

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة محمد بوضياف/المسيلة
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF DE M'SILA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE ET BIOCHIMIE
MEMOIRE : MASTER ACADEMIQUE
FILIERE: BIOLOGIE
OPTION: MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

Présenté par

OKBA Imane
Et
ZAÏTER Aya

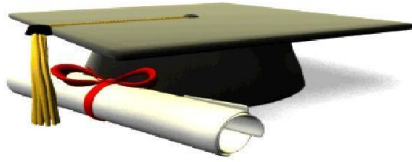
Thème

**Evaluation des activités antioxydante et
antimicrobienne de l'extrait méthanolique de
Clematis cirrhosa L.**

Devant le jury

M ^r SELLOUM Mounir	MAA - UMB –M'sila	Président
M ^r HENDEL Noui	MCB - UMB –M'sila	Rapporteur
M ^r KHERBACHE Abdallah	MAA - UMB –M'sila	Examineur

Soutenu le : 07/07/2021
Année universitaire : 2020 /2021



Dédicace

C'est avec l'aide et la grâce d'Allah que j'ai achevé ce modeste travail que je dédie

A ma très chère mère

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessés de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

A mon très cher père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mes soeurs

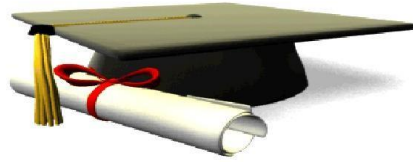
Insaf; Bouchra et Hibba.

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

Je vous remercie les familles Okba, Lemaouche, Saib et Bouziane et à mes chères ami(e)s ont aidée et encouragée de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



FIN



Dédicace

C'est avec l'aide et la grâce d'Allah que j'ai achevé ce modeste travail que je dédie

A ma très chère mère

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessés de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

A mon très cher père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mes frères

Souhaib ; maria; hafsa et noussaiba.

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

Je vous remercie les familles Zaiter, Boukhari et Laraba et à mes chères ami(e)s ont aidée et encouragée de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

AAA





REMERCIEMENTS

En guise de reconnaissance, nous tenons à remercier d'abord ALLAH le tout puissant de nous avoir donné le courage, la force et la patience d'achever ce modeste travail.

*Nous adressons également nos remerciements les plus sincères à **Mr HENDEL Noui**, notre directeur de recherche, qui a bien voulu accepter de diriger ce mémoire.*

Nous avons énormément apprécié travailler avec vous durant notre cursus. Veuillez accepter, monsieur, notre très profonde reconnaissance et l'assurance de nos sentiments les plus distingués.

*Nous remercions chaleureusement les membres du jury, **Mr SELLOUM Mounir** et **Mr KHERBACHE Abdallah**, nous faites un grand honneur d'avoir accepté d'être le jury de notre soutenance, tout en remerciant vivement les responsables et le personnel du laboratoire de recherche des sciences de la nature et de la vie à l'université de M'sila, plus précisément, à **Mme. Noui Mehedi Ilham**, pour son aide et son soutien.*

Nos sincères gratitudee à tous nos chers enseignants, tout le corps professoral et l'équipe scientifique et pédagogique du laboratoire de biochimie et microbiologie pour la qualité de leur enseignement, leurs conseils et leur intérêt incontestable qu'ils portent à tous les étudiants.



Sommaire

Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Les plantes médicinales	02
1.1. Les avantages des plantes médicinales	02
1.2. Les inconvénients des plantes médicinales	02
2. Phytothérapie	02
2.1. La phytothérapie traditionnelle	02
2.2. La phytothérapie clinique	03
2.3. Intérêt de La phytothérapie	03
3. Métabolites secondaires	03
3.1. Les polyphénols	03
3.2. Les flavonoïdes	04
4. Activités biologiques des extraits du plantes	04
4.1. Activité antioxydante	04
4.1.1. Radicaux libres	04
4.1.2. Stress oxydatif	05
4.1.3. Les antioxydants	05
4.1.3.1. Les antioxydants endogènes	05
4.1.3.2. Les antioxydants exogènes	06
4.1.3.3. Mécanismes d'action des antioxydants	06
4.2. Activité antimicrobienne et résistance aux antibiotiques	06
5. Microorganisme testés	07
6. Plante étudiée : <i>Clematis cirrhosa</i> L.	08
6.1. Description botanique	08
6.2. Utilisation et propriétés médicinales	09

Chapitre II: Matériel et méthodes

1. Matériel végétal	10
2. Procédés d'extraction	10
2.1. Extraction méthanolique par macération (EM)	10
3. Dosage des composés phénoliques	10
3.1. Dosage des polyphénols	11
3.2. Dosage des flavonoïdes	11
4. Evaluation de l'activité antioxydante	11
5. Evaluation de l'activité antimicrobienne	12
5.1. Microorganismes testés	12
5.2. Préparation de l'inoculum	12
5.3. Activité antibactérienne	12
5.4. Activité antifongique	13

Chapitre III: Résultats et discussion

1. Rendement de la plante	17
2. Dosage des composés phénoliques de la plante	17
3. Activité antioxydante	17
3.1. Test DPPH	17

4. Activité antimicrobienne	18
Conclusion	25
Références bibliographiques	26
Annexes	32

Résumé

Clematis cirrhosa L. est une plante médicinale appartenant à la famille des *Renonculacées*. Elle est largement utilisée en médecine traditionnelle pour les douleurs rhumatismales et comme agent diurétique. Le but de ce travail est de déterminer la teneur de l'extrait méthanolique (EM) en composés phénoliques de cette plante, ainsi que d'évaluer ses activités antioxydante, antibactérienne et antifongique. *C. cirrhosa* collectée de Hammam Dalaa de la wilaya de M'sila a fait l'objet de cette étude. Le rendement de l'extraction méthanolique par macération était de 16% (m/m). Les teneurs en polyphénols totaux (TPT) et en flavonoides totaux (TFT) a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu et le trichlorure d'aluminium. L'activité antioxydante a été réalisée par le test de DPPH et l'IC₅₀ de l'extrait a été déterminée. L'activité antimicrobienne a été évaluée, pour 09 souches bactériennes (G⁺ et G⁻) et 04 champignons, par la méthode des puits de diffusion. Les teneurs de l'EM en polyphénols et flavonoides étaient 150.16 µg EAG/mg et 22.439 µg EQ/mg respectivement. L'IC₅₀ de DPPH est 1.685 mg/ml. Ces résultats montrent que les l'EM de *C. cirrhosa* possède une activité antioxydante plus importante, riche en composés phénoliques et flavonoides. L'extrait avait un effet antimicrobien faible voire nul.

Mots clés - *Clematis cirrhosa* L. *Renonculacées*, extrait méthanolique, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

Liste des abréviations

ATCC	American Type Culture Collection ;
BHT	Butylhydroxytoluene ;
DMSO	Dimethylsulfoxyde ;
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazile ;
EAG	Equivalent en acide gallique ;
EM	extrait méthanolique ;
EQ	équivalent de quercétine ;
ERN	espèces réactives de l'azote ;
ERO	espèces réactives de l'oxygène ;
I%	pourcentage d'inhibition ;
IC50	concentration de l'échantillon fournissant 50% d'inhibition ;
MHA	Mueller-Hinton Agar ;
PP	Polyphenols ;
PDA	Potato Dextrose Agar ;
TFT	teneur en flavonoïdes totaux ;
TPT	teneur en polyphénols totaux ;

Liste des figures

Figure 01 :	Propriétés des polyphénols	03
Figure 02 :	Structures de l'enchaînement benzo- γ -pyrone	04
Figure 03 :	Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques	07
Figure 04 :	<i>Clematis cirrhosa</i> L.	09
Figure 05 :	Dispositifs d'extraction par macération.	10
Figure 06 :	Teneurs en TPT et en TFT de l'EM de <i>C. cirrhosa</i> .	17
Figure 07 :	Pourcentages d'inhibition du DPPH• selon des concentrations de l'EM de <i>C. cirrhosa</i> (A) et le BHT (B).	17

Liste des tableaux

Tableau 1:	Diamètres des zones d'inhibition illustrant l'activité antibactérienne et antifongique de l'EM (300 ; 600 ; 900 mg/ml) de <i>C. cirrhosa</i> .	19
------------	--	----

INTRODUCTION

Introduction

Depuis longtemps, les plantes médicinales ont été utilisées pour améliorer et guérir la santé de l'homme. Aujourd'hui, elles sont exploitées dans plusieurs domaines, notamment celui thérapeutique. Au cours des dernières décennies, les recherches scientifiques n'ont fait que confirmer le bien-fondé des vertus thérapeutiques de la plupart des plantes médicinales utilisées de façon empirique depuis des millénaires. De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales a conservé une large place du fait de leur efficacité dans diverses procédures thérapeutiques (Volak and Stodola, 1984).

Le stress oxydant se définissant comme un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et antioxydants dans l'organisme (Roberts and Sindhu, 2009). A été décrit réellement comme un facteur étiologique crucial impliqué dans diverses maladies chroniques humaines telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, inflammation, diabète mellitus et vieillissement (Uttara *et al.*, 2009). Ces dommages oxydants sont réalisés par l'attaque des radicaux libres sur de divers biomolécules, en particulier les protéines, les lipides et l'ADN, ayant finalement comme conséquence la dégradation et la mort de cellules (Moon and Shibamoto, 2009).

Les infections bactériennes sont causées par différents micro-organismes et sont la cause des maladies les plus fatales et des épidémies les plus répandues. De nombreux antibiotiques sont développés pour les traiter, cependant leur utilisation abusive est à l'origine de l'apparition de la multirésistance bactérienne.

Les plantes médicinales, qui ont toujours eu une place importante dans l'arsenal thérapeutique de l'humanité, constituent la meilleure alternative, car elles forment une source très importante de molécules bioactives.

Les objectifs de la présente étude sont :

- Avoir un extrait (par l'utilisation du méthanol) de la partie aérienne de la plante médicinale *Climatis cirrhosa* L.
- Le dosage du contenu polyphénolique de l'extrait en question.
- L'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante et antimicrobienne de cet extrait.

CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les plantes médicinales

L'histoire des plantes médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires (Janssen *et al.*, 1987 ; Bouzouita *et al.*, 2008).

Les plantes médicinales sont impliquées dans différents secteurs sous formes de principes actifs, des huiles, des extraits, des solutions aqueuses ou organiques ou même telles qu'elles sont. En fait il s'agit de plantes qui sont utilisées à des fins thérapeutiques pour prévenir, soigner ou soulager divers maux ; ce sont de drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (Iserin, 1996).

1.1. Les avantages des plantes médicinales

Généralement, les plantes médicinales d'usage courant ne provoquent que très peu, voire aucun effet indésirable: c'est l'un de leurs principaux avantages. De plus, l'action synergique des divers constituants commence à être mieux comprise et acceptée scientifiquement (Decaux, 2002). Contrairement à certaines croyances populaires, plusieurs plantes ont des effets pratiquement immédiats sur le métabolisme (Pinto *et al.* .2006; Salgueiro *et al.* 2003).

1.2. Les inconvénients des plantes médicinales

Certaines plantes sont inoffensives, mais d'autre, comme de nombreuses espèces (digitale, belladone, colchique, etc...), sont toxiques et ne sont utilisées que sous des formes bien contrôlées, exclusivement commercialisées en pharmacie. L'emploi inconsidéré de plantes cueillies dans la nature peut aboutir à des intoxications graves et mortelles (Williamson, 2001).

2. Phytothérapie

La phytothérapie est le traitement par les plantes (Bruneton, 1993), c'est une discipline allopathique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de végétaux, de parties de végétaux ou de préparations à base de végétaux, qu'elles soient consommées ou utilisées en voie externe (Wichtl and Anton, 1999).

On distingue deux types de phytothérapies :

2.1. La phytothérapie traditionnelle

C'est une thérapie de substitution qui a pour but de traiter les symptômes d'une affection. Ses origines peuvent parfois être très anciennes et elle se base sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement. Elles concernent notamment les pathologies saisonnières depuis les troubles psychosomatiques légers jusqu'aux symptômes hépatobiliaires, en passant par les atteintes digestives ou dermatologiques (Prescrire, 2007).

2.2. La phytothérapie clinique

Dans ce type les indications sont liées à une thérapeutique de complémentarité. Elle vient compléter ou renforcer l'efficacité d'un traitement allopathique classique pour certaines pathologies (Chabrier, 2010).

2.3. Intérêt de la phytothérapie

La phytothérapie se pratique sous différentes formes et uniquement dans le cas de maladies «bénignes». Bien sûr, bon nombre de symptômes nécessitent des antibiotiques ou autres traitements lourds. Dans d'autres cas, se soigner par les plantes représente une alternative reconnue par la médecine et dénuée de tout effet toxique pour l'organisme (Berlencourt, 2008-2017).

3. Métabolites secondaires

3.1. Les polyphénols

Les polyphénols sont des composés naturels, largement répandus dans le règne végétal, qui ont une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires (Vârban *et al.*, 2009). C'est une classe constituée d'environ 8000 composés, divisés en plusieurs catégories dont les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins (Middleton *et al.*, 2000). La structure des composés phénoliques va du simple noyau aromatique de faible poids moléculaire jusqu'aux tanins complexes de très haut poids moléculaire, et ils peuvent être classés par le nombre et l'arrangement des atomes de carbone les composant, en fonction de la nature de leur squelette carboné et en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique (Cheyrier *et al.*, 1997).

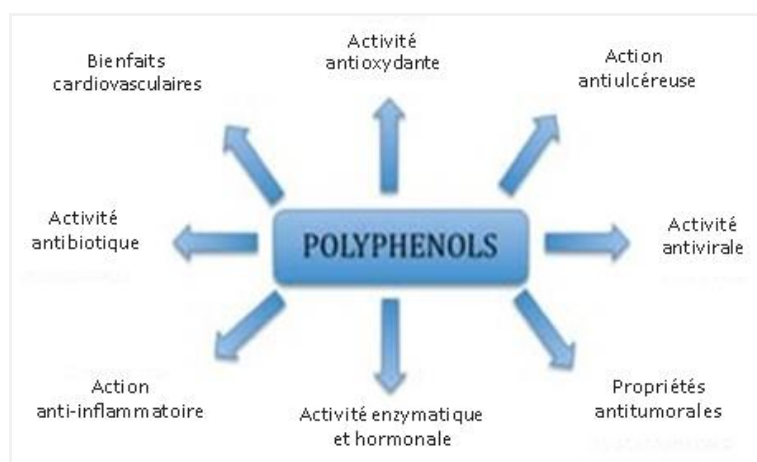


Fig. 1 - Propriétés des polyphénols (Uthurry *et al.*, 2011).

3.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires (Erlund, 2004). Ils sont retrouvés également dans plusieurs plantes médicinales. Des remèdes à base de plantes renfermant des flavonoïdes ont été, et sont utilisés en médecine traditionnelle de par le monde (Di Carlo *et al.*, 1999).

Les flavonoïdes peuvent être classés en flavones, flavonols, flavanols, isoflavonoïdes, flavanones et anthocyanes (Vauzour, 2012), et tous dérivent de l'enchaînement benzo- γ -pyrone et peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo- γ -pyrone (Di Carlo *et al.*, 1999).

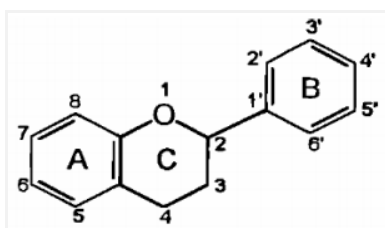


Figure 2- Structures de l'enchaînement benzo- γ -pyrone (Di Carlo *et al.*, 1999).

4. Activités biologiques des extraits de plantes

4.1. Activité antioxydante

L'oxydation représente un processus indispensable dans le métabolisme des cellules aérobies de l'organisme. Elle met en jeu la molécule d'oxygène dont la production par des voies métaboliques non contrôlées engendre la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) telles que les radicaux libres superoxide $O_2^{\cdot-}$, hydroxyl HO^{\cdot} , alkoxy RO^{\cdot} et peroxy RO_2^{\cdot} . Ces radicaux sont impliqués dans le stress oxydant qui est caractérisé par un déséquilibre entre la production des ERO (prooxydants) et l'élimination de ces espèces par le mécanisme de défense antioxydante (Al-Laith, 2010).

4.1.1. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante (libre) en contenant un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié sur une orbitale) (Halliwell, 1996). Les Radicaux libres peuvent être d'origine exogène: produits des radiations (rayons X et lumière UV), polluants de l'air (N, NO), solvants organiques, anesthésiques, pesticides, drogues, xénobiotiques et hyperoxie. Lorsqu'ils sont d'origine endogène, ils sont produits en majorité, au niveau des chaînes

respiratoires mitochondriales des cellules des organismes aérobies (Halliwell and Gutteridge, 1989).

4.1.2. Stress oxydatif

Le stress oxydatif apparaît dans une cellule quand l'équilibre entre les espèces prooxydantes et antioxydantes est rompu en faveur de l'état prooxydant. La rupture de cet équilibre est due à la promotion d'espèces activées de l'oxygène, ou radicaux libres oxygénés (Halliwell, 1996).

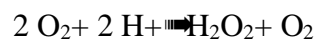
4.1.3. Les antioxydants

Les antioxydants constituent une famille de substances susceptibles de neutraliser les radicaux libres et prévenir ainsi la survenue des maladies associées au stress oxydant (Kulawik *et al.*, 2013).

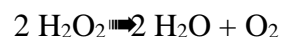
4.1.3.1. Les antioxydants endogènes (enzymatiques)

Les défenses antioxydantes enzymatiques incluent celles catalysées par les superoxyde dismutases, la catalase, le système glutathion/glutathion peroxydase(s)/glutathion réductase et le système glutarédoxine (peroxyrédoxine)/thiorédoxine/thiorédoxine réductase.

Les superoxyde dismutases (SOD) catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et oxygène moléculaire (Nordberg and Arnér, 2001) selon la réaction:



La catalase, dans son mode dit catalasique, catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire (De Duve, 1965). selon la réaction:



Dans le système glutathion/glutathion peroxydase/glutathion réductase, le glutathion, sous sa forme réduite, est un tripeptide (γ -glutamyl-cystéinyl-glycine) naturel synthétisé par les cellules et doté d'un groupement réducteur représenté par la fonction thiol de sa cystéine (Meister and Andersen, 1983).



Dans le système thiorédoxine/thiorédoxine peroxydase (peroxyrédoxines)/thiorédoxine réductase, l'élimination des peroxydes peut être catalysée directement par les thiorédoxine réductases qui, comme les glutathion peroxydases, contiennent du sélénium sous forme de sélénocystéine (Nordberg and Arnér, 2001).



4.1.3.2. Les antioxydants exogènes (non enzymatiques)

Les antioxydants exogènes, vu leur efficacité, leur faible coût et leur disponibilité, sont largement utilisés dans les aliments comme additifs dans le but de prévenir la rancidité. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matières de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture ([Wang et al., 2003](#)).

4.1.3.3. Mécanismes d'action des antioxydants

Les antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes:

- L'antioxydant est transformé en un radical qui doit être suffisamment stable pour inhiber la formation d'un autre radical et arrêter ainsi la propagation de la chaîne radicalaire. Il doit ensuite évoluer vers un produit d'oxydation stable, ce qui conduit à la consommation de l'antioxydant ([Halliwell, 1995](#)).
- Réaction des molécules avec les radicaux peroxydes ou alcoxydes pour donner des produits non radicalaires interrompant ainsi la propagation de la peroxydation ([Schafer and Buettner, 1999](#)).

4.2. Activité antimicrobienne et résistance aux antibiotiques

Les antibiotiques sont une découverte thérapeutique importante en pratique médicale et ont joué un rôle important dans le traitement des infections microbiennes ([Levy, 1992](#)). L'application excessive et sélective des antibiotiques a provoqué l'émergence et la propagation de la résistance chez les microorganismes ([Turner, 2011](#)).

La résistance bactérienne aux antibiotiques aurait deux origines essentielles, naturelle et acquise. La première est programmée au niveau du pool génomique alors que la seconde est développée en fonction des conditions métaboliques ([Julian and Dorothy, 2010](#)).

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques ont été largement étudiés, et de nombreuses cibles des fonctions cellulaires ont été impliquées dans ces mécanismes (Fig. 3) ([Bouyahia et al., 2017](#)).

- Diminution de l'adsorption des aminoglycosides (Fig. 3.1).
- Modification de l'interaction des lipopeptides avec la membrane cellulaire (Fig. 3.2).
- Modification de l'activité enzymatique des aminoglycosides (Fig. 3.3).
- Modification de liaison des β -lactamines à des cibles intracellulaires (Fig. 3.4).
- Modification de liaison à des cibles membranaires (Fig. 3.5).
- Réduction de l'affinité des glycopeptides à des cibles membranaires (Fig. 3.6).

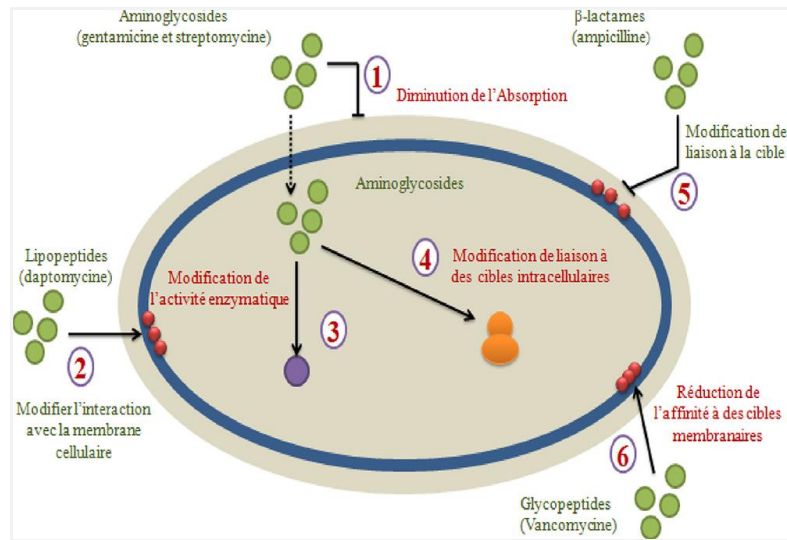


Fig.3. Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques (Bouyahia *et al.*, 2017b).

5. Microorganismes testés

- 5.1. *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis*** sont des bactéries de la famille entérobacteriaceae qui sont nommés Colibacilles, des bacilles à G⁻, aéro-anaérobie facultatives, oxydase négative, mobile, commensal de tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. *Proteus mirabilis* étant agent des infections urinaires (Dworkin, 2006 (Dworkin *et al.*, 2006)).
- 5.2. *Klebsiella pneumoniae*** est une entérobactérie à Gram négatif, commensales des voies aériennes supérieures et du tube digestif, *Klebsiella* provoque des infections urinaires et des surinfections des bronches chez les bronchitiques chroniques voire des abcès du poumon (Dworkin *et al.*, 2006).
- 5.3. *Staphylococcus aureus*** est un coque (coccus) à Gram positif, groupés en amas ayant la forme de grappes de raisin, immobiles, non sporulés, catalase positive et oxydase négative. C'est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme (Dworkin *et al.*, 2006).
- 5.4. *Bacillus cereus*** est un grand bacille à Gram positif, groupés en chaînettes. La plupart sont des saprophytes du sol, de l'eau, de l'air et des plantes. *Bacillus cereus* peut se multiplier dans les aliments et y produire une entérotoxine qui provoque des diarrhées (Dworkin *et al.*, 2006).
- 5.5. *Pseudomonas aeruginosa*** est un bâtonnet Gram négatif. En milieu hospitalier, il est à l'origine des infections et des suppurations locales ou profondes. Ainsi il est très fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales (Ouis, 2015).

5.6. *Penicillium expansum* est un champignon très important car il est agent de la pourriture bleue des pommes. Isolé aussi du sol et de végétaux en décomposition (Botton *et al.*, 1990).

5.7. *Aspergillus niger* est un champignon pathogène contaminant banal, très largement répandu, parfois difficile à distinguer d'espèces telles qu'*A. awamori* ou *A. phoenicis*. Il secrète l'acide oxalique, flavaspérone, malformines et l'aflatoxines par certaines souches (Botton *et al.*, 1990).

5.7.1. *Candida*

Candida est un commensal de la muqueuse humaine et animale. Les infections causées par le genre *Candida* sont considérées comme endogènes. Les candidoses se développent habituellement chez les personnes ayant un système immunitaire déprimé, le plus souvent en présence d'une immunité cellulaire perturbée. Environ 70% des candidoses humaines sont causées par *C. albicans* (Kayser *et al.*, 2005).

6. Plante étudiée : *Clematis cirrhosa* L.

Clematis, l'un des plus grands genres de la famille Ranunculaceae et également connu sous le nom de pivoine clématite, est un genre d'environ 300 espèces, principalement distribué dans les régions tempérées au nord de l'équateur de la terre, qui sont des vignes boisées typiques allant des régions tropicales aux zones glaciales et du niveau de la mer aux hautes altitudes (Zhang *et al.*, 2015). Les plantes de clématites jouent un rôle important dans les jardins botaniques en raison de leurs fleurs uniques, leurs couleurs riches et leurs tiges en forme de fil et sont saluées comme la «reine de Vignes» (Beutler, 2014). La clématite peut être vue dans la plupart des jardins botaniques, parcs et jardins familiaux. De plus, la clématite est une source végétale de nombreux ingrédients actifs médicinaux et des métabolites spécialisés peuvent être utilisés comme médicament pour disperser le vent humide, désobstruer les canaux et soulager la douleur (Chohra *et al.*, 2020).

6.1. Description botanique

Clematis cirrhosa L connue sous le nom Clématite à vrilles, appartenant à la famille de Renonculacées, est une plante à tige sarmenteuse, grimpante, presque glabre, feuilles fasciculées, tantôt simples, tantôt trifides ou tripartites, à bords entiers, incisés-dentés ou lobés, fleurs blanches, grandes, penchées, solitaires, entourées d'un involucre en forme de calice monosépale, sépales velus en dehors, glabres en dedans, pétales nuls, réceptacle poilu, carpelles à arête plumeuse. Elle est d'origine méditerranéenne du Portugal et le Maroc jusqu'à l'Asie Mineure ; Himalaya. La floraison de cette plante commence de Mars à Décembre (Tela botanica, 2011).



Fig.4. *Clematis cirrhosa* L. (Joycreek nursery, <https://www.joycreek.com/Clematis-cirrhosa-Wisley-Cream-150-345.htm>)

6.2. Utilisation et propriétés médicinales

Clematis cirrhosa L. est utilisée pour soigner les brûlures. La plante fraîche est utilisée pour traiter la maladie dite bûzelûm (un type de sciatique). (kahouadji, 1995)

CHAPITRE II
MATERIEL ET METHODES

1. Matériel végétal

La récolte de la plante *Clematis cirrhosa* L. a eu lieu en Mars 2021 à Hammam Dalaâ dans la région M'sila (Nord-est de l'Algérie) qui se caractérise par un bioclimat subaride à aride. La plante a été séchée à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant 3 semaines. Après séchage, les feuilles et leurs tiges ont été récupérées, stockées dans des sacs de papier hermétiquement fermés et placées à l'abri de la lumière et de la chaleur jusqu'à utilisation.

2. Procédés d'extraction

2.1. Extraction méthanolique par macération (EM)

La plante a été soumise à une extraction méthanolique par macération, où 500ml de méthanol ont été ajoutés à 50g des parties aériennes broyées et le mélange a été maintenu sous agitation pendant 24h à température ambiante (Fig.5). L'extrait a été filtré à travers du papier Whatman, puis concentré sous vide à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif. Après séchage dans une étuve (40°C), l'extrait méthanolique (EM) sec a été récupéré, pesé et conservé à 4°C jusqu'à son utilisation (Padalia *et al.*, 2017). Le rendement en extrait est exprimé en pourcentage par rapport au poids sec de la plante et est calculé par la formule suivante (Bachiri *et al.*, 2016):

$$\text{Rendement Ext \%} = \text{MExt} / \text{MEch} \times 100$$

Où

MExt: Masse de l'extrait après évaporation du solvant en g.

MEch: Masse de l'échantillon végétal en g.

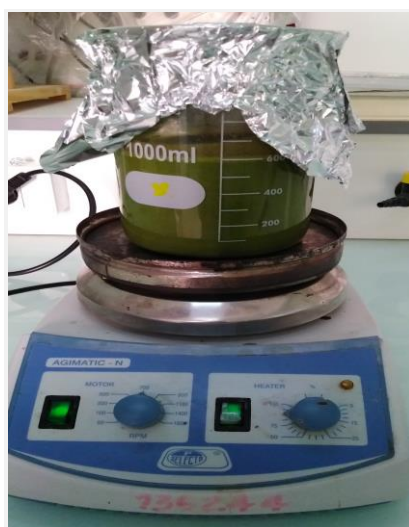


Fig. 5 Dispositifs d'extraction par macération.

3. Dosage des composés phénoliques

3.1. Dosage des polyphénols

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait a été déterminée par la méthode de Folin–Ciocalteu (Maity *et al.*, 2013). Une quantité de 200µl de l'extrait est mélangée avec 1ml du réactif de Folin–Ciocalteu fraîchement préparé (10 fois dilué) et 0.8ml de carbonate de sodium à 7.5% (Na₂ CO₃). L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 30 minutes et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 765nm. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique par g de matière végétale sèche (mg EAG/g d'EM).

3.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes a été évaluée selon la méthode colorimétrique de Makusa and Ningsih (2020), en utilisant comme réactif spécifique le trichlorure d'aluminium (AlCl₃). Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle libre en position susceptible de donner, en présence de chlorure d'aluminium, un complexe jaunâtre par chélation de l'ion Al⁺³. La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans l'extrait. Brièvement, 0.6 ml de la solution d'AlCl₃ (2%) est ajouté à 0.6 ml de la solution de l'extrait à différentes concentrations préparées dans le méthanol. Le mélange est laissé réagir pendant 10 min puis la lecture est faite à 430 nm. La concentration en flavonoïdes dans l'EM est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (µg/ml) et exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'EM) .

4. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante de l'EM a été déterminée par la méthode du DPPH selon le protocole décrit par Sanchez-Moreno *et al.*(2006). En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH, de couleur violette, se réduit en 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine, de couleur jaune. Cinquante microlitres 50 µl de l'extrait en solution méthanolique à différentes concentrations (2; 1 ; 0.5 ; 0.25 ; 0.125 ; 0.06 et 0.03mg/mL) sont ajoutés à 1450µl de la solution méthanolique du DPPH (0.04%). Dans le contrôle l'EM est remplacée par le méthanol. La lecture de l'absorbance est faite à 515 nm, après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante. Pour chaque concentration, le test est répété trois fois. Le butylhydroxytoluène (BHT) est utilisé comme contrôle positif. Le pourcentage d'inhibition du radical libre (I%) est calculé selon la formule:

$$\%I = [1 - (Abs_{test} / Abs_{contrôle})] \times 100$$

Où

%I : pourcentage d'inhibition

Abs_{test} : absorbance de l'échantillon

Abs_{Contrôle}: absorbance du contrôle négatif

La concentration de l'EM entraînant 50% d'inhibition (CI₅₀) est calculée à partir du graphique représentant le pourcentage d'inhibition contre la concentration de l'EM.

5. Evaluation de l'activité antimicrobienne

5.1. Microorganismes testés

Les bactéries soumises à l'action de l'EM de *C. cirrhosa* sont des bactéries de référence disponibles au niveau de laboratoire de microbiologie du département de Microbiologie et Biochimie : des bactéries à G⁺ dont *Bacillus cereus* ATCC10876, *B. subtilis* ATCC9372, *Proteus mirabilis* ATCC35659, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 et *S. epidermidis* ATCC12228; et des bactéries à G⁻ dont *Escherichia coli* ATCC25922, *Klebsiella Pneumoniae* ATCC700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 et *Salmonella typhimurium* ATCC13311.

Les champignons soumis à l'action des mêmes extraits sont des champignons isolés à partir des denrées alimentaires et identifiés par Dr HENDEL et disponibles au niveau du laboratoire de microbiologie du département : c'est les moisissures *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium expansum*, *Cladosporium herbarum*, et la levure de référence *Candida albicans* ATCC10231.

5.2. Préparation de l'inoculum

Les bactéries ont été ensemencées dans un bouillon nutritif et incubées à 37°C/18h. Elles sont ensuite ensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 18h, pour optimiser leur croissance. A l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester sont prélevées et puis déchargées dans de l'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne est bien homogénéisée et son opacité est ajustée à 0.5 de l'échelle de McFarland.

5.3. Activité antibactérienne

Avec un emporte-pièce, des puits de 7mm sont creusés dans la gélose de Mueller-Hinton Agar (MHA) coulée dans des boîtes de Pétri (à trois points équidistants du centre et des bords de la boîte) et ensemencée par écouvillonnage de suspension bactérienne de 10⁷ germes/ml, préparée comme ci-dessus (Biyiti *et al.*, 2004). Dans des conditions aseptiques l'EM a été dissout dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). Deux concentrations de l'extrait ont été préparée dans le méthanol; 300 et 600 mg/ml. Trente µl (30µl) de chaque concentration sont incorporés dans chaque puits.

Une pré-incubation de 1 heure à 4°C a été faite pour que l'extrait puisse diffuser dans le milieu. L'EM a été remplacée par le DMSO dans les témoins a été utilisée comme contrôle positif. Les boîtesensemencées ont été incubées à 37°C pendant 24 heures . Les diamètres d'inhibition prévue sont ensuite mesurés autour des puits (Ben Sassi *et al.*, 2007).

La sensibilité à l'EM a été classée par le diamètre des halos d'inhibition comme suit : résistant ($\emptyset < 08$ mm), sensible ($09 < \emptyset < 14$ mm), très sensible ($15 < \emptyset < 19$ mm) et extrêmement sensible ($\emptyset > 20$ mm) (Ponce *et al.*, 2003).

5.4. Activité antifongique

Le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) a été coulé dans des boîtes de Petri (90mm). Un disque de culture fongique de 7mm (âgée de 07 jours) a été prélevé aseptiquement puis déposé au centre milieu de culture PDA. Dans des conditions aseptiques, des aliquotes de 60µl de l'EM (dissout dans le DMSO à raison de 300 ,600 et 900mg/ml) sont déposés dans des puits préalablement creusés respectivement à la surface du milieu à trois points équidistants du centre et des bords de la boîte de Pétri. L'EM a été remplacé par le DMSO dans les témoins. Les boîtes sont pré-incubées à 4°C pendant une heure pour que l'EM puisse diffuser et ensuite incubées à l'étuve à 25°C pendant 7 jours (Hendel *et al.*, 2016).

Les diamètres des colonies sont enregistrés au septième jour et le taux d'inhibition est mesuré selon la formule:

$$I\% = [(D_c - D_t) / D_c] \times 100$$

Où

I% : Taux d'inhibition de la croissance du mycélium en pourcentage.

D_c : Diamètre de la colonie fongique du témoin (mm)

D_t : Diamètre de la colonie fongique traitée par l'Eth ou l'Aq (mm)

CHAPITRE III
RESULTATS ET DISCUSSION

1. Rendement de la plante

L'opération de l'extraction par macération de *C. cirrhosa* dans le méthanol a permis d'obtenir un résidu sec d'extrait brute qui montre un aspect poudreux, une forte odeur, une couleur verte et un rendement de 16%.

2. Dosage des composés phénoliques de la plante

Les teneurs en polyphénols totaux (TPT) et en flavonoïdes totaux (TFT) de l'EM de *C. cirrhosa* ont été évaluées selon des méthodes colorimétriques utilisant l'acide gallique et la quercétine comme références, respectivement. Les résultats obtenus montrent que la TPT est très élevée par rapport à la TFT de l'EM (Fig.6). Les résultats indiquent aussi que le méthanol est un bon solvant organique et approprié pour l'extraction des composés polyphénoliques. Notre plante contient des teneurs en polyphénols importantes et plus élevées que celles indiquées par [Chohra et al. \(2020\)](#) pour la même espèce poussant à l'est de l'Algérie ($84.05 \pm 0.80\text{mg/g}$); mais moins importantes en flavonoïdes ($114.60 \pm 2.42 \text{ mg/g}$). D'autre part, une plante du même genre en Algérie *Clematis flammula* paraît contenir moins de polyphénols et flavonoïdes dans des extraits organiques et aqueux différents ([Atmani et al., 2009](#)).

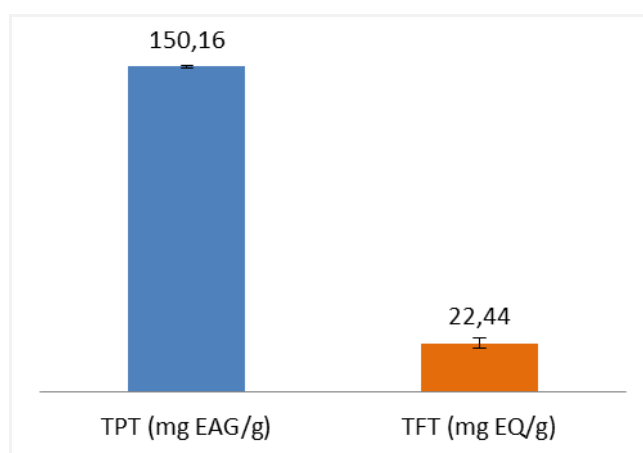


Fig. 6 Teneurs en TPT et en TFT de l'EM de *C. cirrhosa*.

3. Activité antioxydante

3.1. Test de DPPH

Le principe de ce test se résume en la capacité des extraits à réduire le radical libre DPPH de couleur violette foncée, qui se transforme après réduction en coloration jaunâtre. Cette

décoloration est mesurable par spectrophotométrie. L'activité antiradicalaire de l'EM de *C. cirrhosa* et de BHT a été estimée en pourcentage d'inhibition (Fig. 7).

L'extrait de *C. cirrhosa* présente une excellente capacité de piégeage du radical libre DPPH. La CI_{50} est de $56.91 \pm 1.76 \mu\text{g/ml}$. Cette valeur est quatre fois moins importante que celle du contrôle positif BHT qui est de $14.07 \pm 0.16 \mu\text{g/ml}$. D'autre part, notre plante présente une capacité de piégeage du DPPH très élevée par rapport à la même espèce poussant à l'est Algérien qui avait une CI_{50} de $1.98 \pm 0.08 \text{ mg/ml}$ (Chohra *et al.*, 2020). Il est évident que l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *C. cirrhosa* est due à sa teneur élevée en polyphénols et en flavonoïdes; c'était confirmé par les résultats obtenus par Karimi *et al.* (2018). Autre investigations réalisées sur des espèces de *Clematis* par Kirby and Schmidt. (1997) et Atmani *et al.* (2009) ont proclamé que *C. armandii* et *C. flammula* avait des valeurs de CI_{50} relativement élevées, ce qui implique une activité de piégeage du DPPH.

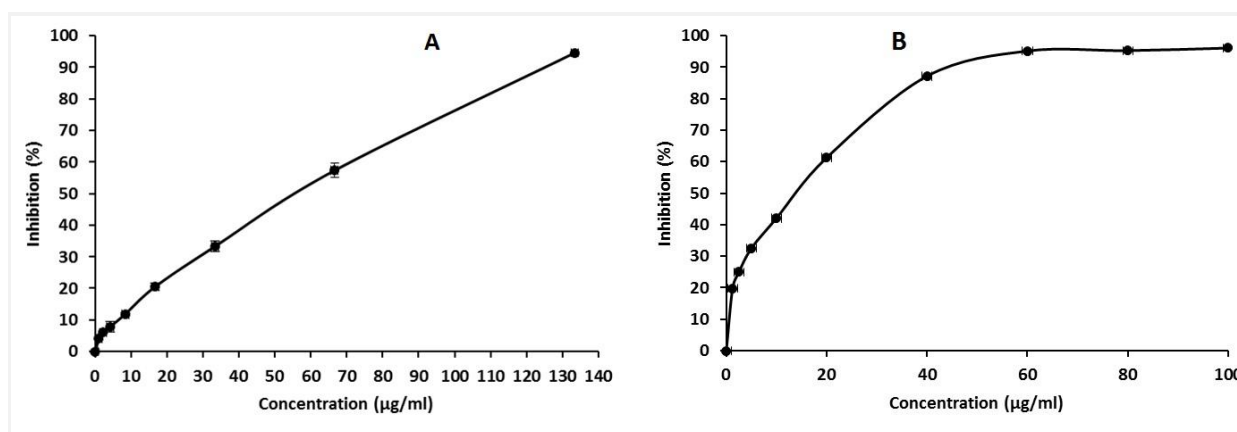


Fig. 7 Pourcentages d'inhibition du DPPH• selon des concentrations de l'EM de *C. cirrhosa* (A) et le BHT (B).

4. Activité antimicrobienne

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antimicrobien de l'EM de *C. cirrhosa* par la méthode des puits de diffusion en milieu MHA. L'activité antimicrobienne de l'extrait a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des puits contenant les extraits à tester vis-à-vis des souches bactériennes. Les résultats obtenus n'ont montré aucun effet inhibiteur sur l'ensemble des bactéries et des moisissures testées ; sachant qu'on a testé 300mg/ml dans un

premier test, puis 600mg/ml dans 2^{ième} test pour tous les microorganismes, et 900mg/ml pour les 02 moisissures *Aspergillus niger* et *Penicillium expansum* comme 3^{ième} tentative (Tableau 1).

Tableau 1- Diamètres des zones d'inhibition illustrant l'activité antibactérienne et antifongique de l'EM (300 ; 600 ; 900 mg/ml) de *C. cirrhosa*.

microorganismes testés	Diamètre de zone d'inhibition (mm)		
	Extrait méthanolique de <i>C. cirrhosa</i> (mg/ml)		
	300	600	900
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	-
<i>Escherichia coli</i>	9	9	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	-
<i>Bacillus cereus</i>	0	0	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	-
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	-
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	-
<i>Salmonella enterica</i>	9	9	-
<i>Candida albicans</i>	8	8	-
<i>Cladosporium herbarum</i>	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0
<i>Penicillium expansum</i>	0	0	0

- : non testée

L'explication qu'on peut donner est que l'extrait méthanolique n'a pas d'effet inhibiteur sur les microorganismes testés malgré l'augmentation de la concentration testée au double et malgré que cet extrait est riche en polyphénols qui sont connus pour avoir un rôle dans l'effet antimicrobien. L'extrait méthanolique n'est peut-être pas diffusible dans le milieu de culture ; ou peut-être les microorganismes sont doués d'une résistance particulière à l'extrait testé.

CONCLUSION

Conclusion

Les extraits naturels issus des plantes contiennent une variété de composés phénoliques et des flavonoïdes auxquels on attribue le pouvoir antioxydant et antimicrobien; ces molécules naturelles de nature phénolique sont très recherchées en phytothérapie vu les effets secondaires des médicaments.

Dans cette étude, la teneur en composés polyphénoliques et l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *Clematis cirrhosa*, une plante spontanée de la région de M'sila, ont été évaluées. Les résultats ont montré une teneur élevée de la plante étudiée en polyphénols par rapport à la même espèce qui pousse à l'est algérien (Souk-Ahras). D'autre part la plante a présenté une activité antioxydante remarquable par son effet antiradicalaire élevé sur le DPPH. Néanmoins, la plante a présenté un effet antimicrobien très faible, voire nul, et ce par la technique des puits de diffusion sur des souches bactériennes, une levure et des moisissures d'intérêt économique.

Enfin, d'autres recherches peuvent être menées pour l'évaluation d'autres extraits ou huile essentielle, ainsi que rechercher dans d'autres activités biologiques intéressantes telles que l'activité anticancéreuse, anti-inflammatoire, antidiabétique etc.

REERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Al-Laith, A. A. A. (2010). Antioxidant components and antioxidant/antiradical activities of desert truffle (*Tirmania nivea*) from various Middle Eastern origins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(1), 15-22.
2. Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., ... & Atmani, D. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 112(2), 303-309.
3. Bachiri, L., Echchegadda, G., Ibjibijen, J., & Nassiri, L. (2016). Etude phytochimique et activité antibactérienne de deux espèces de Lavande Autochtones Au Maroc: «*Lavandula stoechas* L. et *Lavandula dentata* L.». *European Scientific Journal*, 12(30), 313-333.
4. Berlencourt Aude., 2008-2013. Huiles essentielles – Aromathérapie Historicalreview of medicinal plants' : 10.4103/0973-7847.95849) .D
5. Beutler, L. The Rogerson Clematis Collection: Where Every Garden Tells a Story; Pacific Horticulture Society: Berkeley, CA, USA, 2014.
6. Biyiti, L. F., Meko'o, D. J. L., Tamzic, V., & Amvam Zollo, P. H. (2004). Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales camerounaises. *Pharm. Med. Trad. Afr*, 13, 11-20.
7. Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Guy, P., Larpent, J. P., & Veau, P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle.. Masson 1990. 2e ed. revue et complétée. 512p
8. Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., & Dakka, N. (2017). Screening phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'*Origanum compactum*. *Phytothérapie*, 15(6), 379-383.
9. Bouzouita, N., Kachouri, F., Ben Halima, M., & Chaabouni, M. M. (2008). Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 10, 119-125.
10. Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3ème éd. *Lavoisier, Paris*, 1120.
11. Chabrier, J. Y. (2010). *Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie* (Doctoral dissertation, UHP-Université Henri Poincaré).
12. Cheyner, V., Fulcrand, H., Sarni, P., & Moutounet, M. (1997). Application des techniques analytiques à l'étude des composés phénoliques et de leurs réactions au cours de la vinification. *Analisis*, 3(25), M14-M21.
13. Chohra, D., Ferchichi, L., Cakmak, Y. S., Zengin, G., & Alsheikh, S. M. (2020). Phenolic profiles, antioxidant activities and enzyme inhibitory effects of an Algerian medicinal plant (*Clematis cirrhosa* L.). *South African Journal of Botany*, 132, 164-170.
14. Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 74(3), 417-433.
15. De Duve, C. (1965). Functions of microbodies (peroxisomes). *J. Cell Biol.*, 27, 25A-26A.
16. Decaux, I. (2002). Phytothérapie: mode d'emploi. *Le Bien Public*, 6-7.
17. Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., & Capasso, F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences*, 65(4), 337-353.
18. Dworkin M, F. S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., & Stackebrandt, E. (2006). *The Prokaryotes-A Handbook on the Biology of Bacteria, Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*.
19. Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition research*, 24(10), 851-874.
20. Halliwell, B. (1995). Antioxidant characterization: methodology and mechanism. *Biochemical pharmacology*, 49(10), 1341-1348..
21. Halliwell, B. (1996). Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathologie-biologie*, 44(1), 6-13.

22. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1989). Free radicals in biology and medicine, Clarendon.
23. Hendel, N., Larous, L., & Belbey, L. (2016). Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its in vitro inhibitory effect on *Penicillium digitatum*. *International Food Research Journal*, 23(4), 1725.
24. ISERIN, P. (1996). Plantes de l'appareil cardio-vasculaire. *Phytotherapy (Paris)*, (44), 11-12.
25. Janssen, A. M., Scheffer, J. J. C., & Svendsen, A. B. (1987). Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta medica*, 53(05), 395-398.
26. Joycreek nursery, <https://www.joycreek.com/Clematis-cirrhosa-Wisley-Cream-150-345.htm>
27. Karimi, E., Ghorbani Nohooji, M., Habibi, M., Ebrahimi, M., Mehrafarin, A., & Khalighi-Sigaroodi, F. (2018). Antioxidant potential assessment of phenolic and flavonoid rich fractions of *Clematis orientalis* and *Clematis ispanhanica* (Ranunculaceae). *Natural product research*, 32(16), 1991-1995.
28. Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., & Zinkernagel, R. M. (2005). Medical microbiology.
29. Kirby, A. J., & Schmidt, R. J. (1997). The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of placebo herbs—I. *Journal of ethnopharmacology*, 56(2), 103-108.
30. Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.
31. Kulawik, P., Özogul, F., Glew, R., & Özogul, Y. (2013). Significance of antioxidants for seafood safety and human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(3), 475-491.
32. Levy, S. B. (1992). The antibiotic paradox. *how miracle drugs are destroying the miracle*.
33. Maity, S., Chatterjee, S., Variyar, P. S., Sharma, A., Adhikari, S., & Mazumder, S. (2013). Evaluation of antioxidant activity and characterization of phenolic constituents of *Phyllanthus amarus* root. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(14), 3443-3450.
34. Makuasa, D. A. A., & Ningsih, P. (2020). The Analysis of Total Flavonoid Levels In Young Leaves and Old Soursop Leaves (*Annona muricata* L.) Using UV-Vis Spectrofotometry Methods. *Journal of Applied Science, Engineering, Technology, and Education*, 2(1), 11-17.
35. Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J., & Nacoulma, O. G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food chemistry*, 91(3), 571-577.
36. Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual review of biochemistry*, 52(1), 711-760.
37. Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751.
38. Moon, J. K., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1655-1666.
39. Nordberg, J., & Arnér, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology and medicine*, 31(11), 1287-1312.
40. Ouis, N. (2015). Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, des fenouils et de persil. *Diss. Thèse de doctorat, Université Ahmed Ben Bella-Oran, Alger*.
41. Padalia, H., Rathod, T., Moteriya, P., & Chanda, S. (2017). Antimicrobial efficacy of *Cinnamomum verum* essential oil alone and in combination with antibiotics and other essential oils. *Int J Curr Microbiol Appl*, 6(11), 3377-3395.
42. Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Gonçalves, M. J., Costa-de-Oliveira, S., Cavaleiro, C., ... & Martinez-de-Oliveira, J. (2006). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of medical microbiology*, 55(10), 1367-1373.
43. Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., & Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils

- on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*, 36(7), 679-684.
44. Prescrire., 2007 . (2007). Bien utiliser les plantes en situation de soins. *Rev Prescrire*, 27, 288.
 45. Roberts, C. K., & Sindhu, K. K. (2009). Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life sciences*, 84(21-22), 705-712.
 46. Salgueiro, P., Carvalho, G., Collares-Pereira, M. J., & Coelho, M. M. (2003). Microsatellite analysis of genetic population structure of the endangered cyprinid *Anaocypris hispanica* in Portugal: implications for conservation. *Biological Conservation*, 109(1), 47-56.
 47. Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270-276.
 48. Sassi, A. B., Harzallah-Skhiri, F., & Aouni, M. (2007). Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities. *Pharmaceutical biology*, 45(5), 421-428.
 49. Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (1999). Singlet oxygen toxicity is cell line-dependent: a study of lipid peroxidation in nine leukemia cell lines. *Photochemistry and photobiology*, 70(6), 858-867.
 50. Tela-botanica.https://www.tela-botanica.org/eflore/?referentiel=bdtfx&module=fiche&action=fiche&num_nom=18193&onglet=synthese.
 51. Turner, M. (2011). Germany learns from E. coli outbreak.
 52. Uthurry, C. A., Hevia, D., & Gomez-Cordoves, C. (2011). Role of honey polyphenols in health. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 3(4), 141-159.
 53. Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology*, 7(1), 65-74.
 54. Vârban, D., Duda, M., Varban, R., & Muntean, S. (2009). Research concerning the organic technology for *Satureja hortensis* L. culture. *Bulletin UASVM Agriculture*, 66, 2.
 55. Vauzour, D. (2012). Dietary polyphenols as modulators of brain functions: biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012.
 56. Volak J. & Stodola J. (1984) : Plantes médicinales. 256 illustrations en couleurs. Published by Grund. Coll. La nature à livre ouvert. 399p.
 57. Wang, L., Yen, J. H., Liang, H. L., & Wu, M. J. (2003). Antioxidant effect of methanol extracts from lotus plumule and blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn.). *Journal of food and drug Analysis*, 11(1), 3.
 58. Wichtl, M., Anton, R., Bernard, M., & Czygan, F. C. (1999). *Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*. Tec & Doc; Ed. médicales internationales.
 59. Williamson, E. M. (2001). Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*, 8(5), 401-409.
 60. Zhang, L. J., Huang, H. T., Huang, S. Y., Lin, Z. H., Shen, C. C., Tsai, W. J., & Kuo, Y. H. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory phenolic glycosides from *Clematis tashiroi*. *Journal of natural products*, 78(7), 1586-1592.

ANNEXES

Annexe I

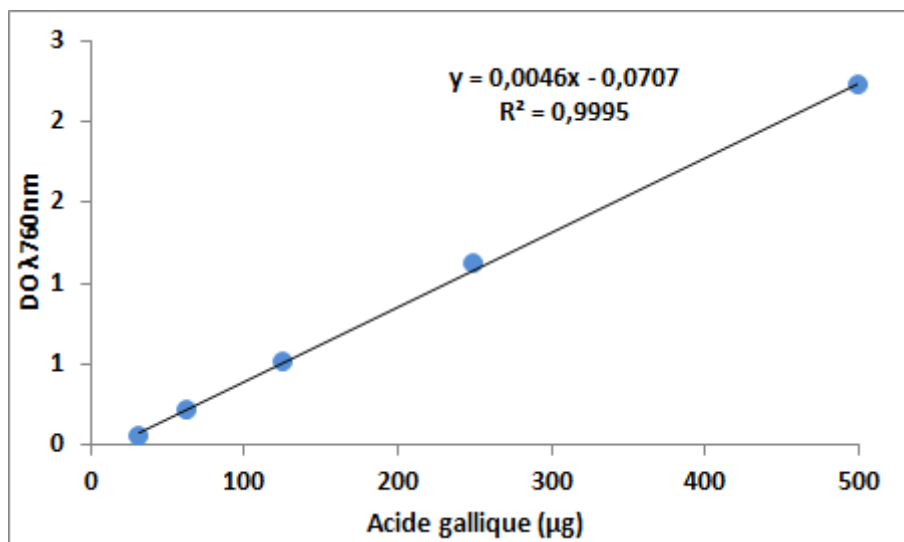


Figure 1. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

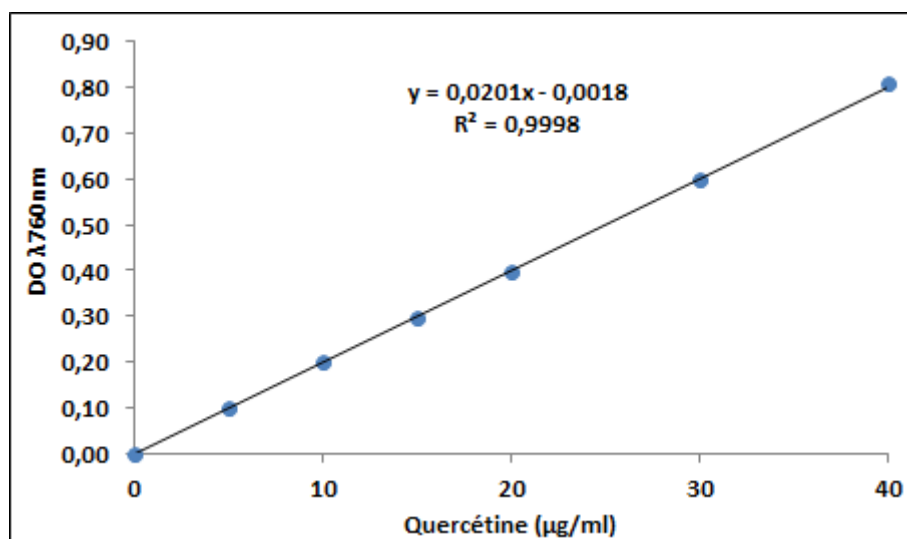


Figure 2. Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.

Annexe 2**Milieux de culture utilisés****• Bouillon nutritif (BN) (g/l)**

Peptone	10 g
Extrait de viande	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7.3

• Gélose nutritive (GN) (g/l)

Peptone	10 g
Extrait de viande	3 g
Extrait de levure	3 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	18 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7.3

• Mueller Hinton gélosé (M-H) (g/l)

Extrait de viande	3 g
Hydrolysate acide de caséine	17.5 g
Amidon	1.5 g
Agar	16 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7.3

• Potato Dextrose Agar (PDA) (g/l)

Filtrat de pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH	5.6

Annexe 3

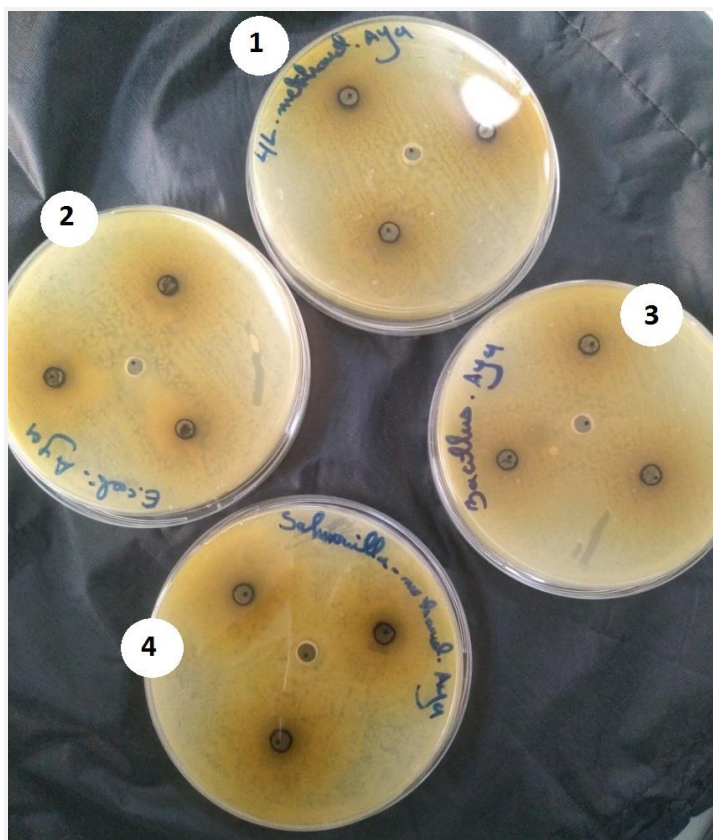


Figure 3. Photos représentant l'effet antimicrobien de l'EM de *Clematis cirrhosa* vis-à-vis des bactéries (1- *P. mirabilis*, 2- *E. coli*, 3- *B. subtilis*, 4- *S. enterica*) par la méthode des puits de diffusion.

L. cirrhosa هو نبات طبي ينتمي إلى عائلة Ranunculaceae يستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي للألم الروماتيزمي وكعامل مدر للبول. الهدف من هذا العمل هو تحديد محتوى المستخلص الميثانولي (ME) في المركبات الفينولية لهذا النبات ، وكذلك تقييم نشاطاته المضادة للأكسدة والبكتيريا والفطريات. كان موضوع هذه الدراسة هو نيبتة *C. cirrhosa* التي تم جمعها من منطقة حمام الظلعة بولاية المسيلة. كان مردود استخلاص الميثانول بالنقع 16% (ك/ك). تم تحديد محتويات البوليفينول الكلي (TPT) والفلافونويد الكلي (TFT) بواسطة طريقة Folin-Ciocalteu و ثلاثي كلوريد الألومنيوم. تم تحقيق النشاط المضاد للأكسدة عن طريق اختبار DPPH وتم تحديد C₅₀ للمستخلص. تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات لـ 09 سلالة بكتيرية (G⁺ و G⁻) و 04 فطريات بطريقة أبار الانتشار. كانت محتويات ME للبوليفينول والفلافونويد 150.16 ميكروغرام EAG / ملغ و 22.439 ميكروغرام EQ / ملغ على التوالي. يبلغ معدل IC₅₀ DPPH 1.685 مجم / مل. تظهر هذه النتائج أن ME من *C. cirrhosa* لها نشاط مضاد للأكسدة معتبر ، غني بالمركبات الفينولية والفلافونويدات. كان للمستخلص تأثير ضئيل أو معدوم في مضادات الميكروبات.

كلمات مفتاحية:- مستخلص ميثانولي ، نشاط مضاد للأكسدة ، نشاط مضاد للميكروبات ، *Clematis cirrhosa* L. ، *Ranunculaceae*.

Abstract

Clematis cirrhosa L. is a medicinal plant belonging to the Ranunculaceae family. It is widely used in traditional medicine for rheumatic pain and as a diuretic agent. The aim of this work is to determine the content of the methanolic extract (ME) in phenolic compounds of this plant, as well as to evaluate its antioxidant, antibacterial and antifungal activities. *C. cirrhosa* collected from Hammam Dalaa in the wilaya of M'sila was the subject of this study. The yield of methanolic extraction by maceration was 16% (m / m). The contents of total polyphenols (TPT) and total flavonoids (TFT) were determined by the method of Folin-Ciocalteu and aluminum trichloride. Antioxidant activity was achieved by the DPPH test and the extract's C₅₀ was determined. The antimicrobial activity was evaluated for 09 bacterial strains (G⁺ and G⁻) and 04 fungi, by the diffusion wells method. The contents of ME for polyphenols and flavonoids were 150.16 µg EAG / mg and 22.439 µg EQ / mg respectively. The IC₅₀ for DPPH is 1.685 mg / ml. These results show that the MEs of *C. cirrhosa* have greater antioxidant activity, rich in phenolic compounds and flavonoids. The extract had little or no antimicrobial effect.

Key words - *Clematis cirrhosa* L. Ranunculaceae, methanolic extract, antioxidant activity, antimicrobial activity.

Résumé

Clematis cirrhosa L. est une plante médicinale appartenant à la famille des *Renonculacées*. Elle est largement utilisée en médecine traditionnelle pour les douleurs rhumatismales et comme agent diurétique. Le but de ce travail est de déterminer la teneur de l'extrait méthanolique (EM) en composés phénoliques de cette plante, ainsi que d'évaluer ses activités antioxydante, antibactérienne et antifongique. *C. cirrhosa* collectée de Hammam Dalaa de la wilaya de M'sila a fait l'objet de cette étude. Le rendement de l'extraction méthanolique par macération était de 16% (m/m). Les teneurs en polyphénols totaux (TPT) et en flavonoïdes totaux (TFT) a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu et le trichlorure d'aluminium. L'activité antioxydante a été réalisée par le test de DPPH et l'C₅₀ de l'extrait a été déterminée. L'activité antimicrobienne a été évaluée, pour 09 souches bactériennes (G⁺ et G⁻) et 04 champignons, par la méthode des puits de diffusion. Les teneurs de l'EM en polyphénols et flavonoïdes étaient 150.16 µg EAG/mg et 22.439 µg EQ/mg respectivement. L'IC₅₀ de DPPH est 1.685 mg/ml. Ces résultats montrent que les l'EM de *C. cirrhosa* possède une activité antioxydante plus importante, riche en composés phénoliques et flavonoïdes. L'extrait avait un effet antimicrobien faible voire nul.

Mots clés - *Clematis cirrhosa* L. *Renonculacées*, extrait méthanolique, activité antioxydante, activité antimicrobienne.