</i> en flavonoïdes totaux.....	18
Figure 8. Capacité antioxydant totale des extraits de <i>C. angustifolia</i> à différentes concentrations.....	21
Figure 9. Capacité antioxydant totale du standard (Acide ascorbique) à différentes concentrations....	22
Figure 10. Effet des extraits de <i>C.angustifolia</i> et diclofénac sur la dénaturation de BSA. ....	22

## Liste des abréviations

- Abs** : Absorbance
- AGE** : Equivalent d'acide gallique
- AMP** : Ampicilline
- ATB**: Antibiotique
- ATCC**: American type culture collection
- AUG**: Amoxicilline + Ac. Clavulanique
- BSA**: Bovine serum albumin
- C. albicans***: *Candida albicans*
- C. angustifolia***: *Cassia angustifolia*
- DMSO**: Diméthylsulfoxyde
- E .Aq** : Extrait aqueux
- E. coli*** : *Escherichia coli*
- E .Méth** : Extrait méthanolique
- E. faecalis*** : *Entérocoques faecalis*
- ERO** : Espèces Réactives de l'Oxygène
- L. monocytogenes*** : *Listeria monocytogenes*
- MET** : Métronidazole
- MH**: Mueller Hinton
- OMS** : l'organisation mondiale de la santé
- P. Aeruginosa*** : *Pseudomonas aeruginosa*
- P0** : poids de la poudre avant l'extraction.
- P1** : poids de l'extrait sec après l'extraction.
- PDA**: Pomme de terre dextrose agar
- QE** : Equivalent de quercétine
- S. Aureus*** : *Staphylococcus aureus*

**TAC** : Capacité antioxydant totale

**VIH** : virus l'immunodéficience humaines

# **Introduction**

## Introduction

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité comme remèdes pour le traitement de diverses maladies parce qu'elles contiennent des composants riches en principes thérapeutiques (Khaldi *et al.*, 2012). Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) près de 80% de populations dépendent de la médecine traditionnelle. La plupart des plantes sont utilisées empiriquement et sans validation scientifique de leur efficacité et sécurité (Moutinho, 2013).

Actuellement et malgré le progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent surtout dans les pays en voie de développement. En effet, parmi environ 500.000 espèces de plantes, 80.000 possèdent des propriétés médicinales (Bouden, 2018).

Les infections humaines causées par des champignons et des bactéries sont augmentées considérablement dans les dernières années (Fiori *et al.*, 2013). Des études *in vitro* et épidémiologiques suggèrent que la consommation des aliments riches en composés phénoliques pourrait diminuer de manière significative le risque de certains problèmes de santé en raison de leurs propriétés antioxydantes et propriétés antibactériennes (Alves *et al.*, 2013).

Cependant, les maladies à l'origine du stress oxydatif sont dues généralement suite à la production excessive des espèces réactive d'oxygène (ERO) et les espèces réactive d'azote (ERN) qui pourraient devenir toxiques pour les composants majeurs de la cellule ; les lipides, les protéines et les acides nucléiques (Valko *et al.*, 2006). Ceci provoquerait un dysfonctionnement cellulaire et serait impliqué dans diverses pathologies telles que les cardiovasculaires, le cancer, le diabète, les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson) et le processus de vieillissement (Aruoma, 2003).

D'autre part, l'inflammation est un processus physiologique complexe de défense utilisée par l'organisme, après une agression étrangère, vasculaire et tissulaire, vis à éliminer ou isolé l'agresseur et maintenir l'intégrité des tissus infectés. L'inflammation est un état morbide caractérisé par les signes cardinaux suivants : chaleur, douleur, rougeur et tuméfaction de la partie malade (Sarkhel, 2015).

*Cassia angustifolia* Vahl (connue sous le nom de Tinnevely senna, ou senna), une plante de la famille des fabaceas, est traditionnellement utilisée comme laxatif. Il est recommandé pour le traitement à court terme (1 à 2 semaines) de la constipation aiguë et pour le nettoyage de l'intestin avant une endoscopie diagnostique (Vitalone *et al.*, 2011).

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est l'évaluation de l'activité antimicrobienne, antioxydant et anti-inflammatoire, de quelques extraits de la plante *C. angustifolia* afin de déterminer la teneur en métabolites secondaires.

Notre travail est structuré comme suivant :

Partie bibliographique qui contient trois chapitres (généralités sur la plante ; métabolite secondaire et les activités biologiques).

Partie expérimentale qui contient la méthode de travailles et résultat et discussion.

# **Etude bibliographique**

**Chapitre 1**  
**Généralités sur *Cassia***  
***angustifolia***

### 1.1. Famille

Les légumineuses constituent la troisième super famille par ordre d'importance chez les angiospermes, constituent un des groupes de végétaux supérieurs les plus abondant et les plus diversifié (Allen et Allen, 1981 ; Broughton, 1984). Cette famille possède 674 genres et plus de 18000 espèces (Polhill *et al.*, 1981).

Les Caesalpinioideae ont habituellement des fleurs comme des papillons et à étamines unies. Comprenant environ 150 genres et 2200 espèces, sont principalement des arbres ou arbustes retrouvés en régions tropicales et subtropicales. 23 % seulement des espèces parmi celles examinées, sont 18000 espèces (Polhill *et al.*, 1981).connues pour être nodulées par les rhizobia (Sebihi, 2008).

### 1.2. Description botanique

*Cassia angustifolia* appartient à la famille de Caesalpinioideae (Fabaceae). Arbuste bas, atteignant 1,5 m de haut, tige et branches dressées pâles, à feuilles composées paripinadas, lanceoladas ovales, de 2,5 et 6 cm de long sur 8 mm de large, ayant 3-7 paires de feuilles, étroites ou arrondi, vert pâle à vert jaunâtre. Cassia a des fleurs jaune vif de forme caractéristique. La fleur typique consiste en cinq sépales semblables et des pétales (fig. 1) (Shazia *et al.*, 2012).



**Figure 1.** *Cassia angustifolia* Vahl (Peter *et al.*, 2012).

### 1.3. Classification

D'après Kistamma et Venkateshwar (2018), *Cassia angustifolia*(*C.angustifolia*) est une espèce qui appartient à :

Nom botanique : *Cassia angustifolia*

Embranchement : Plantae

Sous embranchement : Tracheobionata

Division : Magnoliophyta

Classe : Mabnoliopsida

Sous-classe : Rosidae

Ordre : Fabales

Famille : Caesalpinaceae

Genre : *Cassia*

Espèce : *Cassia angustifolia* Vhal

### 1.4. Nom vernaculaire et synonymes

La plante est connue sous le nom "Senna, Sana, Sanna Makki", par contre elle est commercialisée sous les noms: Senna, Sanna Makki Son nom en anglais est *Tinnevelly Senna* et/ou *Indian Senna* (Shazia *et al.*, 2012).

### 1.5. Distribution géographique

*Cassia angustifolia* est originaire d'Arabie (Evans, 1992). Plante indigène d'Afrique tropicale. Il pousse beaucoup près du Nil, d'Assouan au Kordofan, en passant par la péninsule arabique, l'Inde, le Pendjab et la Somalie. Il est cultivé en Inde, en particulier sur les territoires de Madura, à Mysore et à Tinnevely, ainsi qu'au Pakistan et au Soudan (Alonso, 2004).

### 1.6. Usages traductionnelle

*Cassia angustifolia* est un puissant cathartique utilisé dans le traitement de la constipation, agissant par le biais d'une stimulation du péristaltisme intestinal. A égale *C. angustifolia* ment été utilisé comme expectorant, pansement, anti dysentérique et carminatif. Elle est utile dans le traitement de la gonorrhée, des maladies de la peau, de la dyspepsie, des fièvres et des hémorroïdes. La plante est utilisée sous forme de matière végétale brute ou en poudre sous forme d'infusion orale ou d'extraits (liquides ou solides). Il est toujours conseillé d'utiliser le médicament sous la supervision du médecin, car l'utilisation excessive de

*C.angustifolia* peut avoir des effets indésirables conduisant à des douleurs à l'estomac soudaines et intenses et à des coliques ou douleurs abdominales (Jnanesha, 2018).

### **1.7. Constituants chimiques**

Les principaux composants actifs du *C.angustifolia* sont les glycosides dimériques appelés Sennosides A, B, C et D. Les aglycones sont composés d'aloès-émodyne + rhéine pour A et B et de rhéine + rhéine pour C et D. Autres phytochimiques sennoside C, sennoside D rhéine, chrysophanol, aloès émodyne, kaempférol, alcool myricylique, acide salicylique, acide palmitique, acide stéarique, isorhamnétine, barbaloin, kaempférol, acide cathare, dérivés d'anthraquinone(Jnanesha,2018).

# **Chapitre 2**

## **Métabolites secondaires**

## 2.1. Généralité

Les métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures. Les métabolites secondaires constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour leurs propriétés antioxydants, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anti carcinogènes ou mutagènes (Epifano *et al.*, 2007). Ce sont des composés très hétérogènes tant par leur composition que par leur structure (Muanda, 2010).

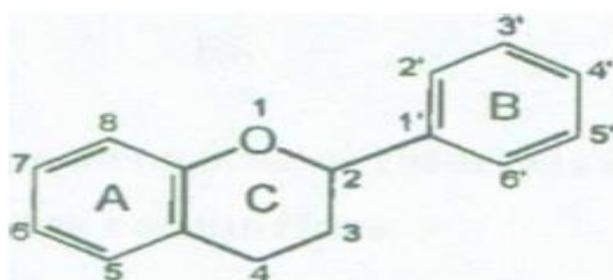
On trouve des métabolites secondaires dans toutes les parties de la plante, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à l'autre. Parmi les principales familles de métabolites secondaires trouvées chez les plantes on distingue (Muanda, 2010).

## 2.2. Les composés phénoliques

Parmi ces composés, on citera les polyphénols, les lignines, les stilbènes, les flavonoïdes, les phénylpropanoïdes, les anthocyanes et les tannins (Muanda, 2010).

### 2.2.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolite secondaire largement répandus dans le règne végétal (Fig. 2) (Addy et Schwartzman, 1995). Leur fonction principale semble être la coloration des plantes (au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bétalaïnes), même si leur présence est parfois masquée par leur présence sous forme "leuco", ce qui explique leur intérêt commercial dans l'industrie alimentaire (Gàbor *et al.*, 1988).

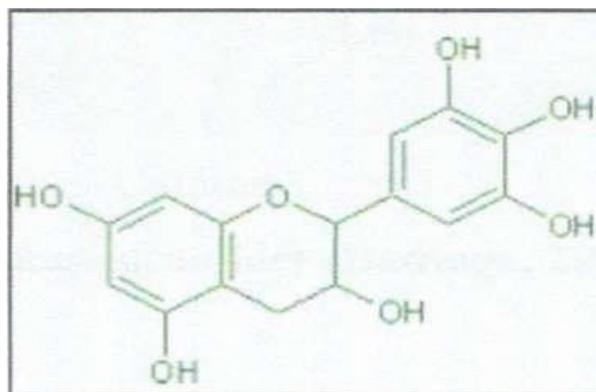


**Figure 2.** Structure chimique de base des flavonoïdes (Heller et Forkmann, 1993).

### 2.2.2. Les tanins

Les tanins sont des formes phénoliques condensées (Fig. 3), ayant un poids moléculaire allant de 500 à 3000 daltons. Dans la nature les tanins se trouvent dans le monde entier dans de nombreuses familles de différentes plantes supérieures telles que le châtaignier et le bois de chêne (Paolini *et al.*, 2003). Ils sont solubles dans l'eau (Akiyama *et al.*, 2001). Selon la nature

des assemblages moléculaires, les tanins sont classés en 2 groupes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Sereme *et al.*, 2010).



**Figure 3.** Structure des tanins (Guignard, 1996).

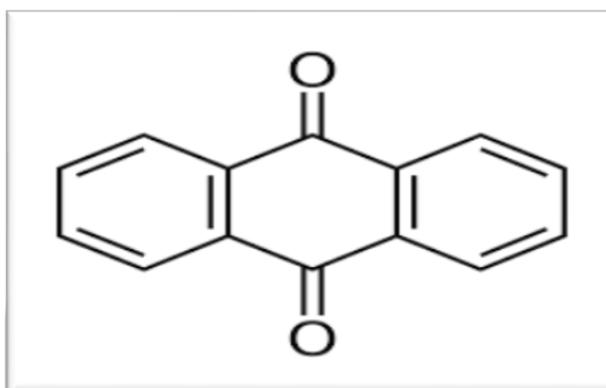
### 2.3. Les alcaloïdes

Formant un groupe très large, les alcaloïdes possèdent un atome d'azote qui les rend pharmaceutiquement très actif. Il est parfois difficile de situer les frontières qui séparent les alcaloïdes des autres métabolites azotés naturels (Iserin, 2001).

Ils existent à l'état de sel et constituent avec les hétérosides, la majorité des principes actifs des plantes médicinales (Brunton, 1999).

### 2.4. Les anthraquinones

Sont des composés aromatiques (fig. 4) qui provoquent des contractions des parois du gros intestin et ont ainsi une action extrêmement laxative. *C.angustifolia* et la rhubarbe d'ornement (*Rheum palmatum*) contiennent par exemple de l'anthraquinone (Hans et Kothe, 2010).



**Figure 4.** Formule générale des anthraquinones (Hans et Kothe, 2007).

# **Chapitre 3**

## **Activités biologiques**

### **3. 1. Antimicrobienne**

#### **3.1.1. Les infections microbiennes**

Les maladies infectieuses représentent la cause majeure de mortalité dans le monde, ce sont des affections provoquées par des microorganismes pathogènes telles que les bactéries, les virus, les parasites ou les champignons et touchent des millions des personnes dans le monde (Alwash *et al.*, 2013), l'apparition des souches résistantes aux antibiotiques usuels, l'émergence d'un pouvoir pathogène chez des souches habituellement saprophytes de notre environnement et les immunodépressions causées par l'infection à VIH sont les principaux facteurs de la forte recrudescence de ces maladies (Bagre *et al.*, 2007).

#### **3.1.2. Les antibiotiques**

L'élimination des microorganismes pathogènes fait appel à des substances dites : antibiotiques (ATB). Ces derniers sont synthétisés par des microorganismes (le plus souvent des champignons). Ils ont la capacité soit de détruire les bactéries (effet bactéricide), ou d'inhiber leur croissance (effet bactériostatique) (Elghozi et Duval., 1992).

#### **3.1.3. Les antimicrobiens d'origine végétale**

Des infections microbiennes se basent principalement sur l'usage des antibiotiques (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 carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhesines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

### **3.2. Antioxydants**

#### **3.2.1. Le stress oxydant**

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicinales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques, situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines (Favier, 2003).

Les molécules pro oxydantes ou radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites quotidiennement dans l'organisme sont contrôlées par les antioxydants. Un stress oxydatif survient lorsque l'équilibre est rompu en faveur des radicaux libres. Toutefois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes

antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydant/antioxydant (Christophe *et al.*, 2011).

### **3.2.2. Radicaux libres**

Un radical libre est défini comme une molécule ou un fragment moléculaire possédant un électron (ou plusieurs) non apparié qui se trouve le plus souvent sur l'orbitale externe de la molécule. Il est instable et a tendance à chercher à se stabiliser en s'appariant avec un électron appartenant à une autre molécule voisine provoquant ainsi sa déstabilisation et entraînant une réaction en chaîne qui aboutit à des destructions au niveau cellulaire (Halliwell et Gutteridge, 1989).

### **3.2.3. Antioxydants**

Un antioxydant est une substance ou molécule, capable en petite quantité, de prévenir, de retarder et de réduire l'oxydation d'un substrat. Les antioxydants sont d'origine endogène métaboliques comme des enzymes et d'origine exogènes nutritionnelles (Parihar *et al.*, 2008).

## **3.3. Anti- inflammatoire**

### **3.3.1. L'inflammation**

L'inflammation est un processus de défense de l'organisme dont le but est de neutraliser, de combattre ou d'éliminer l'agent pathogène (endogène ou exogène) et de préparer la réparation des tissus. Les signes de ce processus sont : chaleur, rougeur, douleur, gonflement (Kumar *et al.*, 2003).

Une réaction inflammatoire est l'un des modes de réponse les plus fréquents de l'organisme, provoquée par différents pathogènes, infectieuse (bactéries, virus ou parasites), immunologiques, traumatismes physiques ou chimique (intervention chirurgicale, microcristaux) et nécrose tissulaire, elle peut manifester de manière aiguë ou chronique (Regnault, 1992).

### **3.3.2. Anti-inflammatoires d'origine végétale**

Le nombre des composés phytochimiques, trouvés dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand. Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés anti inflammatoire (Fiebich et Chrubasik, 2004).

# **Partie expérimentale**

# **Chapitre 4**

## **Matériel et méthodes**

## 4.1. Matériel

### 4.1.1. Réactif et appareillages

Plusieurs réactifs chimiques et appareillages ont été utilisés dans la présente étude (voir annexe 1).

### 4.1.2. Matériel biologique

#### 4.1.2.1. Matériel végétal

Les feuilles de *C. angustifolia* utilisées dans cette étude ont été achetées chez un herboriste de la ville de Ouled Djellal; Biskra (Octobre 2018) , elles ont subi un nettoyage et lavage à l'eau pour éliminer tous les traces de poussière, séchées à 40C°pendant une semaine, puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique et tamisées afin de pouvoir récupérer une poudre fine et homogène.



**Figure 5.** Les feuilles et poudre de *C.angustifolia* (Balasankar *et al.*, 2013).

#### 4.1.2.2. Souches bactériennes et fongiques

L'activité antibactérienne et antifongique a été évaluée sur des souches de référence (tab. 1).

**Tableau 1.** Différent souches microbiennes utilisées dans le test antimicrobien.

Gram +	Gram-	Fongique
<i>Entérocooccus faecalis</i> ATCC29212	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Candida albicans</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC5923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19115		

ATCC: American type culture collection.

## 4.2. Méthodes

### 4.2.1. Préparation des extraits

L'objectif de l'extraction est de récupérer les molécules bioactives présentes dans les feuilles de *C. angustifolia*, notamment les composés phénoliques et les flavonoïdes. Les activités d'extraction sont effectuées par épuisement du matériel végétal.

#### 4.2.1.1. Préparation de l'extrait méthanolique

Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par Bekheet *et al.*, (2011) avec une légère modification :

40g de la poudre des feuilles sont macérés dans le méthanol 75% (V/V). Le mélange est maintenu sous agitation pendant 72 heures à une température ambiante. Après macération, la solution obtenue a été filtrée plusieurs fois sur papier wattman N° 03, et le filtrat est récupéré. La même opération a été répétée 3fois, afin d'avoir une extraction exhaustive, et le filtrat 3 est récupéré.

Les trois filtrats ont été mélangés et le méthanol est éliminé du filtrat par évaporation à 40°C ; dans l'étuve (37C°) permettant ainsi d'obtenir un extrait sec caractérisé par une couleur marron foncé, qui est considéré comme étant l'extrait brut.

#### 4.2.1.2. Préparation de l'extrait Aqueux

Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par Konkon *et al.* (2006) en y apportant quelques modifications :

10g de la poudre des feuilles sont macérés dans 200 ml eau distillée puis agiter manuellement et doucement ; Chauffer le mélange dans un bain-marie bouillant pendant 30 minutes ; Laisser le mélange refroidir à la température ambiante. Après macération, la solution obtenue a été filtrée papier Wattman n°1. Répéter la procédure trois fois (fraction retenue par le filtre dans 200 ml eau distillée bouillante); Les trois filtrats obtenus sont placés dans un seul

réipient ; dans l'étuve (37C°) permettant ainsi d'obtenir un extrait sec caractérisé par une couleur marron claire, qui est considéré comme étant l'extrait brut.

Le rendement 'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$\boxed{\text{Taux d'extraction (\%)} = \frac{P_1}{P_0} \times 100}$$

P0 : poids de la poudre avant l'extraction. P1 : poids de l'extrait sec après l'extraction.

## 4.2.2. Profil chimique

### 4.2.2.1. Dosage des polyphénols

- Principe

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique folin ciocalteu selon la méthode décrite par Singleton et Rossi (1965).

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotomètre selon la méthode de folin ciocalteu ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif folin-ciocalteu en un complexe ayant la couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénolique oxydés.

- Mode d'opérateur

Dans un tube à essai mélanger 100 µl d'extrais + 500 µl du réactif de folin ciocalteu à 10 % (v/v) le mélange est incubé pendant 4 min. on ajout ensuite 400 µl de NaCO<sub>3</sub> (carbonate de sodium) à 7.5 % (v/v) puis le mélange est soumis à une autre incubation pendant 2h à l'obscurité la lecture se fait dans la longueur d'onde 765 nm.

Le blanc de test contient 100 µl d'éthanol 500 µl de folin et 400 µl de NaCO<sub>3</sub>.

- Expression des résultats

Les concentrations en composés phénoliques totaux des extraits sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue à différentes concentrations d'acide gallique dans le méthanol. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent en acide gallique par 1 milligramme d'extraits sec (µg EAG/mg d'extrait).

#### 4.2.2.2. Dosage des flavonoïdes

- Principe

La teneur en flavonoïdes dans les extraits a été déterminée par spectrophotométrie selon Lamaison et Carnat (Quettier-Deleu *et al.*, 2000), en utilisant une méthode basée sur la formation d'un complexe flavonoïde-aluminium, après décomposition du chlorure d'aluminium, ayant le maximum d'absorption à 430 nm. La quercétine a été utilisée pour établir la courbe d'étalonnage.

- Mode d'opérateur

1 ml d'échantillon dilué a été mélangé séparément avec 1 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 2%. Après une incubation à la température ambiante pendant 15 minutes, l'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à 430 nm avec un spectrophotomètre et la teneur en flavonoïdes a été exprimée en  $\mu\text{g}$  par g d'équivalent en quercétine.

- Expression des résultats

Les concentrations en flavonoïdes totaux des extraits sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue à différentes concentrations de quercétine. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait.

#### 4.2.3. Etude l'activité antimicrobienne des différents extraits

##### 4.2.3.1. Milieux des cultures utilisés

Selon les méthodes utilisées dans l'essai et selon les souches, nous avons utilisé les milieux suivants :

- \* La gélose nutritive (GN) pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes.
- \* La gélose Mueller Hinton (MH) pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux différents extraits de *C.angustifolia*.
- \* Pomme de terre dextrose agar (PDA) pour l'isolement et l'entretien des souches fongiques.

##### 4.2.3.2. Repiquage des espèces

Les différentes espèces microbiennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37 °C (bactérie) et 28°C (fongique) afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum (Zeghad, 2009).

#### 4.2.3.3. Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes sontensemencées dans la GN et incubées à 37°C pendant 24 h, et fongique dans PDA et incubées à 28°C pendant 72h pour optimiser leur croissance. On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches à tester. Décharger l'anse dans 9ml d'eau physiologique stérile, La suspension bactérienne est bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland ou à une DO de 0.08 à 0.10 à 625 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort (Harrar, 2012).

#### 4.2.3.4. Ensemencement et dépôt des disques

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boites pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées.

L'opération est répétée trois fois entourant la boite de 60°à chaque fois, l'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. Les disques chargés avec 15 µl d'extraits (50mg /ml) sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile.

De même les antibiogrammes réalisés avec des disques contenant des ATB (témoin positif) et DMSO (témoin négatif) appropriés prêts à l'emploi ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des extraits testés.

Finalement, les boites de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 h à 37°C (bactérie) et 72 h à 28°C (fongique) (Ben abbes, 2011).

La lecture des résultats se fait par la mesure, à l'aide d'une règle graduée, du diamètre de la zone d'inhibition formée autour du disque, en prenant la moyenne des deux essais effectués.

#### 4.2.4. Détermination de la capacité antioxydant totale (TAC)

La capacité antioxydant totale (TAC) ou l'activité réductrice du molybdate des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène proposée par Prieto *et al.* (1999).

- Principe

Le principe de cette méthode est basé sur la réduction de molybdène présent sous la forme d'ions molybdate  $\text{MoO}_4^{2-}$  à molybdène  $\text{MoO}_2^+$  en présence de l'antioxydant pour former un complexe vert de phosphate dans un milieu acide.

- Mode opératoire

Un volume de 3 ml d'une solution préparée en mélangeant 0,6 M d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ), 28 mM de phosphate de sodium ( $Na_3PO_4$ ) et 4 mM de molybdate d'ammonium ( $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$ ), est ajouté à 0,3 ml de chaque extrait (à différentes concentrations). Les tubes sont incubés à 95°C pendant 90 min. L'absorbance des solutions est mesurée après refroidissement à 695nm.

#### 4.2.5. Etude de l'activité dénaturation des bovine serum albumin (BSA)

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits méthanolique et aqueux de la plante étudiée a été évaluée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines décrite par Lavanya *et al.* (2010).

- Principe

Le principe consiste à l'inhibition de dénaturation du BSA provoquée par la chaleur (72°C) par les extraits.

- Mode opératoire

1 ml de chaque concentration (800-6,26µg/ml) par dilution 1/2 d'extrait ou du standard + 1 ml de solution de BSA 0.2% préparé dans le Tris HCl pH : 6,6 incubation à 37 C° pendant 15 min puis dans un bain marie à 72°C pendant 5 min. contre le blanc contient 0,5ml BSA et 0,5ml de Tris-HCl.

Utilisant le diclofénac comme un standard avec les mêmes conditions que les extraits.

Après refroidissement la turbidité est mesurée à 660 nm dans un spectrophotomètre à cuve.

# **Chapitre 5**

## **Résultats et discussion**

## 5.1. Rendement

Les résultats du rendement des extraits sec sont regroupés dans le tableau ci-dessous

**Tableau 2.** Résultats pourcentages, couleurs et aspect des extraits de *C.angustifolia*.

Extrait	Couleur	Aspect	Poids de l'extrait (g)	Pourcentage de l'extrait(%)
Extrait méthanolique	Marron fonce	poudre	9,7	24,25
Extrait aqueux	Marron clair	poudre	2	20

Le rendement exprimé en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse de la plante fraîche, le rendement le plus élevé a été observé avec l'extrait méthanolique (E. Méth) (24,25%) par rapport l'extrait aqueux (E. Aq) (20%).

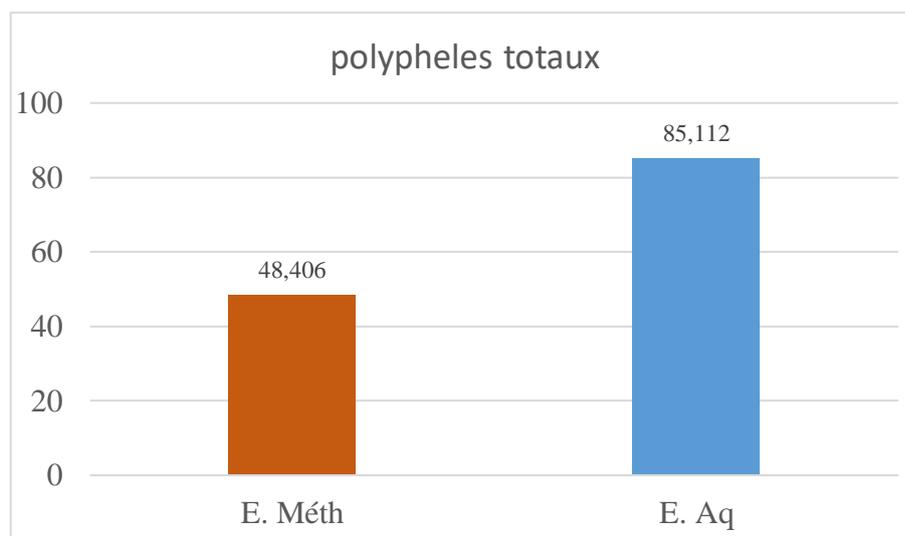
D'une manière générale, les teneurs en extraits secs varient non seulement d'une plante à une autre de la même famille mais également en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide : la température, le solvant d'extraction et la taille des particules, affectent tous le contenu total en phénols et flavonoïdes, et par conséquent affecte les activités biologiques médiées par ces métabolites (Lee *et al.*, 2003).

## 5.2. Dosage des métabolites secondaire

### 5.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Le contenu phénolique total dans les E.A et E. Méth de *C.angustifolia* a été évalué en traçant une courbe standard en utilisant différentes concentrations d'acide gallique L'équation de régression linéaire est :  $y = 0.0034 x + 0.1044$  Sachant que le coefficient de corrélation :  $R^2 = 0.9972$  (voir annexe 2).

La quantité totale de contenu phénolique présente dans chaque extrait, exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique (EAG) / g (fig. 6).



**Figure 6.** Teneur des extraits de *C.angustifolia* en polyphénols totaux.

L'analyse a montré qu'une quantité considérable de contenu phénolique était présente dans les extraits méthanolique et aqueux de *C.angustifolia*.

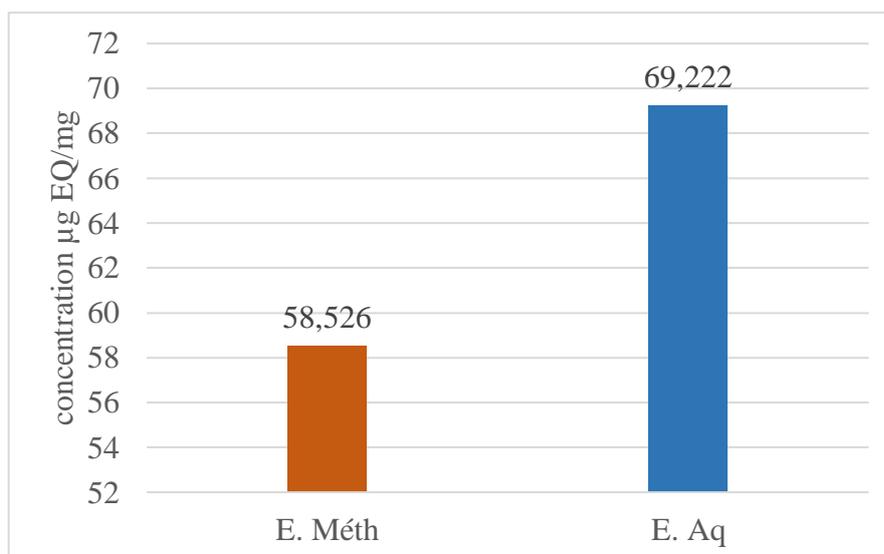
L'extrait aqueux est riche en polyphénols totaux et contient une teneur de 85.112 mg EAG/g d'extrait. Après l'extrait méthanolique de 48.406 mg EAG /g d'extrait.

Une étude faite par Ahmed et *al.* (2016) montre que la teneur en polyphénols totaux dans l'extrait méthanolique et aqueux des graines de *C.angustifolia* est de 2.328 mg EAG/g, 0.535 mg EAG/g respectivement. Ces taux sont inférieurs à nous résultats. Alors en peut conclure que les feuilles sont plus riches en polyphénols que les graines.

#### 4.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La courbe d'étalonnage de la quercétine a été utilisée pour évaluer la quantité totale de contenu de flavonoïdes en utilisant différentes concentrations. L'équation de régression linéaire est :  $y = 0.0048 x$ , sachant que le coefficient de corrélation :  $R^2 = 0.997$  (annexe 3).

Dans chaque extrait, La teneur des flavonoïdes sont exprimés en mg équivalent de quercétine par g d'extrait (fig. 7)



**Figure 7.** La teneur des extraits de *C.angustifolia* en flavonoïdes totaux.

Les extraits aqueux de *C.angustifolia* présentaient une teneur en flavonoïdes plus élevée que l'extrait méthanolique avec une concentration de 69.22 mg EQ/g d'extrait. Par comparaison avec les résultats précédant on peut conclure que les flavonoïdes expriment 81% des polyphénols totaux. Par ailleurs l'extrait aqueux contient 58.52 mg EQ/g.

D'autre part une étude faite par Ahmed *et al.* (2016) montre que la teneur en flavonoïde dans les graines de *C.angustifolia* est de 5.00 mg EQ/g, dans l'extrait méthanolique et 1.29mgQE/g d'extrait aqueux ce qui montre que les feuilles sont plus riches en flavonoïdes par rapport aux graines.

Selon Laghari *et al.* (2011) le taux des flavonoïdes dans les deux parties aériennes de *C.angustifolia* (l'extraction par micro-ondes) est 28.15mg EQ/g et 26.30 mg EQ/g trouvés dans les fleurs et les feuilles respectivement.

### 5. 3. Activité antimicrobienne

Nous avons étudié le pouvoir antimicrobien des extraits de la plante *C. angustifolia* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé.

L'activité antimicrobienne de nos extraits est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition (mm) autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis des souches (Tab. 3).

**Tableau 3.** Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits de *C. angustifolia*.

Souches	E. Aq	E. Méth	Témoin + (ATB)		
			AUG	AMP	MET
<i>S. aureus</i>	-	8,5 ± 0,70	ND	22	ND
<i>E. coli</i>	-	8 ± 1,41	ND	27	ND
<i>E. faecalis</i>	-	-	20	ND	ND
<i>P. Aeruginosa</i>	-	-	22	ND	ND
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	ND	20	ND
<i>C. albicans</i>	-	-	ND	ND	18

AUG : Amoxicilline + Ac. Clavulanique ; AMP : Ampicilline ; MET : Métronidazole ; ND : Non diamètre

Par la concentration étudiée (50mg /ml), l'E. Aq ne possède aucun effet sur ces souches microbiennes, les zones d'inhibition ne dépassent pas le diamètre des disques, le même résultat pour l'E. Méth sur tous les souches sauf *S. aureus* et *E. coli* qui possède un effet correspond un diamètre d'inhibition (8,5±0,70mm) et (8±1,41mm) respectivement. Ces effets sont plus faibles que ceux obtenus avec l'antibiotique standard utilisé, à savoir l'ampicilline (AMP), qui a donné des diamètres d'inhibition de 25 à 28mm (voir annexe 4).

L'E. Méth est actif sur *S. aureus* et *E. coli*, mais cette activité reste faible par rapport aux études de Vijaya et al. (2016) qui ont trouvés les mêmes diamètres inhibition (10 mm) pour ces souches par l'extrait méthanolique. Et ils sont montrés que cette extrait de partie aérienne du *C.angustifolia* a un effet inhibiteur sur la croissance de (*E. faecalis*, *P. aeruginosa* et *C. albicans*) cette effet exprimée par diamètres d'inhibition respectifs de (10 ; 8 et 8 mm).

Selon Ahmed *et al.* (2010), il a testé l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique des feuilles de *C. angustifolia*. Ils ont utilisé plusieurs souches parmi eux *C. albicans* et *P. aeruginosa*, les résultats obtenus dans cette étude ont montré que cet extrait possède un effet inhibiteur sur ces souches avec des zones d'inhibition  $12 \pm 0,8$  mm et  $12,1 \pm 0,43$  mm respectivement à faible concentration (10 mg/ml) par rapport (50mg/ml).

Les résultats obtenus dans le présent travail montrent que l'E. Aq n'a aucun effet inhibiteur envers la croissance de toutes les souches microbiennes testées. Ce résultat montre par Ahmed *et al.* (2010) pour *P. aeruginosa* et *C. albicans*.

Par contre Vijaya *et al.* (2016) qui ont montrés que l'extrait aqueux de partie aérienne du *C. angustifolia* a un effet inhibiteur sur la croissance de *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *C. albicans* cette effet exprimée par diamètres d'inhibition respectifs de (9 ; 10 ; 7 et 8 mm).

Selon Orhan *et al.* (2012), l'activité antimicrobienne dépend de plusieurs facteurs à savoir l'espèce de la plante, la préparation de l'extrait, le solvant utilisé, et la sensibilité des bactéries. Aussi que la nature et la dose de la substance active présente dans les extraits.

L'activité d'un extrait est probablement due à la présence de synergie entre un nombre de composants, qui lorsqu'ils sont séparés deviennent inactifs individuellement (Sarker *et al.*, 2005). Cela est interprété par le fait que les plantes produisent une variété énorme des petites molécules antibiotiques ayant un large spectre de structure telle que les terpénoïdes, les glycostéroïdes, les flavonoïdes et les polyphénols. Cependant, la plupart de ces petites molécules ont une faible activité antibiotique par rapport aux antibiotiques communs produits par les bactéries et les champignons (Benbrinis, 2012).

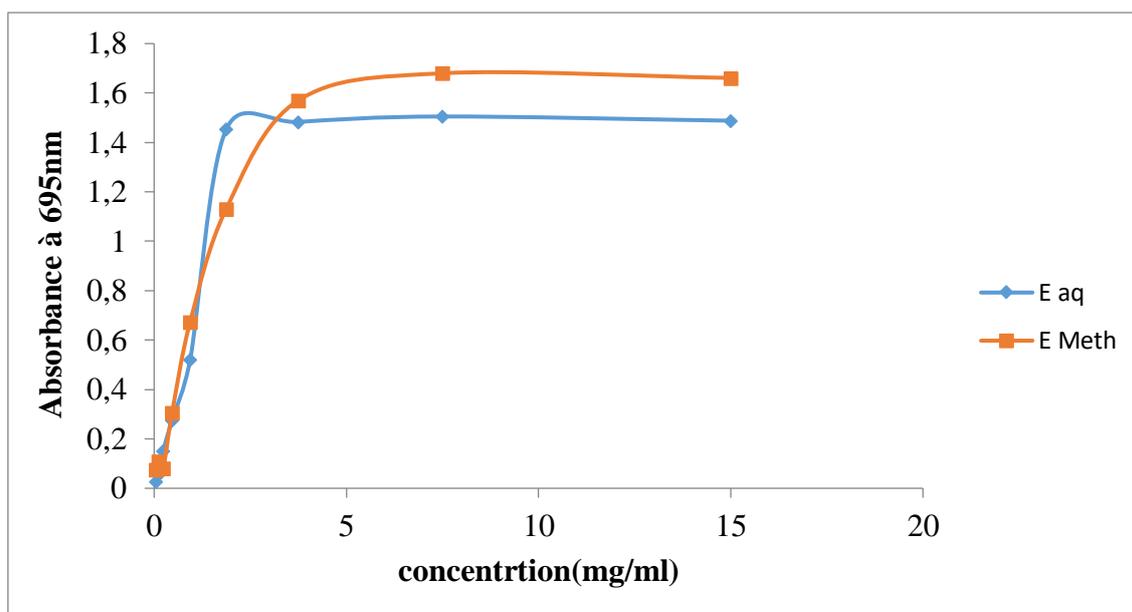
Cette variabilité des résultats de l'activité biologique des extraits végétaux peut dépendre du contenu en polyphénols. De plus, Les mécanismes d'action des composés naturels sont expliqués de différente manière selon les auteurs.

Selon Bel-Rhliid *et al.* (2016), l'activité antimicrobienne est liée à la polarité des substances bioactives. Les composés les moins polaires comme les flavonoïdes n'ayant pas de groupement OH sur leur cycle B sont plus actifs vis-à-vis des agents microbiens que ceux portant le groupement hydroxyle.

Les conditions de séchage et de broyage de la santoline peuvent être aussi à l'origine de l'absence de l'activité antimicrobienne. Il est rapporté par Seidel (2005) que si la plante est connue par son contenu en composés volatiles ou thermolabiles, il est conseillé de congeler le matériel végétal le plutôt possible après sa collection. Il est aussi recommandé de le broyer subséquemment dans un mortier avec le nitrogène liquide car le broyage est aussi à l'origine de la génération de chaleur responsable de la perte des molécules volatiles ainsi que la décomposition et l'oxydation des molécules thermolabiles (Jones et Kinghorn, 2005).

#### **5.4. Capacité antioxydant totale TAC**

Les résultats obtenus pour la capacité antioxydant de cette plante sont montrées dans la (fig. 8) ci-dessous:



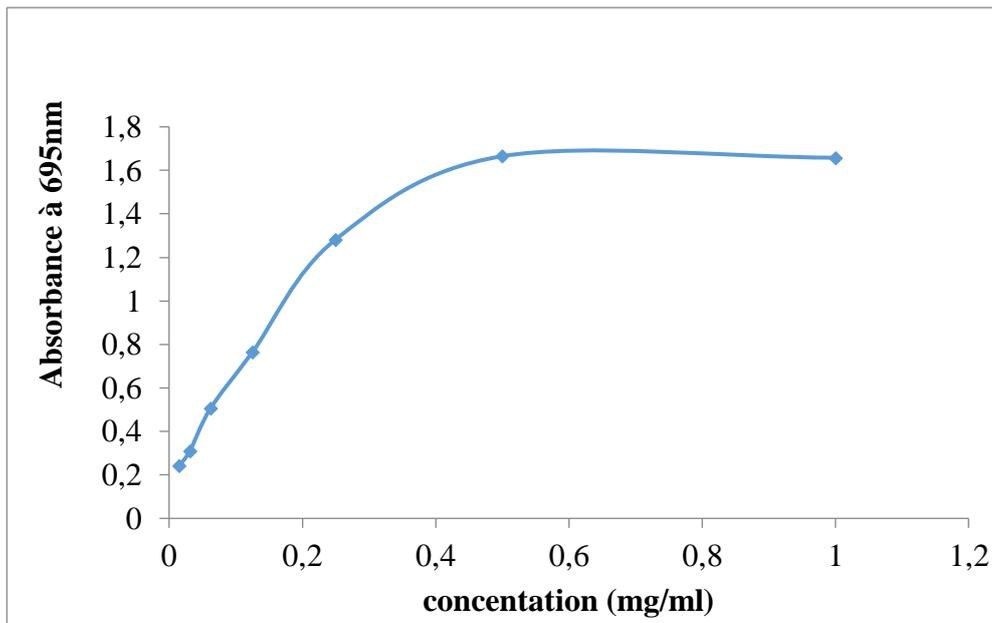
**Figure 8.** Capacité antioxydant totale des extraits de *C. angustifolia* à différentes concentrations.

Cette figure montre que les deux extraits présentent des activités antioxydants importantes. Elles sont proportionnelles aux Abs qui selon le graphe, augmentent en fonction de la concentration.

L'E. Méth possède la meilleure capacité antioxydant représentée par son absorbance maximale qui est de  $(1,680 \pm 0,002)$ , obtenue pour une concentration de 7,5mg/ml, tandis que l'E. Aq révèle d'activité réductrice inférieure montrée par leur Abs maximale à la même concentration qui est de  $(1,505 \pm 0,002)$ . Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que, l'E. Méth et l'E. Aq, présentant une capacité antioxydant importante, renferme des molécules ayant un potentiel réducteur donneur d'électron.

Et en concentration 7,5mg /ml, on observe la stabilité de l'absorbance des extraits qui signifie la réduction maximale de molybdate.

Comparant les résultats obtenus pour les extraits avec ceux de l'acide ascorbique (fig. 9), ils sont à suggérer que les extraits de *C. angustifolia* ont une capacité antioxydant considérable mais reste faible par rapport au standard qui a révélé une activité antioxydant maximale pour une faible concentration de 1mg/ml représentée par une absorbance de 1,658.

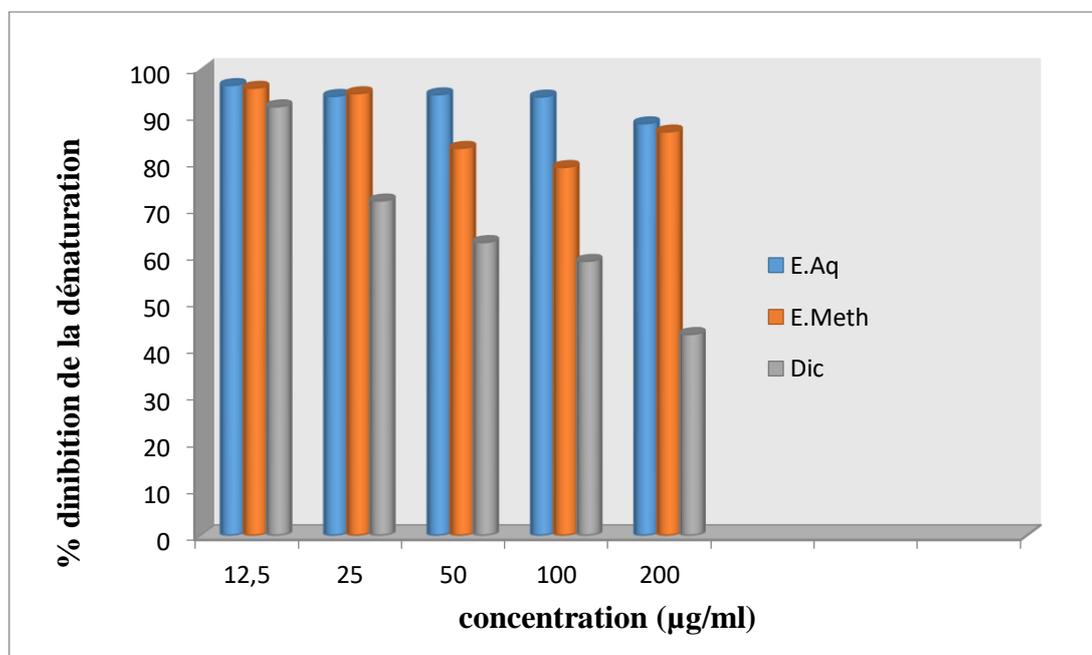


**Figure 9.** Capacité antioxydant totale du standard (Acide ascorbique) à différentes concentrations.

#### 5.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

##### 5.4. 1. Dénaturation thermique de BSA

Pour évaluer l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de deux extraits des feuilles de *C. angustifolia* nous avons utilisé le test de l'inhibition de la dénaturation de BSA. Les taux d'inhibition obtenus à différentes concentrations des extraits sont représentés dans la figure suivante (fig. 10).



**Figure 10.** Effet des extraits de *C.angustifolia* et diclofénac sur la dénaturation de BSA.

A partir des résultats de taux d'inhibition de la dénaturation de BSA d'E. Méth et d'E. Aq des feuilles de *C.angustifolia* et diclofénac est inversement proportionnel à la concentration.

Le pourcentage d'inhibition le plus élevé a été enregistré pour l'E. Aq avec une valeur 96,49% qui est obtenu avec la concentration la plus faible (12,5 mg/ml), suivi de l'E. Met et diclofénac avec un pourcentage de 95,90% et 91,81% respectivement à la même concentration.

En effet à des même concentrations (12,5 µg/ml, 25 µg/ml et 50 µg/ml, 100µg/ml et 200 µg/ml) des extraits et le diclofénac (anti-inflammatoire de référence), les extraits présentent la meilleure efficacité diclofénac. Ce résultat montre que polyphénols et flavonoïdes plus active que diclofénac.

Les extraits bruts de plante commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle des molécules naturelles bioactives notamment les polyphénols et les flavonoïdes connus par leurs propriétés thérapeutiques. Ils font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses, la protection des aliments contre l'oxydation et des anti-inflammatoires (Jan *et al.*, 2016).

# **Conclusion**

## Conclusion

Ce travail a été mené dans le cadre d'évaluation de l'activité antimicrobienne antioxydant et anti-inflammatoire des extraits méthanolique et aqueux obtenu par décoction de partie aérienne de *C.angustifolia* de la famille Caesalpinaceae c'est un médicament réputé en médecine traditionnelle et fréquemment utilisé dans la médecine traditionnelle comme préservatif pendant longtemps.

L'extraction de la partie aérienne de la plante a permis d'obtenir des rendements qui sont différentes en fonction des solvants d'extraction utilisés (24.25% pour l'extrait méthanolique et 20% pour l'extrait aqueux).

Du point de vue phytochimiques, cette plante médicinale s'est révélée riche en composés phénoliques et en flavonoïdes, le meilleur taux a été obtenu par extrait aqueux.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur des souches microbiennes, selon la méthode sur diffusion de disque, les souches étudiées présentent une résistante vis-à-vis a l'extrait méthanolique de la plante, sauf *S. aureus* et *E. coli* qui montre un effet faible. Les résultats obtenus dans le présent travail montrent que l'extrait aqueux n'a aucun effet inhibiteur envers la croissance de toutes les souches microbiennes testées.

L'activité antioxydant des extraits de *C.angustifolia* été évaluée par méthode de capacité antioxydant totale .Les résultats de la présente étude, ont révélés que les extraits de cette plante ont une activité antioxydant qui varie toujours en fonction du solvant d'extraction et de la concentration. Les extraits ont exercé une bonne activité réductrice du molybdate.

Nos différents extraits ont révélé une inhibition efficace de la dénaturation thermique de l'albumine sérique avec des pourcentages maximaux de 96,49% et 95,90% pour l'extraits aqueux et méthanolique respectivement ils sont donc dotés d'une activité anti-inflammatoire.

La plante *C. angustifolia* est une source prometteuse d'agents antioxydants mais de faible agents antimicrobiens ce qui est expliqué par la nature des composés présents dans cette plante.

D'autres études concernant l'identification des molécules bioactives, la confirmation de la capacité antioxydant de *C. angustifolia* par des tests *in vivo* ainsi que l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de cette plante et des extraits vis-à-vis d'autres souches bactériennes sont nécessaires.

# **Références bibliographique**

- A**ddy M. E., Schwartzman M.L. 1995. An extract of *Desmodium adscendens* activates cyclooxygenase and increases prostaglandin synthesis by ram seminal vesicle microsomes. *Phytotherapy Research* 9: 287 – 93.
- Akiyama H., Fujii K., Yamasaki O., Oono, O., Iwatsuki, K. 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48 (4): 487-491.
- Allen, O. N., Allen E.K. 1981. *The Leguminosae, a source book of characteristics, uses and nodulation*. The University of Wisconsin Press. Madison.
- Alonso J. 2004. *Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos*. 1°Ed. Editorial Corpus Libros. Rosario. Argentina. Pág: 985-989.
- Alves, M.J. Ferreira, I.C.F.R. Froufe, H.J.C. Abreu, R.M.V. Martins, A. and Alwash M S., Ibrahim N., Ahmad W. Y. 2013. Identification and mode of action of antibacterial components from *Melastoma malabathricum* linn leaves. *American Journal of Infectious Diseases* 9(2): 46-58.
- Aruoma, O.I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in food plants. *Mut. Res*, **9(20)**: 523 - 524.
- B**agre I., Bahi C., Gnahoue G., Djaman A. J., Guede G F. 2007. Composition phytochimique et evaluation in vitro de l'activité antifongique des extraits des feuilles de *Morinda morindoides* baker (milne-redhead (Rubiaceae) sur *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans*. *J. sci. pharm. biol* 8(1): 15-23.
- Balasankar D, Vanilarasu K, Selva Preetha P, Rajeswari M, Umadevi S., Bhowmik D. 2013. *Journal of Medicinal Plants Studies*. *Journal of Medicinal Plants Studies* 1(3): 2320-3862.
- Bel-Rhliid R., Chênevert R., Piché Y. (2016). Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO<sub>2</sub>-enriched conditions. *New Phytologist*;122:461- 467.
- Ben Abbes F. 2011. Etude de quelques propriétés chimiques et biologiques d'extraits de dattes «*Phoenix dactylifera* L.». Magister en Génie des procédés pharmaceutiques. Université Ferhat Abbas Sétif,
- Benbrinis S. 2012. Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits de *Santolina chamaecyparissus*. Thèse de magistère, Université ferhat abbas-setif, 84 pages.

- Billing J., Sherman P. 1998. Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot. *Q. Rev. Biol* 73: 3-49.
- Bouden I. 2018. Etude de l'activité antiarthritique, antioxydante et antimicrobienne des extraits de *Matricaria pubescens*. Thèse de magistère, Université Ferhat Abbas Sétif 1, 151 pages.
- Boudjouref M. 2011. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Magister en biochimie, Université Ferhat Abbas, Sétif, 64p.
- Broughton W.J. 1984. Nitrogen fixation: Legumes. *The Journal of Chartto and Windus* 2Tdlondress.117.
- Bruneton J. 1999. Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 3ème édition. 3, lavoisier, Paris.
- C**errado. *American Journal of Plant Sciences*, 4: 2193-2198.
- Christophe P. & Christophe S. 2011. Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain. Edition Springer, p 84.
- Cowan M. M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 564-582.
- E**lghozi J.L., Duval D. 1992. Pharmacologie 2ème Ed : Médecin Flammarion. Paris. 289p.
- Epifano F., Genovese S., Menghini L., Curini M. 2007. Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry* 68:939 - 953. Patel KD, Pillai SN. Effect of fungicides on the leaf spot of senna. *Ind. J. Mycol* 1980: 10-108.
- Evans R. 1992. The healing forest: Medicinal and toxic plants of the northwest amazonian. 2nd ed. Vol. 11. Estados Unidos: Ed. Dioscorides Press 484.
- F**avier A., 2003. Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, *Mécanismes biochimiques*, p 108-115.
- Fiebich BL., Chrubasik S. 2004. Effects of an ethanolic *Salix* extract on the release of selected inflammatory mediators in vitro. *Phytomedicine*, 11: 135-138.

Fiori, G.M.L., Fachin, A.L., Correa, V.S.C., Bertoni, B.W., Giuliatti, S., Amui, Gabor M., Cody V., Middleton E J., Harborne J B., Beretz A., Liss A .R. 1988. Plants Flavonoids in biology and Medecine II; Biochemical, Cellular and Medecinal properties. New York, 1-15 p.

**G**uignard J.L. 1996. Biochimie végétale, Ed. Lavoisier, Paris, p175-192.

Gulluce M., Sahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A., Ozkan H. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. Food Chemistry 103: 1449–1456.

**H**alliwell B., Gutteridge J M C. 1989. Free radicals in biology and medicine. 2nd edition, Clarendon Press.

Hans., Kothe . 2007. Contribution à l'étude des composés phénoliques des graines de *Myrtus communis* L. Plantes médicinales et phytothérapie, P 24.

Harrar A. N. 2012. Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Magister en Biochimie et physiologie expérimentale, Université Ferhat Abbes, Sétif, 67p.

Heller W ., Forkmann G. 1993. The flavonoids. Advances in research since 1986. In Harbone JB .Ed. Chapman & Hall, London 399-425.

**I**serin P. 2001. Larousse encyclopédie des plantes médicinales. Ed. Larousse.10-132.

**J**an T., Ludvik Bo., Lukas H. 2016. Phenolic composition, antioxidant and antiproliferative activities of edible and medicinal plants from the Peruvian Amazon. Revista Brasileira de Farmacognosia 26: 728-737.

Jones W P and Kinghorn A D (2005). Extraction of plant secondary metabolites. In: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. Humana Press (Totowa), pp: 323-411.

Jnanesha AC., Ashish K., Vanitha T., Deepak K V. 2018. Opportunities and challenges in the cultivation of senna (*Cassia angustifolia* (Vahl.)). International Journal of Herbal Medicine 6(4): 41-43.

**K**arthik K., Bharath, R.P., Venu Priya R., Sunil Kumar K., Ranjith Singh B., Rathore. 2013. Evaluation of anti-inflammatory activity of *canthium parviflorum* by in vitro method. Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology 2320 – 3471.

Khaldi A., Meddah B., Moussaoui A., Benmehdi H. (2012). Screening phytochimique et effet antifongique de certains extraits de plantes sur le développement *in vitro* des moisissures. *European Journal of Scientific Research* **80(3)**: 311-321.

Kistamma S., Venkateshwar C. 2018. Pharmacognosy of Cassia angustifolia Leaf Grown in Differently Treated Soils. Special Issue 6: 2580-2589.

Konkon N G., Simaga D., Adjoungova A. 2006. Etude phytochimique de mitragyna inermis (willd.) o. ktze (rubiaceae), plante a feuille antidiabetique», *Pharm Méd Trad Afr.* Vol. 14: pp 73-80.

Kumar V., Cotran R.S. et Robbins S.L. 2003. Robbins Basic Pathology. Saunders.

**L**avanya R., Maheshwari S.U., Harish G., Raj J.B., Kamali S., Hemamalani D., Varma J.B., Reddy C.U. 2010. Investigation of in-vitro anti-inflammatory, anti-platelet and anyiarthritic activities in the leaves of Anisomeles malabarica Linn. *Res J Pharm Biol Chem Sci* 1(4): 746-752.

Lee K. W., Kim Y. J., Lee H. J., Lee C. Y. (2003). Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem* 51: 7292-7295.

**M**axted., Bennett, S.J. 2001. Conservation, diversity and use of Mediterranean Legumes. *Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean.* Maxted N, and Bennett S. J. PO Box 17, 3300 AA Dordrecht , Netherlands, Kluwer Academic Publ 39:132.

metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact*, **160**: 1-40.

Moutinho C. (2013). Antispasmodic activity of aqueous extracts from *Mentha piperita* native from Trás-osMontes region (Portugal). *International Journal of Indigenous Medicinal Plants* 29(1): mushrooms, SAR analysis and docking studies. *Journal of Applied Microbiology*, pp:1167-1174.

Muanda F N.2010. Identification de polyphenols , evaluation de leur activite antioxydante et etude de leurs proprietes biologiques. Thèse de doctorat, Ecole doctorale sesames,295p

**O**rhan, D.D., ozcelik, B., hosbas, S. and vural, M. (2012). Assessment of antioxidant, antibacterial, antimycobacterial, And antifungal activities of some plants used as folk remedies in Turkey against dermatophytes and yeast-like fungi. *Turkish journal of boilogy*, 36: 672-686.

**P**aolini, V., Dorchie Ph., Hoste H. 2003. Effet des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvre. *Alter. Agri* 17 -19.

Parihar, A., Parihar, MS., Milner, S. 2008. Bhat S. Oxidative stress and antioxidative mobilization in burn injury. *Burns*, 34:6-17.

- Peter A T., Sivagami S., Akkini Devi T., Ananthi N., Priya Velammal S . 2012. Biogenic synthesis of silver nanoparticles by leaf extract of *Cassia angustifolia*. *Nanosci. Nanotechnol.*
- Pintado, M. (2013). Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild Polhill
- R. M., Raven P.H., Stirton C. H. 1981. Evolution and systematic of Leguminous. In: *Advances in legume Systematics*. Eds. Polhill, R.M, andRoyal, P. P. BotanicGardens, Kew, UK.
- Polhill, R. M., Raven, P.H.; and Stirton, C. H,( 1981) -. Evolution and systematic of Leguminous. In: *Advances in legume Systematics*. Eds. Polhill, R.M, andRoyal, P. P. Botanic Gardens, Kew, UK
- Prieto P., Pineda M., Aguilar M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, (269): 337-341.
- R**ahal K. 2005. Standardisation de L'antibiogramme en Médecine Humaine à l'Echelle Nationale selon les recommandations de l'OMS, 4ème édition, éd Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière.
- Regnult J. P. 1992. *Immunologie générale* .5eme édition Decarie. P278-296.
- S**.F., França, S.C. and Pereira, A.M.S. (2013). Antimicrobial Activity and Rates of *saponaria*. *Toxicology Report*, 2: 1-3.
- Seidel V (2005). Initial and Bulk Extraction. In: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. *Natural products isolation*. Humana Press (Totowa), pp: 27-37.
- Sarker S D, Latif Z and Gray A I (2005). *Natural Product Isolation*. In: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. *Natural products isolation*. Humana Press (Totowa), pp: 1-23.
- Sarkhel, S. (2015). Evaluation of the anti-inflammatory activities of *Quillaja*
- Sebihi F.Z. 2008. Les Bactéries Nodulant les Légumineuses (B.N.L) :caractérisation des bactéries associées aux nodules de la Légumineuse Fourragère, *Hedysarum perrauderianum*. Thèse de magistère, Université mentouri de constantine,121 pages.
- Sereme A., Millogo-Rasolodimby J., Guinko S., Nacro M. 2010. Anatomie et concentration des tanins des plantes tannifères du Burkina Faso. *Journal des sciences*, 10: 24 -32.
- Shabina I.A., Muhammad Q.H ., Muhammad T, Qaisar M ., Muhammad I., Kristen K .,Robert B. B. 2016 . Pharmacologically active flavonoids from the anticancer, antioxidant and antimicrobial extracts of *Cassia angustifolia* Vahl. *Complementary and Alternative Medicine* 16:460 .

Shazia S ., Mushtaq A., Muhammad Z, Mir Ajab K.,Muhammad A.2012. Authentication of herbal drug Senna (*Cassia angustifolia* Vahl.): A village pharmacy for Indo-Pak Subcontinent. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 6(3): 2299-2308.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Tannins in *Stryphnodendron adstringens* Mart. Accessions Collected in the Brazilian Free radicals,

VijayaSekhar V.E., Satya Prasad M., Suman Joshi D.S.d ., Narendra K., Krishna S.A., Sambasiva Rao K.R.S. 2016. Assessment of Phytochemical Evaluation and In-vitro Antimicrobial Activity of *Cassia angustifolia*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 8(2):305-312.

Zeghad N. 2009. Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Magister en Biotechnologie végétale, Université Mentouri, Constantine, 84p.

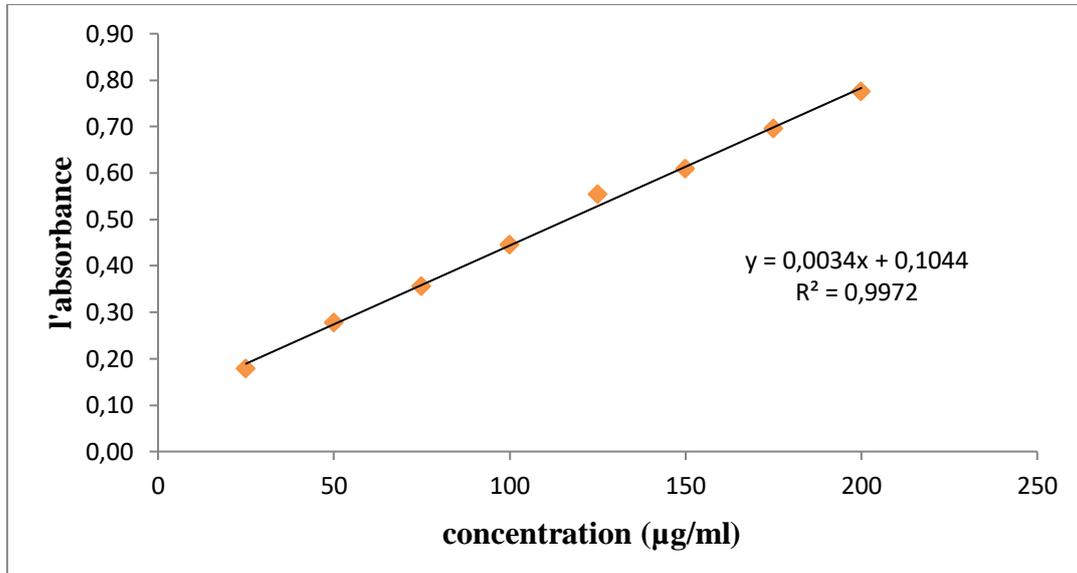


## Annexes

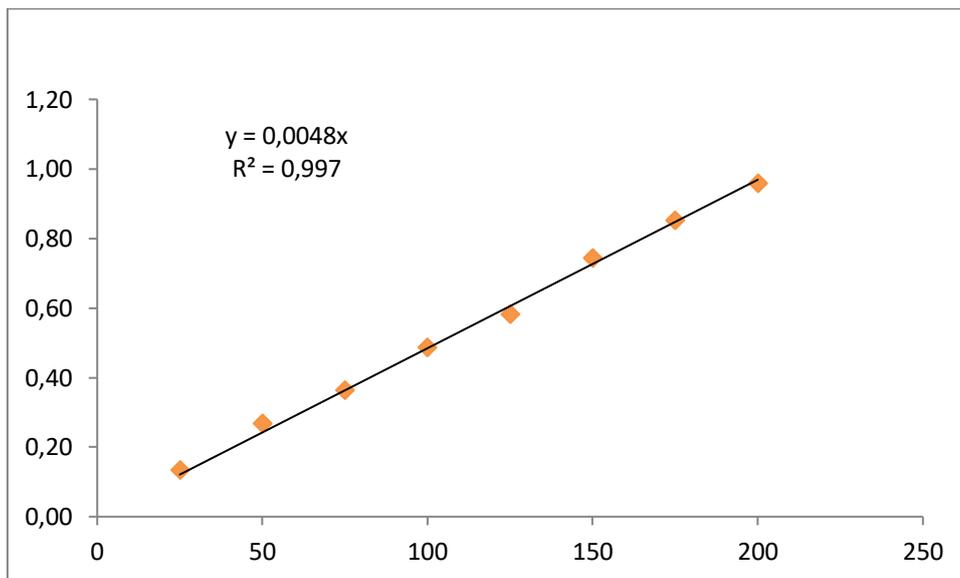
## Annexe(1)

<b>Appareillages</b>	<b>Réactifs</b>
Boîtes de pétrie en vert et en plastique	Bovine serum albumin
Bec Benzène	Diméthylsulfoxyde
Plaque chauffante agitatrice(Stuart)	folin ciocalteu
Etuve (MEMMERT)	carbonate de sodium
Evaporateur rotatif.	méthanol
Spectrophotomètre UV-visible (SELECT)	d'acide gallique
Balance de précision (KERN, ABT 220-5DM)	chlorure d'aluminium
Bain-marie(MEMMERT)	d'acide sulfurique
Disques vide stériles	phosphate de sodium
Tube à essai	molybdate d'ammonium
Vortex (VELP Scientifica)	molybdate d'ammonium
Autoclave	BSA
Balance (KERN EMB 220-1)	Diclofénac
Papier Filtre	L'eau physiologique

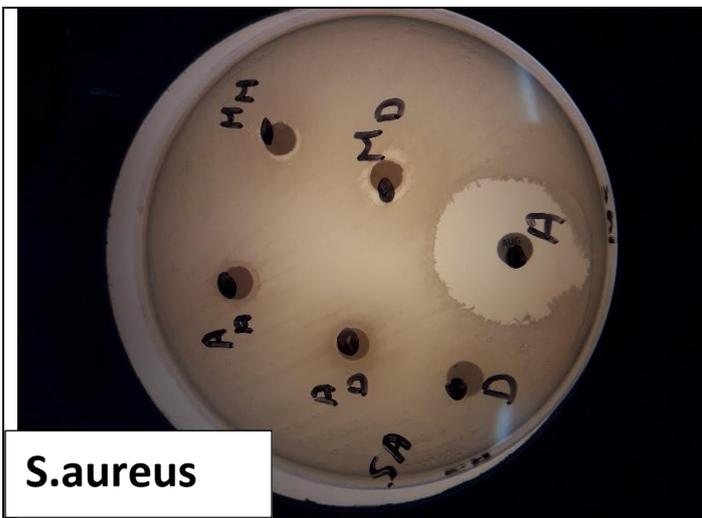
## Annexe (2)

**Figure11** : Courbe d'étalonnage d'acide gallique

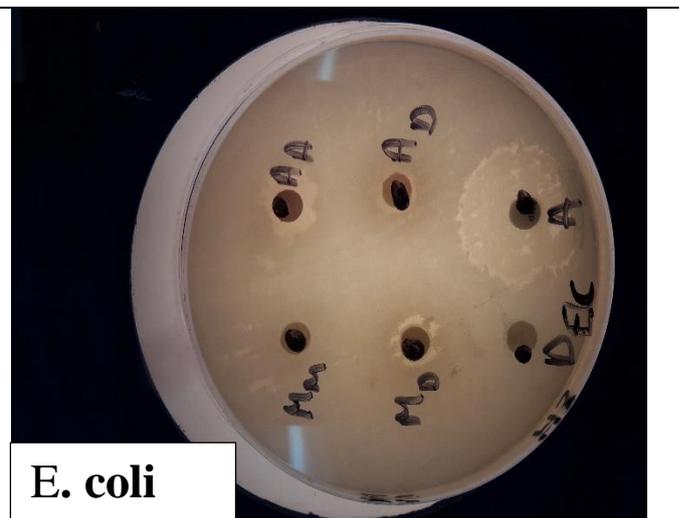
## Annexe(3)

**Figure12** : Courbe d'étalonnage de la quercétine

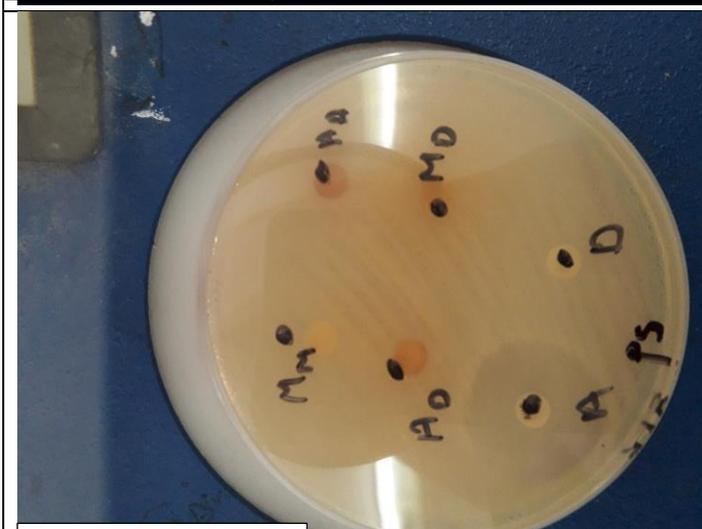
## Annexe (4)



**S.aureus**



**E. coli**



**P. Aeruginosa**



**E. faecalis**



**C. albicans**



**L. monocytogenes**

Antimicrobien des extraits de la plante *C. angustifolia*

## الملخص

ان الهدف من هذه الدراسة هو تقييم نشاط مضاد الميكروبات، مضاد الأكسدة ونشاط مضاد الالتهاب لمختلف مستخلصات الجزء العلوي لنبته *Cassia angustifolia* في المختبر تم تقدير كمية محتوى البوليفينول الكلي والفلافونيد بواسطة Folin-Ciocalteu و trichlorure d'aluminium على التوالي.

بواسطة النشر على الأقراص في وسط جيلوزي تم التحقيق في النشاط المضاد للميكروبات من المستخلصات المائية والميثانولية بالإضافة الى إمكانية المضادة للأكسدة بطريقة القدرة الارجاعية الكلية ونشاط مضاد الالتهاب بواسطة استعمال BSA.

تم تسجيل أعلى كمية من الفلافونويد 69,22mgQE/g و الفينول 85,11 mg GAE/ g في المستخلص المائي. اما المستخلص الميثانولي لديه القدرة على تثبيط نمو الميكروبات من *E. coli* و *S.aureus*. أظهر مستخلص الميثانول نشاط مضادات الأكسدة قوي جداً (TAC). نتائج النشاط المضاد للالتهابات من المستخلصات يقدم فعالية مثبطة أعلى قليلا من ديكلوفيناك.

. **الكلمات المفتاحية:** مضاد الميكروبات، مضاد الاكسدة، مضاد الالتهاب، *Cassia angustifolia*، البوليفينول، الفلافونيد.

## Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antimicrobienne, antioxydant et l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de différents extraits de la partie aérienne de *Cassia angustifolia*. La teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu et trichlorure d'aluminium respectivement. L'effet antimicrobien de l'extrait aqueux et méthanolique a été évalué par la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé. Ces extraits ont ensuite été évalués par le potentiel antioxydant (TAC). L'activité anti-inflammatoire des extraits a été déterminée via la dénaturation du BSA.

Les teneurs les plus élevés en flavonoïdes 69,22 mg QE/g et phénolique 85,11mg GAE/g a été enregistrés dans l'extrait aqueux. Nos résultats ont montré que l'extrait méthanolique à inhiber la croissance microbienne d'*E. Coli* et de *S. aureus*, il présente aussi une très forte activité antioxydant (TAC). Ainsi, l'activité anti-inflammatoire des extraits présente une apparence inhibitrice légèrement supérieure à celle du diclofénaç.

**Mots clé :** antimicrobienne, antioxydant, anti-inflammatoire, *Cassia angustifolia*, polyphénols, flavonoïdes.

## Abstract

The objective of this study is to evaluate .In-vitro antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activity of deferent fractions of the aerial part of *C. angustifolia* .The total phenolic and flavonoid contents of extracts were evaluated by the Folin-Ciocalteu method and aluminum chloride colorimetric assay respectively. The antimicrobial activities of *C. angustifolia* aqueous and methanolic extracts were investigated by the disk diffusion method. These extracts were further evaluated for antioxidant potential by the CAT. Anti-inflammatory activitie of the extracts were determined denaturation of BSA.

The highest amounts of flavonoids of 69, 22 mg QE/ g and of phenolic of 85, 11 mg GAE/ g was recorded in the aqueous extract. Methanolic extract have the potential to inhibit microbial growth of *E. coli* and *S.aureus*. The Methanolic extract showed a very strong antioxidant activity (CAT). The results anti-inflammatory activity of the extracts presents an inhibitory efficacy slightly higher than that of diclofénaç.

Key words: antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, *C. angustifolia*, total phenolic, flavonoid.