



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 : Biochimie appliquée

Réf. : .....

---

Présenté et soutenu par :  
RAHMANI Meryem et CHAIB Hadjer  
Le : mercredi 21 octobre 2020

## Thème

# Etude de l'activité antioxydants et antimicrobienne des extraits de *Morus nigra*

---

### Jury :

Dr. BOUCIF ASMA	MCB	Université de Biskra	Président
Dr. BENHARZALLAH NAOUEL	MCB	Université de Biskra	Rapporteur
Dr. CHOUIA AMEL	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2019 - 2020

# Remerciements

*Tout d'abord Dieu merci d'avoir donné à l'homme le pouvoir de raisonner et d'exploiter les vérités de l'univers et le tout puissant qui nous a donné la patience, la force et le courage pour pouvoir mener à terme ce travail.*

*Merci infiniment à notre encadreur **Naouel Benharzallah**, enseignante dans la département de la biologie à l'université de MOHAMED KHEIDER BISKRA pour tout ce qui a fait afin que nous finissions ce travail dans le délai prévu. Pour tous les conseils et l'attention que vous avez donnés tout au long de cet article. Sa gentillesse, sa simplicité et sa compassion, nous sommes très honorés d'avoir eu l'opportunité de travailler avec elle.*

*Merci aux membres du jury d'avoir examiné notre mémoire et évaluer notre travail. Pour leurs présences nécessaires et utiles au sein du jury. Et la confiance qu'ils nous ont accordée tout au long de ce parcours.*

*Sans oublier de remercier vivement les membres de l'équipe laborantine.*

*Nous remercie tous les travailleurs de la bibliothèque sur ce qu'ils ont données l'aide, et à tous ceux qui contribué à atteindre ce modeste travaille de près ou de loin, même dit bon mot.*

*Nous remercie aussi tous mes collègues et la promotion.*

*Mes remerciements vont également à tous mes enseignants, pour les informations et les aides au coures des années de mes études, surtout les enseignants du département de biologie.*

*Merci.....*

## Dédicace

*Je dédie ce travail à mon père et ma mère,  
qui sont responsables de m'élever et de  
m'éduquer depuis le début de ma vie, Pour leur  
soutien tout le long de mes études :*

*A ma Sœur et mes Frères*

*À mes Amis*

*A mes professeurs ♥,*

*A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour.*

*Meryem*

## Dédicace

*Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds,  
Je dédie ce modeste travail :*

*A mes très chers parents, sans eux je ne suis pas pu être  
ce que je suis, en reconnaissance de leurs efforts, leurs  
encouragements durant toutes mes études et mes  
recherches,*

*A mes professeurs ♥,*

*A mes chers frères et sœurs ♥,*

*A tous ceux qui m'aiment ♥... qui supporte moi*

*Que Dieu le tout puissant vous procure continuellement  
santé, bonheur et tranquillité.*

***Hadjer***

# Table des matières

**Remerciements**

**Dédicace**

**Table des matières ..... I**

**Liste des Tableaux ..... II**

**Liste des Figures ..... III**

**Liste des abréviations..... IV**

**Introduction générale ..... 1**

## **Chapitre 1: Synthèse bibliographique**

1.1. Plant médicinales ..... 3

1.1.1. Etymologie ..... 3

1.1.2. Définition ..... 3

1.1.3. Description botanique de la plante ..... 3

1.1.4. La Classification scientifique de Morus nigra ..... 4

1.1.5. Les propriétés médicinales de Morus nigra ..... 4

1.2. Composés phénoliques ..... 5

1.2.2. Flavonoïde..... 6

1.3. Activités biologiques ..... 7

1.3.1. Activité antioxydant ..... 7

1.3.1.1. Radicaux libre..... 8

1.3.1.2. Définition antioxydant ..... 8

a. Antioxydants primaires ..... 8

b. Antioxydants secondaire ..... 9

1.3.1.3. Stress oxydatif ..... 9

1.3.2. Activité antibacterienne ..... 9

1.3.2.1. Généralité ..... 9

1.3.2.2. Infections bactériennes..... 9

1.3.2.3. Rappel sur les bactéries..... 10

1.3.2.4. Résistance bactérienne aux antibiotiques.....	10
1.3.2.5. Micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiens .....	11
a. Escherichia coli.....	11
b. Staphylococcus aureus .....	11
C .Pseudomonas aeruginosa .....	11

## **Chapitre 2: Matériel et méthodes**

<b>2.1. Matériel .....</b>	<b>13</b>
2.1.1. Matériel végétal.....	13
2.1.2. Matériel de laboratoire.....	13
2.1.2.1. Réactifs.....	13
2.1.2.2. Instrument et appareillage .....	13
2.1.3. Souches bactériennes .....	14
<b>2.2. Méthodes .....</b>	<b>14</b>
2.2.1. Préparation des extraits bruts .....	14
2.2.2. Calcul du rendement.....	15
2.2.3. Dosage des composés phénoliques.....	16
2.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux .....	16
a. Numérotation principe .....	16
b. Numération mode opératoire .....	16
2.2.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	16
a. Numérotation principe .....	16
b. Numérotation mode opératoire .....	17
<b>2.2.4. Evaluation de l'activité antioxydant des extraits in vitro. ....</b>	<b>17</b>
2.2.4.1. Test de piégeage du radical libre DPPH .....	17
a. Numérotation principe .....	17
b. Numération mode opératoire.....	18
2.2.5. Activité antibactérienne .....	19
2.2.5.1. Préparation du milieu de culture .....	19
a. Préparation de gélose nutritive.....	19
b. Préparation du milieu de culture.....	19
2.2.5.2. Stérilisation du matériel .....	20

2.2.5.3. Préparation des dilutions d'extraits de morus nigra.....	20
2.2.5.4. Préparation d'inoculum.....	20
2.2.5.5. Ensemencement.....	20
2.2.5.6.préparation des disques.....	20

### **Chapitre 3: Résultats et discussions**

3.1. Rendement .....	22
3.1.1. Rendement de l'extraction .....	22
3.2. Dosage des polyphénols et des flavonoïde .....	22
3.2.1. Tenur en polyphénols totaux .....	22
3.2.2. Teneur en flavonoïdes.....	24
3.3. Evaluation de l'activité antioxydants par test DPPH .....	25
3.3.1. Évaluation saisonnière de l'activité antioxydante par le test DPPH.....	25
3.3.2. Evaluation de l'activité antioxydante à l'aide de plusieurs solvants d'extraction .....	26
3.3.3. Évaluation de l'activité antioxydante à l'aide d'extraits d'éthanol .....	27
3.3.4. Évaluation de l'activité antioxydante à l'aide des concentrations de vitamine C .....	28
3.4. L'activité antibactérienne .....	30
3.4. 1.L'activité antibactérienne du morus nigra par zone d'inhibition avec des antibiotique sélectionnés.....	30
3.4.2. L'activité antibactérienne du morus nigra par zone d'inhibition et solvants d'extraction .....	32
a. Analyse des antibiogrammes.....	33
3.4.3. Activité antimicrobienne des feuilles d'acétate d'éthyle et d'acétone extraits de Morus nigra avec antibiotique .....	34
3.4.4. Activité antibactérienne des extraits de Morus nigra à l'aide de plusieurs solvants ...	36
<b>Conclusion.....</b>	<b>38</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>40</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>50</b>
<b>Résumés.....</b>	<b>54</b>

# Liste des Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Classification scientifique de morus nigra.....	4
<b>Tableau 2.</b> Les principales classes des composés phénoliques.....	6
<b>Tableau 3.</b> Résumé les références des souches bactériennes utilisées dans l'activité antibactérienne. ....	14
<b>Tableau 4.</b> Évaluation de l'antioxydant par différents méthode .....	18
<b>Tableau 5.</b> Activité antioxydante des extraits de feuilles de Morus nigra L. ....	27
<b>Tableau 6.</b> Comparaison de l'activité antibactérienne du murier noir (morus nigra ) .....	31
<b>Tableau 7.</b> Zone d'inhibition d'extraits de morus nigra contre les pathogènes bactérienne ..	33
<b>Tableau 8.</b> Zone d'inhibition des antibiotiques contre les bactéries .....	34
<b>Tableau 9.</b> Activité antibactérienne de l'acétate d'éthyle et des extraits de feuilles d'acétone des plantes.....	35
<b>Tableau 10.</b> Activité antibactérienne des extraits éthanoliques (EtOH), hexane, chloroforme (CHCl <sub>3</sub> ) et acétate d'éthyle (AcOEt) des feuilles de Morus nigra. ....	37



# Liste des Figures

<b>Figure 1.</b> Feuille de morus nigra .....	3
<b>Figure 2.</b> Fruit de morus nigra.....	4
<b>Figure 3.</b> Structure chimique des flavonoïdes.....	7
<b>Figure 4.</b> Anatomie d'une bactérie .....	10
<b>Figure 5.</b> Aspect morphologique des micro-organismes étudiés .....	12
<b>Figure 6.</b> Protocole de préparation de l'extrait brut.....	15
<b>Figure 7.</b> Changement de couleur du à une réduction du molybdate d'ammonium(Jaune) avec le noyau phénol du CFR (Bleu) .....	16
<b>Figure 8.</b> Réaction entre $AlCl_3+$ et les flavonoïdes .....	17
<b>Figure 9.</b> Forme libre et réduite du DPPH.....	18
<b>Figure 10.</b> Ensemencement bactérien.....	20
<b>Figure 11.</b> Histogramme du rendement de l'extrait éthanolique brut de morus nigra.....	22
<b>Figure 12.</b> Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	23
<b>Figure 13.</b> Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes .....	25
<b>Figure 14.</b> Valeurs saisonnières de la CI50 M. nigra dans le test DPPH.....	26
<b>Figure 15.</b> Activités d'élimination des radicaux DPPH d'extraits à l'éthanol pour le mûrier étudié laisse des espèces.. .....	28
<b>Figure 16.</b> Relation entre les concentrations de vitamine C et pourcentage d'inhibition de la DPPH.....	29
<b>Figure 17.</b> Relation entre les concentrations de mûrier noir extrait et pourcentage d'inhibition de la DPPH.....	30
<b>Figure 18.</b> Comparaison de l'activité antibactérienne du noir mûrier avec des antibiotiques standard (Gram positif). .....	31
<b>Figure 19.</b> Comparaison de l'activité antibactérienne du noir mûrier avec des antibiotiques standard (Gram négatif). .. .....	32
<b>Figure 20.</b> Activité antimicrobienne des feuilles d'acétate d'éthyle et d'acétone extraits de Morus nigra.....	35

# Liste des abréviations

**AcOEt** : Acétate d'éthyle

**AlCl<sub>3</sub>** : Trichlorure d'aluminium

**AMP** : Ampicilline

**ATB** : Antibiotique.

**BHA** : Butyl hydroxyanisole.

**BHT** : Butylhydroxytoluène

**C** : Chlorophicol

**CHCl<sub>3</sub>** : Chloroforme

**CI<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice 50 %.

**CIP** : Ciprofloxiin.

**CMB** : Concentration minimale bactéricide .

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice.

**CN** : Gentamicine

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde.

**DO** : Densité optique

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

**E** : Erythromycine

**E.coli** : Escherichia Coli.

**EAG** : Equivalent d'acide gallique

**EEF** : Extrait éthanolique feuille.

**EQ** : Equivalent en quercétine.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène

**M.nigra** : Morus nigra

**MeOH** : Méthanol

**Mg**: Milligramme

**MH** : Mueller Hinton

**Mn-EtOH** : Ethanol

**N** : Néomycines

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : Solution de carbonate de sodium

**Nm** : Nanomètre.

**NO** : monoxyde d'azote

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : Anion superoxyde

**O<sub>2</sub>** : Oxygène

**OMS** : Organisation mondiale de la Santé.

**Onoo<sup>-</sup>** : Peroxynitrite

**R<sup>2</sup>** : Coefficient de corrélation.

**Ros** : Espèce Réactive de l'Oxygène

**BLSE** : β- lactamases Spectre Etendue.

**TE** : Tétracycline

**UV**: Ultraviolet

**µg** : Microgramme

**µl** : Microlitre

**µm** : Micromètre

# **Introduction générale**

Depuis plusieurs années, l'utilisation des plantes médicinales ou des préparations à base des plantes connaît un succès croissant. Ainsi, d'après les estimations, 80% de la population mondiale dépend principalement de la médecine traditionnelle (OMS, 2012). Une analyse des prescriptions médicales menée aux Etats unis entre 1959 et 1980 a montré que 25% d'entre elles contenaient un principe issu du règne végétale (Farnsworth, 1988), tandis que environ 60% de prescriptions en Europe proviennent directement ou indirectement des plantes (wafa ghnimi, 2015).

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives (Ferrari, 2002).

Les plantes peuvent être considérées comme des bibliothèques de petites molécules de métabolites secondaires des composés organiques avec une diversité structurale qui, autrement, ne pourrait pas être disponibles dans un laboratoire de synthèse chimique (Bindseil et al., 2001; Koehn et Carter, 2005).

Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie, en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie, parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les lignanes, les terpènes et les flavonoïdes (Bahorun, 1997).

L'évaluation des propriétés anti-oxydantes, et antimicrobiennes demeure une tâche très intéressante et utile pour l'utilisation plus au moins fréquente dans les traditions locales médicinales et culinaires. Ces plantes représentent une nouvelle source des composés bioactifs. (makhlofi, 2010). Une grande partie des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antioxydantes, antimicrobiennes et de valoriser leurs effets thérapeutiques comme les vitamines, les caroténoïdes et les polyphénols.

*Morus nigra*, connu sous le nom de «mûrier noir» est utilisé en médecine populaire (en particulier en médecine chinoise) pour traiter le diabète, l'hypertension, l'anémie et l'arthrite. En outre, les fruits du mûrier noir sont utilisés pour traiter les lésions buccales en Turquie. Récemment, les mûres noires ont acquis une position importante dans l'industrie alimentaire.

Le *mûrier noir* est riche en phénols et est donc utilisable dans le traitement de l'acné. Il contient également de l'anthocyanine, un antioxydant bien connu.

C'est dans ce contexte que notre étude vise à examiner les propriétés antibactériennes et antioxydant de l'extrait des feuilles de mûrier noir (*Morus nigra L.*).

Dans la première partie, nous abordons les différentes connaissances bibliographiques sur la plante, les métabolites secondaires ainsi que sur le stress oxydant.

Nous développerons dans la deuxième partie le matériel et l'ensemble des techniques et méthodes utilisées pour l'extraction, le dosage colorimétrique (des polyphénols, des flavonoïdes) nous tenons à souligner que ce travail s'est déroulé au sein des laboratoires du département de Biologie de l'université Med Kheider durant les mois de février et mars de l'année 2020. Nous abordons également le matériel utilisé dans l'étude de l'activité antioxydante et antibactérienne traitée dans la partie synthèse d'article.

Nous présenterons dans la troisième partie les résultats et la discussion du dosage calorimétrique (des polyphénols, des flavonoïdes). Cependant les résultats et la discussion de l'activité anti-oxydantes et l'activité antimicrobienne sont traités sous forme de synthèse d'articles à cause de la pandémie mondiale due au covid19 et de l'impossibilité de mener des recherches pressenties.

Une conclusion générale est donnée à la fin du présent travail à partir des principaux résultats obtenus. Ces derniers pourraient stimuler d'autres travaux de recherche dans le sens de servir et de valoriser le patrimoine national dans le domaine des plantes médicinales.

**Chapitre 1**  
**Synthèse bibliographique**

## 1.1. Plant médicinales

### 1.1.1. Etymologie

*Morus* en latin et *morea* en grec sont les noms de l'arbre. *Morum* en latin et *moron* en grec désignent le fruit. Ces termes semblent empruntés à la racine celtique « mor » signifiant noir, certains étymologistes rapportent l'origine du nom à l'autre sens du latin *mora* : délai retar, Le murier noir ne débourrant ses bourgeons que tardivement (Nicole et François, 2013).

### 1.1.2. Définition

Le *mûrier noir* (*Morus nigra*) est une espèce d'arbre fruitier originaire d'Asie occidentale et naturalisé en Amérique du nord (Canada, États-Unis), en Europe et en Chine et appartenant à la famille des Moracées (Lucas et Jardinier, 2013 ; Site Web1).

### 1.1.3. Description botanique de la plante

Le *mûrier noir* est un arbre monoïque à croissance lente pouvant atteindre jusqu'à 20 mètres de hauteur. Ses feuilles caduques de 15 cm de long sont cordiformes, alternes, glabres ou légèrement pubescentes au revers de la feuille. Auto-fertile, il fleurit au printemps sous forme de chatons qui donnent des fruits comestibles d'environ 25 mm de long, très tachant qui arrivent à maturité entre juillet et août. Ils doivent être consommés rapidement car ils sont rapidement périssables. D'une grande longévité, le mûrier noir peut vivre jusqu'à 120 ans. Par la suite, il n'est pas rare que l'arbre se fende en deux sous le poids des branches charpentières. L'arbre peut survivre ainsi mais le plus souvent apparaissent des rejets à la base de l'arbre (Lucas et Jardinier, 2013).



**Figure 1.** Feuille de *Morus nigra* (Nicole et François, 2013).





**Figure 2.** Fruit de *Morus nigra* (Nicole et François, 2013).

#### 1.1.4. La Classification scientifique de *Morus nigra*

**Tableau 1.** Classification scientifique de *Morus nigra* (Benjamin Lisan).

Règne	Plante
Sous-règne	Magnoliophyta
Division	Magnoliopsida
Ordre	Urticales
Famille	Moracées
Genre	<i>Morus</i>
Espèce	<i>Nigra</i>

#### 1.1.5. Les propriétés médicinales de *Morus nigra*

Les feuilles de *mûrier noir* sont parfois employées en infusion contre le diabète, afin de diminuer ou stopper la glycosurie (sucre dans les urines). Les fruits avant leur maturité sont astringents et très acidulés. On employait ce jus contre la diarrhée, la dysenterie, les crachements de sang, les règles trop abondantes. On prépare les fruits récoltés avant complète maturité, un sirop utilisée en gargarismes contre les maux de gorge ou comme boisson rafraîchissante (Site Web2).

## 1.2. Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires qui constituent un des groupes le plus représenté et largement distribué dans le monde végétal avec plus de 8000 structure sphénoliques (Ramla, 2017). L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction: éther, ester, hétéroside (Engonga et Clément, 2009). Ils sont synthétisés par l'ensemble des végétaux et ils participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques (agents pathogènes, blessures, symbiose) ou abiotiques (lumière, rayonnements UV, faible température, carences). Les polyphénols contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume), (Boubekri, 2014). Ils sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les phénols simples, déchets du métabolisme végétal, sont assemblés en polyphénols comme la lignine. Il y a quatre principales familles de composés phénoliques : les acides phénols, les flavones, les anthocyanes, les tanins (Engonga et Clément, 2009).

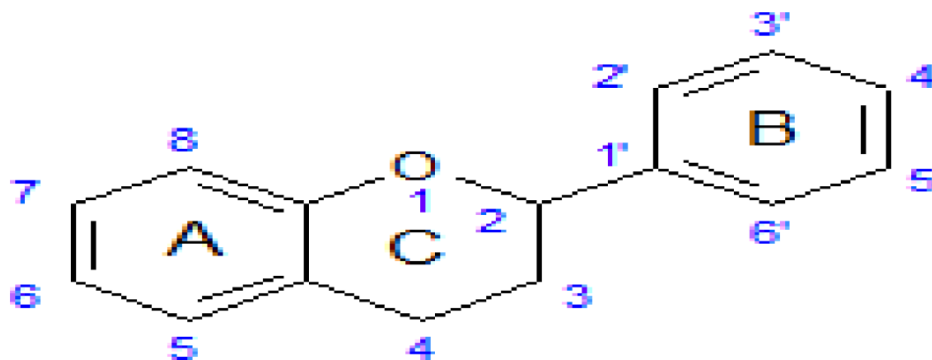
**Tableau 2.** Les principales classes des composés phénoliques (Boubekri, 2014).

<b>Squelette carboné</b>	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C6	Phénols simple	Catéchol	
C6-C3	Acides hydroxybenzoïques	P-Hydroxybenzoïques	Epices, fraise
<b>C6-C3</b>	Acides hydroxycinnamique	Acide caféique, acide Férulique Scopolétine, esculétine	Pomme de terre, pomme
	Coumarines		Citrus
<b>C6-C2-C6</b>	Silènes	Resvératrol	Vigne
<b>C6-C3-C6</b>	<b>Flavonoïde</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Flavonols</li> <li>• Anthocyanes</li> <li>• Flavanols</li> <li>• Flavanones</li> <li>• Isoflavonols</li> </ul>	Pinorésinol	Fruits, légumes, fleurs Fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja
<b>(C6-C3)2</b>	Lignanes		Pin
<b>(C6-C3)n</b>	Lignines		Bois, noyau de fruits
<b>(C15)n</b>	Tanins		Raisin rouge, kaki

### 1.2.1. Flavonoïde

Les flavonoïdes constituent le principal groupe de polyphénols, avec plus de 9000 composés différents (Hernández, 2009) et distribués de manière générale, dans toutes les plantes vasculaires. Leur squelette chimique commun possède 15 atomes de carbones, constitué de deux noyaux benzéniques A et B reliés par un cycle pyranique central C. Ils diffèrent les uns des autres par la position des substitutions sur les noyaux A et B, et la nature de C. Les flavonoïdes sont répartis en différentes catégories dont les plus importantes sont les flavonols, les flavones, les flavanols, les isoflavones, les flavanones, et les anthocyanes. Ces

molécules se rencontrent à la fois sous forme libre, mais sont très souvent liés avec des sucres, on parle alors d'hétérosides constitués d'une partie phénolique aglycone ou génine associée à un sucre. Ils sont localisés dans divers organe : fleurs, fruits, feuilles, tiges et racine (Saffidine, 2015).



**Figure 3.** Structure chimique des flavonoïdes (Saffidine ,2015).

### 1.3. Activités biologiques

#### 1.3.1. Activité antioxydant

Les réactions d'oxydation font référence à un système d'échange d'électrons. En effet, une molécule oxydée aura perdu un électron, au profit de la molécule dite réduite qui aura gagné ce dernier. Dans la nature, ces réactions sont omniprésentes, et bon nombre d'entre elles sont indispensables au bon fonctionnement physiologique des organismes vivants. Par exemple, au sein de la chaîne de transfert d'électrons des cellules eucaryotes, système permettant la production d'énergie sous forme d'ATP impliquant des réactions oxydatives, l'oxygène est le dernier accepteur d'électrons (Pietta, 2000).

Cependant, au sein d'un organisme vivant, ce phénomène d'oxydation doit être contrôlé de manière fine afin de ne pas perturber la fonction naturelle des molécules biologiques. L'oxydation de molécules biologiques au niveau cellulaire peut les rendre inactives, comme certaines protéines (Van der werf, 2013).

### 1.3.1.1. Radicaux libre

Un radical libre est un atome ou une molécule qui porte sur sa couche électronique périphérique un ou plusieurs électrons non appariés, c'est-à-dire non couplés à un électron de spin opposé. Cela entraîne une très haute réactivité chimique avec les éléments voisins (Leverve, 2009 ; Rochette, 2008).

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

L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (ROS). Cette appellation n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, radical hydroxyl OH<sup>•</sup>, monoxyde d'azote NO<sup>•</sup>, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singulet <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxyde ONOO<sup>-</sup> (Favier, 2003).

### 1.3.1.2. Définition antioxydant

Un antioxydant est une molécule capable de ralentir ou d'empêcher l'oxydation d'autres substances chimiques. C'est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation dans notre corps et régule la formation des radicaux libres en protégeant nos cellules contre le vieillissement accéléré (Mane, 2012).

#### a. Antioxydants primaires

Les antioxydants primaires ou radicalaires ouverts, qui permettent l'interruption de la chaîne auto catalytique :  $AH + R^{\bullet} \rightarrow A^{\bullet} + RH$ . La molécule AH est antioxydant si le radical formé A<sup>•</sup> est plus stable. La stabilité du radical A<sup>•</sup> peut s'expliquer par sa conversion en composés non radicalaires :  $A^{\bullet} + A^{\bullet} \rightarrow A-A$  ou  $A^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow A-R$  (Rolland, 2004).

## **b. Antioxydants secondaire**

Les antioxydants secondaires ou préventifs qui assurent l'inhibition de la production des radicaux libres. Ce sont des substances décomposant les hydroperoxydes en alcool, des thiols (glutathion, acides aminés soufrés) ou les disulfures, des protecteurs vis-à-vis des UV, comme les carotènes, des chélatants des métaux promoteurs d'oxydation type fer et cuivre, comme l'acide citrique et les lécithines) ou enfin de séquestrant d'oxygène comme l'acide ascorbique (Rolland, 2004).

### **1.3.1.3. Stress oxydatif**

Le stress oxydatif est caractérisé par un déséquilibre entre la production des espèces radicalaires et les capacités de défense antioxydant de l'organisme. La production d'espèces réactives de l'oxygène est utile mais peut être néfaste pour l'organisme lors d'une production excessive et en l'absence de mécanismes de défense. C'est ce que l'on appelle le stress oxydatif. Celui-ci peut favoriser la survenue de pathologies (cancers, maladies cardiovasculaires) ainsi qu'un vieillissement prématuré. Une des principales fonctions déclenchées par le stress oxydatif est la mort cellulaire programmée ou apoptose (Guillouty, 2016).

## **1.3.2. Activité antibactérienne**

### **1.3.2.1. Généralité**

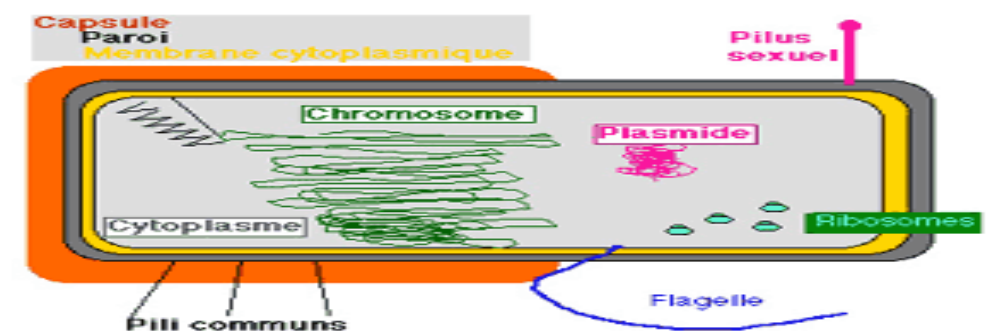
Il est connu que le traitement des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. Mais, la consommation à grande échelle de ces «médicaments » a entraîné la sélection de souches multi-résistantes surtout les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration dans les recherches médicales (Ali-Shtayeh *et al.*, 1998).

### **1.3.2.2. Infections bactériennes**

Une infection bactérienne est un ensemble de troubles qui résultent de la pénétration d'une bactérie pathogène dans un organisme. Elle peut être : locale, lorsqu'elle se manifeste uniquement au niveau où les germes ont pénétré ; générale, lorsqu'un germe franchit les barrières opposées par l'organisme à son entrée (peau, muqueuses) ou au niveau des ganglions, il pénètre dans le sang et se dissémine par celui-ci dans tout l'organisme ; focale : c'est l'infection en foyer dans les tissus ou organes où les germes sont apportés par la circulation sanguine (Pocidalo *et al.*, 1989 ; Marc *et al.*,2001).

### 1.3.2.3. Rappel sur les bactéries

Les bactéries sont des microorganismes unicellulaires procaryotes. Elles ont une taille de l'ordre du micromètre ( $\mu\text{m}$ ), comprise entre 200 nm (nano-bactéries) et 1mm (bactéries géantes) ; on distingue trois formes de bactéries : sphérique, Cylindrique /forme de bâtonnet, Incurvée ou en spirale .Chez toutes les espèces bactériennes, il y a des éléments communs (paroi bactérienne, membrane cytoplasmique, cytoplasme et génome) et des éléments facultatifs que nous retrouvons chez certaines espèces (plasmides, capsule, flagelle et pili). Chacun de ces éléments a un rôle particulier dans la vie de la cellule (Doumbia, 2012).



**Figure 4.** Anatomie d'une bactérie (Allag, 2017).

### 1.3.2.4. Résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance microbienne est considérée comme le principal obstacle à la réussite d'un traitement contre les maladies infectieuses. L'émergence de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques est un phénomène inquiétant. La multi-résistance est décrite comme la résistance ou la diminution de la sensibilité à au moins trois classes d'antibiotiques actifs sur les souches sauvages: (1) lactamines, pénicillines, céphalosporines et mono-bactames; (2) carbapénèmes; (3) fluoroquinolones et (4) aminosides (Shorr, 2009).

Pour pallier chaque émergence de résistance l'industrie pharmaceutique met au point de molécules nouvelles. Cet arsenal thérapeutique aboutit à l'apparition de bactéries «super résistante» contre lesquelles pratiquement toutes les classes antibiotiques à disposition du praticien sont inefficaces comme les entérobactéries BLSE ( $\beta$ -lactamases Spectre Etendue). Nous rapportons quelques exemples de bactéries résistantes aux ATB : ainsi, *Staphylococcus aureus* est devenu résistant à la benzylpénicilline et à la méthicilline, par contre, il reste sensible à la **gentamicine** (Bobbà *et al.*, 2011). Il existe au moins trois autres espèces de

bactéries capables de provoquer des maladies infectieuses pouvant être mortelles (*Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Pseudomonas aeruginosa*) qui sont devenues résistantes à un grand nombre d'antibiotiques à l'exception de la **vancomycine** (Iwu, 1999).

À la résistance à la pénicilline certaines espèces étaient associée la résistance à la streptomycine, à l'érythromycine, à la tétracycline, au chloramphénicol ainsi qu'aux sulfamides. La prévalence de la résistance aux carbapénèmes croît dans le monde entier dans toutes les espèces de bacilles à Gram négatif cliniquement importantes, elle reste très majoritairement le fait de souches nosocomiales à fort potentiel épidémique. Les échanges internationaux et les circulations de population expliquent, mais seulement en partie, la dissémination à grande échelle de ces résistances.

### **1.3.2.5. Micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiens**

#### **a. Escherichia coli**

C'est une bactérie qui appartient à la famille des entérobactéries. Elles ont comme dimensions moyennes 2 à 3 micromètres de long et 0,6 micromètre de large. Cette bactérie est connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire. La majorité des infections urinaires de la jeune femme observée en pratique médicale de ville est due à *Escherichia coli*. *E. coli* est une espèce commensale du tube digestif de l'homme et des animaux. Dans l'intestin, *E. coli* est l'espèce aérobie facultative quantitativement la plus importante. Sa présence d'*E. coli* dans l'eau est témoin d'une contamination fécale (Brama, 2002).

#### **b. Staphylococcus aureus**

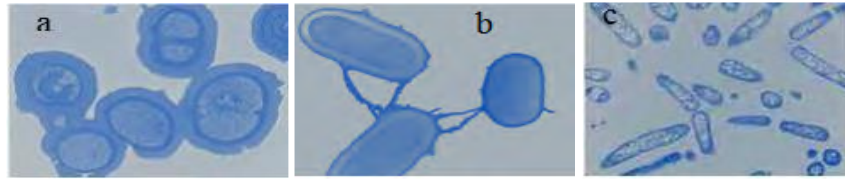
Ce sont des Cocci à Gram positif très fréquents chez l'homme à l'état commensal ou pathogène. Il est immobile, non sporulé et ne possède pas de capsule visible au microscope optique. Il mesure 0,8 à 1 micromètre. Ils se présentent de façon isolée, en diplocoques ou groupés en amas. Ils sont rependus dans la nature (eau, sol...) et vivent souvent à l'état commensal sur la peau et les muqueuses des organismes humains et animaux (Brama, 2002).

#### **c. Pseudomonas aeruginosa**

Sont des bacilles Gram négatif, se forme non sporulée, elles sont aérobies, mobiles grâce à la présence de 1 à 2 flagelles, ce type de bactérie synthétise de types principaux de pigments pyocyanine : bleue phénazine, pyoverdine: jaune vert, il s'agit de bactéries résistantes pour plusieurs antibiotiques (Percival, 2004). *Pseudomonas aeruginosa* est



responsable de 16% des cas de pneumonie nosocomiale, 12% des infections urinaires, 8 % des infections suites aux blessures chirurgicales (Van Delden et Iglewski, 1998).



**Figure 5.** Aspect morphologique des micro-organismes étudiés (Pieri, 1992).

(a) : *S. aureus* ; (b) : *E. coli* ; (c) : *P. aeruginosa*.

# **Partie expérimental**

# **Chapitre 2**

## **Matériel et méthodes**

## 1.1. Matériel

### 2.1.1. Matériel végétal

Le modèle biologique sur lequel nous travaillons au cours de cette étude est *Morus nigra* L. les feuilles de cette plante ont été collectées au mois d'octobre 2019 dans la région de Barika située au soude de la wilaya de Batna L'identification botanique de l'espèce a été réalisée au niveau du département des Sciences de la nature et de la vie, Université Mohamed khider Biskra. Un échantillon de référence est conservé au niveau du laboratoire.

### 2.1.2. Matériel de laboratoire

#### 2.2.2.1. Réactifs

Afin de réaliser le travail du laboratoire, nous avons utilisé le matériel suivant :

- Ethanol
- Folin ciocalteu
- NaCO<sub>3</sub>
- Eau distillée
- Eau physiologique
- ALCL<sub>3</sub>,
- Quercétine
- Gélose nutritive
- Mueller-Hinton
- DPPH (2,2-diphényle –1-picrylhydrazyle )
- DMSO

#### 2.2.2.2. Instrument et appareillage

Le matériel utilisé dans cette étude se trouve au niveau de notre département de Biologie au département des Sciences de la nature et de la vie à l'université Med Khider Biskra. Nous avons utilisé :

- Spectrophotomètre UV-vis
- Etuve électrique
- Agitateur magnétique et plaque chauffante

- Vortex
- Balance analytique
- Boîtes de pétri
- Pipette pasteur
- Micropipette
- Disques de papier wattman n°3 (6mm de diamètre)
- Disques d'antibiotiques
- Pince stérilisée
- Anse de platine
- Bec bunsen
- Tubes à essai
- Tubes sec
- Autoclave 120°C
- Erlang Mayer

### 2.1.3. Souches bactériennes

**Tableau 3.** Résume les références des souches bactériennes utilisées dans l'activité antibactérienne.

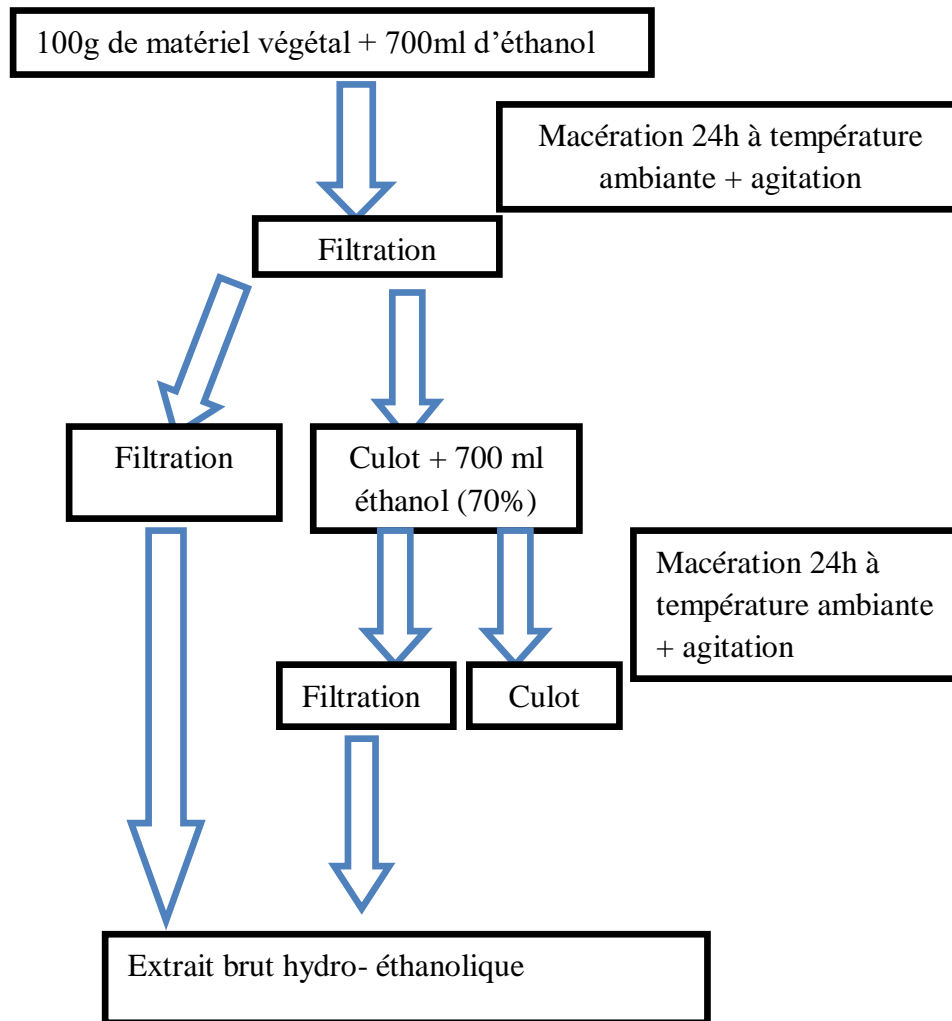
	Souches		Référence
Gram+	<b>Cocci</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
Gram-	<b>Bacille</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27353
	Bacille	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922

## 2.2. Méthodes

### 2.2.1. Préparation des extraits bruts

Afin de préparer les extraits bruts 100g du matériel végétal broyé ont été mises à macérer dans 700ml du solvant d'extraction (éthanol 30 % et 70%). Après 24 heures de macération sous agitation, le mélange a été filtré et évaporé à une température de 40°C à l'aide

d'une évaporation rotative. Les mêmes étapes ont été répétées avec le culot pour récupérer le maximum des substances actives, comme il est indiqué dans la figure 6.



**Figure 6.** Protocole de préparation de l'extrait brut.

### 2.2.2. Calcul du rendement

Le rendement de l'extraction est déterminé par le calcul du rapport entre le poids de l'extrait sec par rapport au poids matériel végétal utilisé pour l'extraction. Le rendement est exprimé en pourcentage et est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = (M0/M1) * 100$$

**M0** : Masse en gramme de l'extrait brut sec.

**M1** : Masse en gramme de la matière végétale initiale sèche.

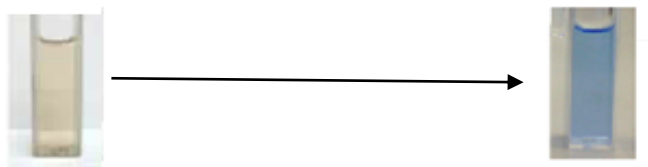
### 2.2.3. Dosage des composés phénoliques

#### 2.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux

##### a. Numérotation principe

Le teneur en phénols totaux des différents extraits de la plante a été estimée par la méthode de en utilisant le réactif de folin-ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999).

Cette méthode est basée sur l'interaction des composées phénolique avec le réactif de folin -ciocalteu qui est un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phoshomolybdique ( $H_3PM_{12}O_{40}$ ), en oxydant les composés phénolique ,ce réactif est réduit en un mélange d'oxyde de tungstène ( $W_2PW_{23}$ ) et d'oxyde de molybdène ( $MO_8O_{23}$ ).ces produit ont une couleur bleue, dont l'absorbance est proportionnelle à la quantité de poly phénols présents dans l'échantillon (Ribéreau-Gayon *et al.*,1982).



**Figure 7.** Changement de couleur du à une réduction du molybdate d'ammonium (Jaune) avec le noyau phénol du CFR (Bleu) (Agbor *et al.*, 2014).

##### b. Numération mode opératoire

Un volume de 0,5ml du réactif de folin-ciocalteu (10%) est ajouté à 0,1ml de chaque extrait. Après 4 minutes, 0,4ml de la solution de carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ) (7,5%) sont ajoutés. le mélange est incubé 2h à l'obscurité à température ambiante. l'absorbance a été mesurée à 765nm contre un blanc sans extrait.

La concentration des composés phénoliques dans chaque extrait est exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par 1g de matière sèche grâce à une courbe d'étalonnage obtenue avec différentes concentration d'acide gallique.

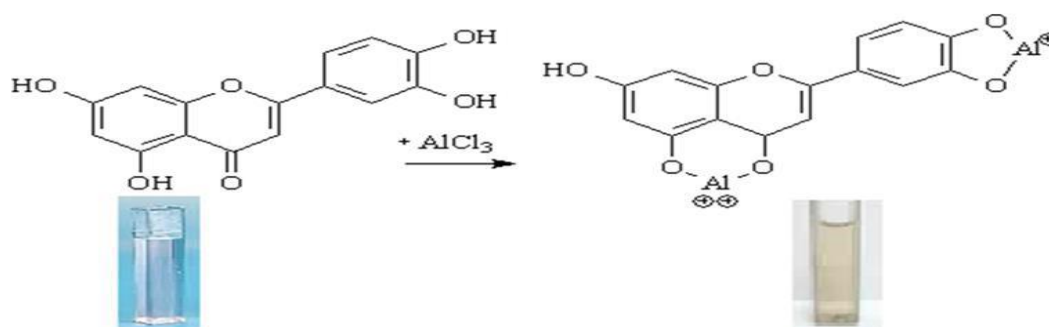
#### 2.2.3.2. Dosage des flavonoïdes

##### a. Numérotation principe

La teneur en flavonoïde des extraits obtenus est déterminée par la méthode de trichlorure d'aluminium décrite par Ribéreau-Gayon (1968).

Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres lors de chélation des métaux ; Dans cette méthode c'est l'aluminium sous forme d'ions  $AL^{+3}$  ; après décomposition De chlorure

d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ). Les complexes formés sont responsables de l'absorption de la lumière dans le visible qui est proportionnelle à la concentration en flavonoïdes.



**Figure 8.** Réaction entre  $\text{AlCl}_3^{3+}$  et les flavonoïdes (Molnàr *et al.*, 2014).

### b .Numérotation mode opératoire

Un volume de 1ml de chlorure d'aluminium (2%) est ajouté à 1ml de chaque extrait.

L'absorbance est lue à 430 nm, après 15 min d'incubation à température ambiante, contre un blanc sans extrait. La concentration des flavonoïdes dans chaque extrait est exprimée en milligramme équivalent d'un standard par 100g de matière sèche grâce à un courbe d'étalonnage obtenue avec différentes concentrations de la quercitrine.

### 2.2.4. Evaluation de l'activité antioxydant des extraits in vitro

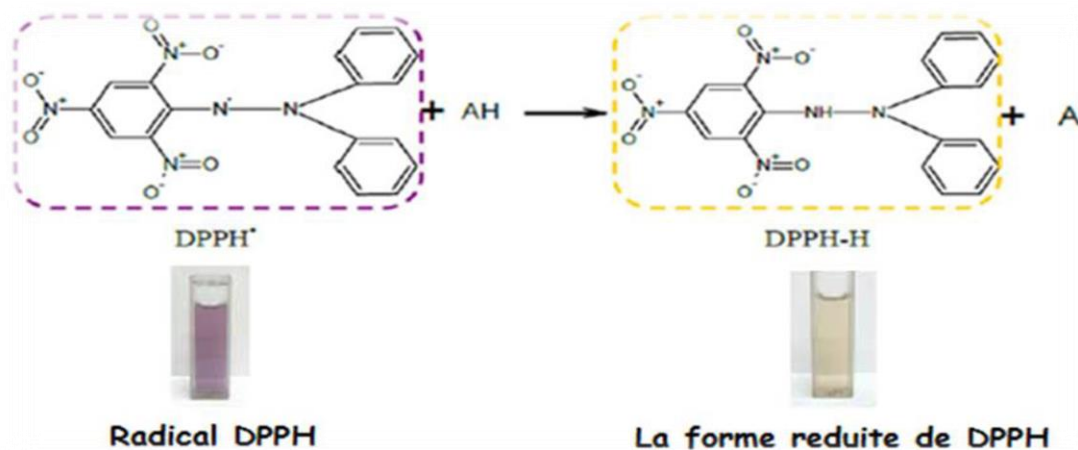
L'activité antioxydant des extraits obtenus a été évaluée in vitro par trois méthodes à savoir :

#### 2.2.4.1. Test de piégeage du radical libre DPPH

##### a. Numérotation principe

L'activité scavenger du DPPH. (2,2-diphényl-1-Picrylhdrazyl ( $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$ ) des extraits de morus nigra est déterminée de kroyer et Hegedus (2001). avec de légères modifications. Cette méthode est basée sur le fait qu'un antioxydant a la capacité de donner un hydrogène au radical DPPH de couleur pourpre sous sa forme oxydée et donc le réduire en DPPH-H(2,2diphényl-1-picryl hydrazine) de couleur jaune –verte (Molyneux, 2004).





**Figure 9.** Forme libre et réduite du DPPH (Molyneux, 2004).

### b. Numération mode opératoire

**Tableau 4.** Évaluation de l'antioxydant par différents méthodes.

Selon Aysel Sy'vacy' <i>et al.</i> , (2004)	Selon Souza G.R. <i>et al.</i> , (2018)	Selon Thabti <i>et al.</i> , (2011)	Selon Budiman, <i>et al.</i> , (2017)
Le test DPPH a été réalisé à la suite de la même méthode que celle décrite ailleurs (Güllüce <i>et al.</i> , 2003). Cinquante microlitres de différentes concentrations des extraits de <i>M. nigra</i> dissous dans du méthanol a été ajouté à 5 ml d'un méthanol à 0,004 % solution de DPPH. Après une incubation de 30 minutes période à température ambiante, l'absorbance était lue contre un blanc à 517 nm.	L'activité de piégeage des radicaux libres a été mesurée à l'aide du dosage du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH) (Mensor <i>et al.</i> , 2001). Des solutions mères d'échantillons (1,0 mg/mL) d'extraits ont été diluées à des concentrations finales de 243, 81, 27, 9, 3 et 1 µg/mL, dans de l'éthanol. Un ml d'une solution de DPPH éthanol à 50-µg/mL a été ajouté à 2,5 ml de solutions d'échantillons de concentrations	L'activité antioxydant des extraits est réalisée selon la méthode de Blois (1958). Un volume de 3 ml de solution d'extrait dans le méthanol (contenant 50-1200 µg d'extrait sec) a été filtré. 200 µl d'extrait ont été mélangés à 1 ml d'un 500 µM méthanolique solution de DPPH, puis le mélange a été mélangé au vortex. Après une période d'incubation de 30 minutes à température ambiante,	La solution DPPH (2:3) a été autorisée pour le temps de fonctionnement afin l'absorbance de lecture à la longueur d'onde maximale. Un mélange de 1 ml de méthanol et 1 ml de solution de DPPH a été utilisé comme témoin. Le blanc correspondant des échantillons ont été préparés et de l'acide L-ascorbique (1-100 µg/ml) a été utilisé comme norme de référence. La réaction a été réalisée en trois

	différentes, et laissé réagir à température ambiante. Après 30 minutes, les valeurs d'absorbance ont été mesurées à 518 nm .	l'absorbance a été lue par rapport à un blanc à 517 nm.	exemplaires, et la diminution de l'absorbance a été mesurée à 517 nm après 30 minutes dans l'obscurité à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis.
--	--	---	--

Le contrôle est préparé de la même manière sauf que l'extrait est remplacé par le solvant d'extraction le pourcentage de réduction du radical DPPH est exprimé par la formule suivant:

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} : [(A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

A témoin : Absorbance du contrôle.

A échantillon : Absorbance de l'échantillon.

La valeur IC50 est définie comme la concentration des antioxydants correspondant à 50 % l'inhibition.

### 2.2.5. Activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion de disque où les disques sont imbibés de 10 µl de chaque extrait (Sokmen *et al.*, 2004).

#### 2.2.5.1. Préparation du milieu de culture

##### a. Préparation de gélose nutritive

Le milieu de culture approprié à cette étude est le milieu de gélose nutritive préparé comme suit :

Dissoudre 28 g de la gélose Muller-Hinton dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis auto-claver pendant 24h à 121°C et finalement couler le milieu dans les boîtes de Pétri.

##### b. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture approprié à cette étude est le milieu Muller-Hinton préparé comme suit : Dissoudre 38 g de la gélose Muller-Hinton dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis auto-claver pendant 24h à 121°C, la gélose

de Muller Hinton fondue est coulée dans des boîtes de Pétri de 9 cm de façon à obtenir une épaisseur de 4 mm. Les boîtes sont séchées à l'étuve avant emploi pendant une heure.

#### 2.2.4.2. Stérilisation du matériel

L'eau distillée, le milieu de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 24h. (Khalid *et al.*, 2011).

#### 2.2.5.3. Préparation des dilutions d'extraits de morus nigra

Les extraits des feuilles de la plante ont été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives au demi, sachant que la concentration de la solution mère de chaque extrait est de 200 mg/ml (Souza *et al.*, 2016).

#### 2.2.5.4. Préparation d'inoculum

A partir d'une culture pure des bactéries sur milieu d'isolement (milieu gélose nutritive) ayant au maximum 24h, on racle à l'aide d'une pipette pasteur scellée quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Ensuite, on décharge la pipette pasteur dans 10 ml d'eau physiologique stérile et on homogénéise la suspension bactérienne (Minhas *et al.*, 2016).

#### 2.2.5.5. Ensemencement

La surface de la gélose est ainsi inondée avec 1 à 2ml d'inoculum. Le surplus par la suite est aspiré à la pipette munie de poire. Les boîtes sont séchées pendant 15 minutes à 37°C (Minhas *et al.*, 2016).



**Figure 10.** Ensemencement bactérien.

### **2.2.5.6. Préparation des disques**

Les disques imprégnés d'extraits 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 antibiotiques (témoin positif) appropriés prêts à l'emploi ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des extraits testés et les disques Wattman imprégnés de DMSO (témoin négatif). Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C (Khalid *et al* ,2011).

# **Chapitre 3**

## **Résultats et discussions**

### 3.1. Rendement

#### 3.1.1. Rendement de l'extraction

L'extraction a été faite à partir de la partie aérienne de *Morus nigra* par macération simple avec du éthanol pour obtenir à la fin un extrait brut éthanolique avec un rendement de 28,3% .

Dans une étude réalisée par Sasmitar *et al.*, (2018) sur le même plante, des résultats similaires ont été trouvés. En effet la macération des feuilles dans de l'éthanol donne un rendement de 60,5 %.

Nos résultats sont inférieur à 28,3% de ceux obtenues par ces études mais restent comparables à eux.

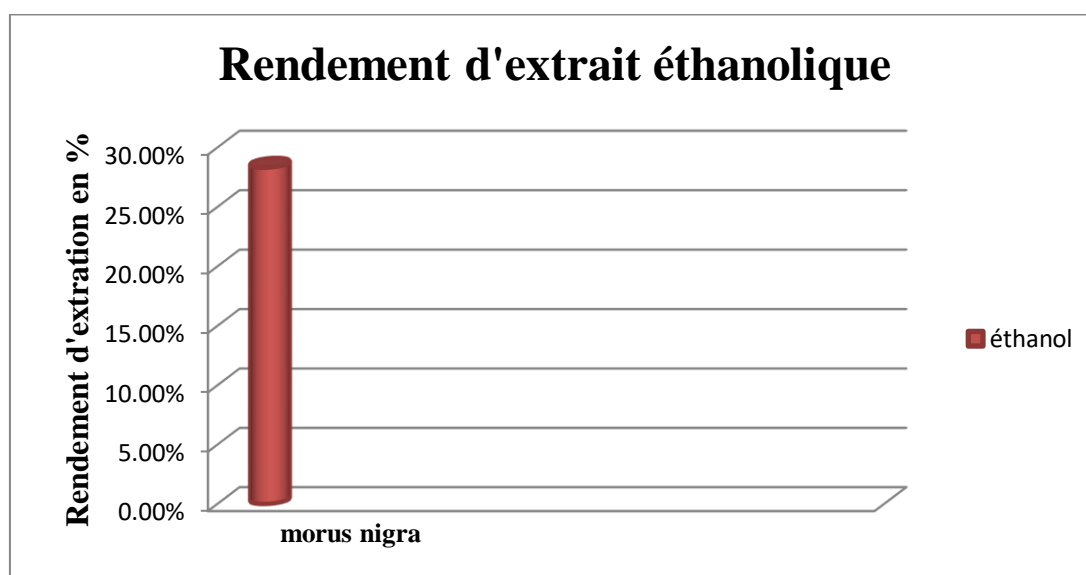


Figure 11. Histogramme du rendement de l'extrait éthanolique brut de *Morus nigra*.

### 3.2. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

#### 3.2.1. Teneur en polyphénols totaux

La détermination de la teneur en polyphénols totaux des différents extraits a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de folin-Cicalteu (Singleton et Rossi, 1965).

Un spectrophotométrie UV/Visible a permis de quantifier le taux des polyphénols présents dans les extraits préparés de *Morus nigra*.

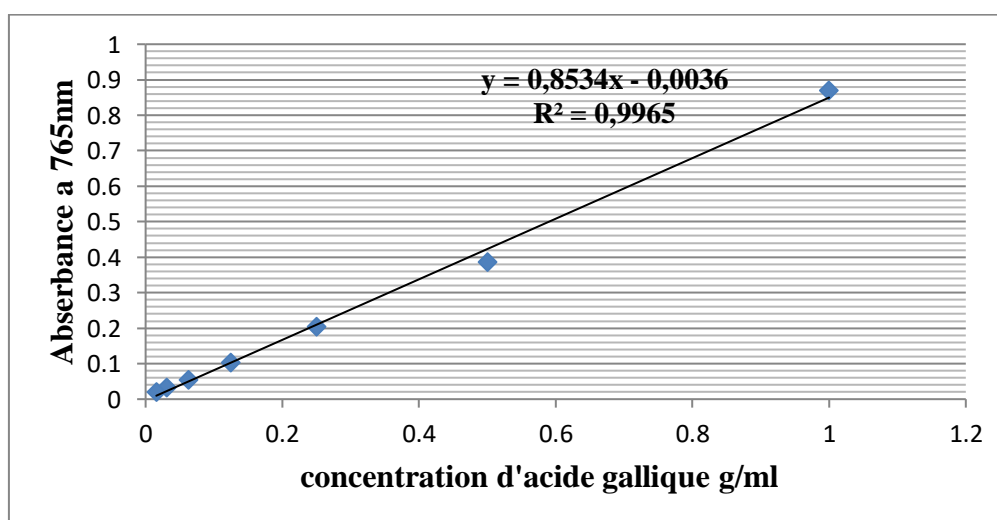
Un gamme d'étalonnage est réalisée avec l'acide gallique, dont les données sont les suivantes :  $y=0,853x-0,003$  sachant que  $R^2= 0,996$ . Les résultats sont les teneurs en polyphénols totaux des extrais éthanoliques sont 0,21 mg EAC/g de matière sèche,

Radojkovic *et al.*, (2012) ont trouvé une valeur assez éloignée de notre résultat avec une teneur en polyphénols de 85,0 mg EAG/g de matière sèche pour un extrait éthanolique de la partie aérienne de la même variété. Des résultats proches de ceux de Memon *et al.*, (2010) soit des teneurs de 13,8 mg EAG/g de matière sèche pour des extraits éthanoliques de feuilles.

On peut conclure à travers l'évaluation des teneurs en composés phénoliques dans les extraits des type étudiée, que ces dernières peuvent constituer une source potentielle de substances phénoliques douées d'activités biologiques importantes. *Morus nigra* sont parmi les plantes qui renferment des taux importants en substances phénoliques qui pourraient être mis à profit contre le stress oxydant et les maladies qui en découlent (Nabylla *et al.*, 2014 ; Hamdi *et al.*, 2017).

La faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines. (Vuorela, 2005 ; Gomez-Caravaca *et al.*, 2006).

Le solvant d'extraction élu des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique (Djeridane *et al.*, 2007). Le dosage par ce réactif donne une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. Il n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé (Tawaha *et al.*, 2007).



**Figure 12.** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

### 3.2.2. Teneur en flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par la méthode de Djeridane *et al.*, (2007), basée sur la formation de complexes entre les flavonoides et le trichlorure d'aluminium. Les complexes produits sont de couleur jaune absorbent dans le visible à visible à 430nm La droite d'étalonnage a été tracée en utilisant la quercétine comme standard. Des essais ont été réalisés en triplicata,  $y = 2,973x + 0,252$  /  $R^2 = 0,962$ , les résultats obtenus sont présentés dans la figure 13.

Les concentrations des flavonoïdes sont relativement importantes dans les extraits dans leur majorité, les teneurs en flavonoïdes sont de 0,011 mg EQ /g de matière sèche dans l'extrait.

Ces résultats sont clairement loin des résultats trouvés par Ercisli *et al.*, (2007). 2.76mg EQ/g de matière sèche pour les extraits éthanoliques de feuilles de la même espèce. Mais ils sont légèrement proches des résultats obtenus par Kostic *et al.*, (2013), c'est-à-dire une teneur de 1,839 mg EQ/g de matière sèche pour les extraits d'éthanol de feuilles. Très proches des résultats obtenus par Abd El-Mawla *et al.*, (2011), c'est-à-dire une teneur de 0,230 mg EQ/g de matière sèche pour les extraits d'éthanol de feuilles.

Bien entendu, les tests de caractérisation présentent des imprécisions car ils sont basés sur l'analyse qualitative. La composition chimique des extraits varie selon les organes et suivant les espèces. Toute fois, ce screening phytochimique ne renseigne point sur la nature des molécules chimiques.

Des études chimiques sur les types *Morus nigra* indiquent que toutes les classes de composés sont présentes dans le genre avec une référence particulière aux terpènes et flavonoïdes selon Wright (2002). Nous y avons décelé la non présence de saponines et des alcaloïdes. En revanche Sellami *et al.*, (2010) confirment la présence des alcaloïdes.

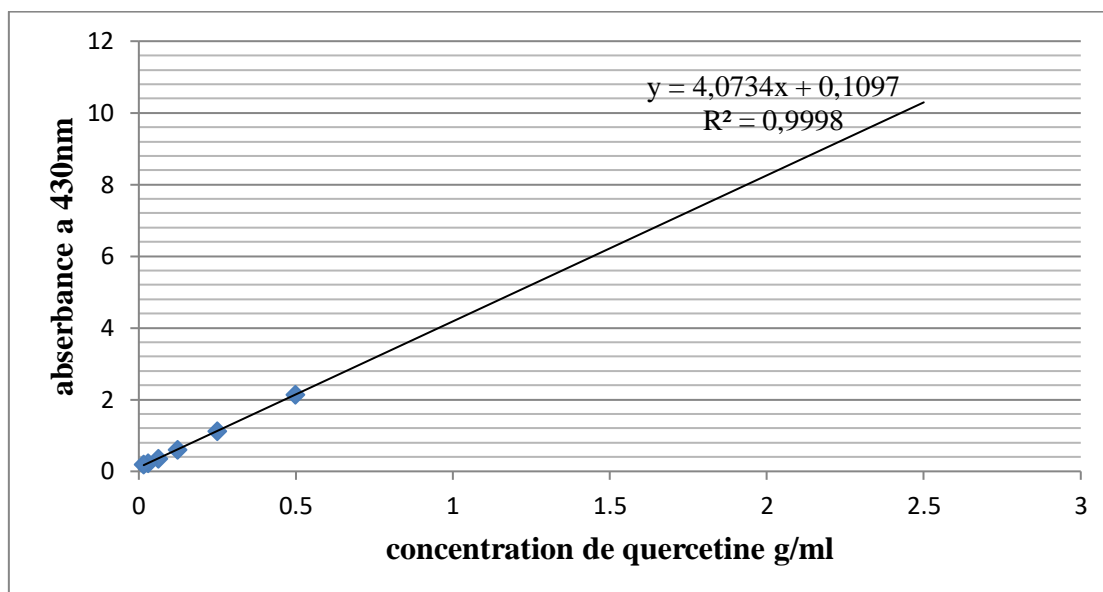
Nos résultats de l'analyse phytochimique de *Morus nigra* sur la présence de flavonoides concordent avec ceux d'Elberry *et al.*, (2011).

Les polyphénols (phénols totaux, flavonoïdes, tannins condensés et hydrolysables) ont été quantifiés dans différents organes de *Marrubium vulgare* du mont de Tessala (Algérie occidentale) ce qui se rapportent avec nos travaux (Bouterfa, 2013). Les études phytochimiques effectuées sur le genre *Marrubium* ont permis d'isoler un grand nombre de



métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les iridiodés, les sesquiterpènes, les diterpènes et les triterpènes (Ashkenazy, 1983).

Selon Moussaid (2012) que Les tests phytochimiques préliminaires effectués sur *Marrubium vulgare* étaient de type qualitatif. Il a été observé la présence dans les extraits des alcaloïdes, des tanins, des flavonoïdes, des stéroïdes, des saponines triterpènes et composés réducteurs (Kahlouche et Riachi, 2014).



**Figure 13.** Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.

### 3.3. Evaluation de l'activité antioxydants par test DPPH

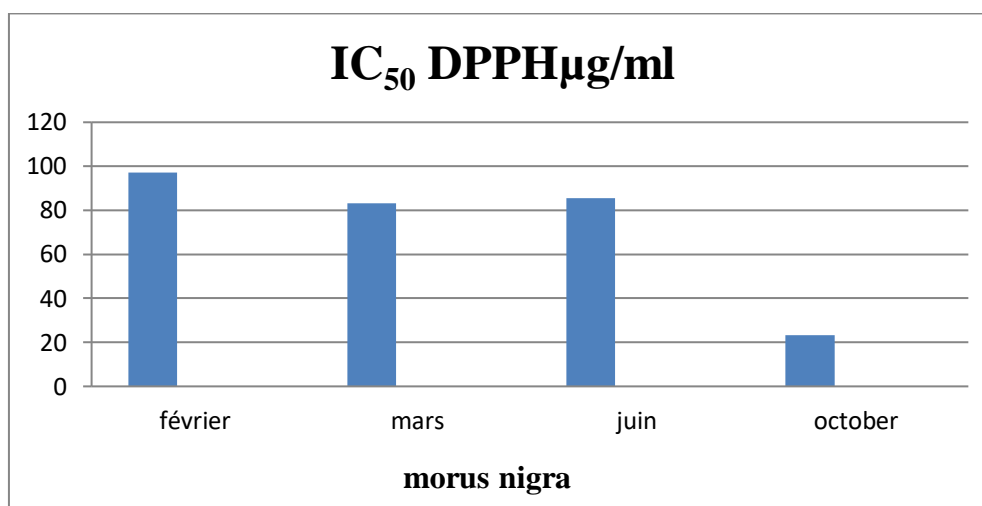
Cette partie est une synthèse des travaux de quater articles réalisés sur *Morus nigra*.

#### 3.3.1. Évaluation saisonnière de l'activité antioxydante par le test DPPH : selon (Sy'vacy' *et al.*, 2004)

La capacité antioxydante de *M. nigra* a été étudiée individuellement en évaluant les potentiels de piégeage des radicaux libres en fonction des périodes d'échantillonnage. Les valeurs de la CI50 sont indiquées à la figure 1.

Il convient de noter qu'une valeur de CI50 plus faible signifie une activité plus élevée. Alors que la CI50 la plus faible (ou l'activité antioxydante la plus élevée) a été observée en octobre, la valeur la plus élevée a été enregistrée en février. La valeur de la CI50 mesurée en octobre était de 23,25 lg / ml (Figure 1). Il est important de noter que la CI50 des extraits de *Morus nigra* en octobre était significativement différente de celle de février ( $p < 0,05$ ). Selon cette étude, les extraits de *M. nigra* montrent une variation saisonnière avec une meilleure

capacité antioxydante en automne. Selon Ignacio *et al.*, (2001), qui ont travaillé sur les feuilles de hêtre Une variation saisonnière de l'activité antioxydante des feuilles de hêtre (*Fagus sylvatica* L.) dans des conditions méditerranéennes. Cela peut s'expliquer par le fait que de juillet à septembre, il n'y a pas eu de biosynthèse de la chlorophylle, de sorte que la photodégradation de la chlorophylle n'a pas été compensée par la production de nouvelle chlorophylle. Les auteurs ont noté que la réduction de la chlorophylle s'est produite parallèlement à une augmentation des tocophérols. Dans cette étude, la valeur de la CI50 des feuilles de *Morus nigra* était la plus faible (antioxydant le plus élevé en octobre), ce qui indique que la chlorophylle dégradée et de puissants systèmes antioxydants ont été produits (Sy'vacy' *et al.*, 2004).



**Figure 14.** Valeurs saisonnières de la CI50 *M. nigra* dans le test DPPH (Sy'vacy' *et al.*, 2004).

### 3.3.2. Evaluation de l'activité antioxydante à l'aide de plusieurs solvants d'extraction selon (Souza G.R. *et al.*, 2018)

Dans la présente étude, la capacité antioxydante de plusieurs extraits de feuilles de *M. nigra* dépendant de la nature du solvant d'extraction, à savoir l'hexane, l'éthanol (EtOH), le chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) et l'acétate d'éthyle (AcOEt), a été étudiée dans certains modèles in vitro tels que l'activité de piégeage des radicaux en utilisant le 2,2-diphényl-1- (tableau 1). Dans les travaux réalisés par Souza, G.R. et al (2018), l'activité antioxydante sur la méthode DPPH a été exprimée par la CI50, qui est définie comme la concentration permettant d'obtenir 50% d'une estimation de l'effet maximal à 100%. Une valeur de CI50 inférieure indique une activité antioxydante supérieure. La DPPH est un radical libre stable qui interagit avec les substances antioxydantes, qui transfèrent des électrons ou des atomes d'hydrogène à la DPPH, neutralisant ("récupérant") le radical libre. Ce processus peut être observé comme un

changement de couleur du réactif du violet au jaune et une réduction de l'absorbance à 517 nm (Benites *et al.*, 2015 ; Banerjee *et al.*, 2005). Les données de cette étude ont montré que les extraits EtOH et AcOEt ont une excellente activité antioxydante, avec une valeur IC50 inférieure à 100 µg / mL . L'extrait d'AcOEt a montré une capacité antioxydante avec une valeur IC50 de  $50,40 \pm 1,16$  µg / mL. Cependant, le BHT était l'antioxydant le plus efficace, avec une valeur IC50 de  $0,65 \pm 0,13$  µg / mL. La présence de composants phénoliques dans les extraits s'est avérée essentielle pour les propriétés de piégeage. Les résultats présentés dans cette étude ont montré que les feuilles de *M. nigra* contiennent une quantité substantielle de composés phénoliques responsables de son activité antioxydante marquée. Selon (Souza G.R. *et al.*, 2018), cette quantité pourraient être responsables de ses activités antibactériennes et antioxydantes marquées. et des activités antibactériennes et antioxydants élevées ont été les principales conclusions de ce travail. D'autres études sont encouragées dans la recherche de molécules bioactives de cette plante.

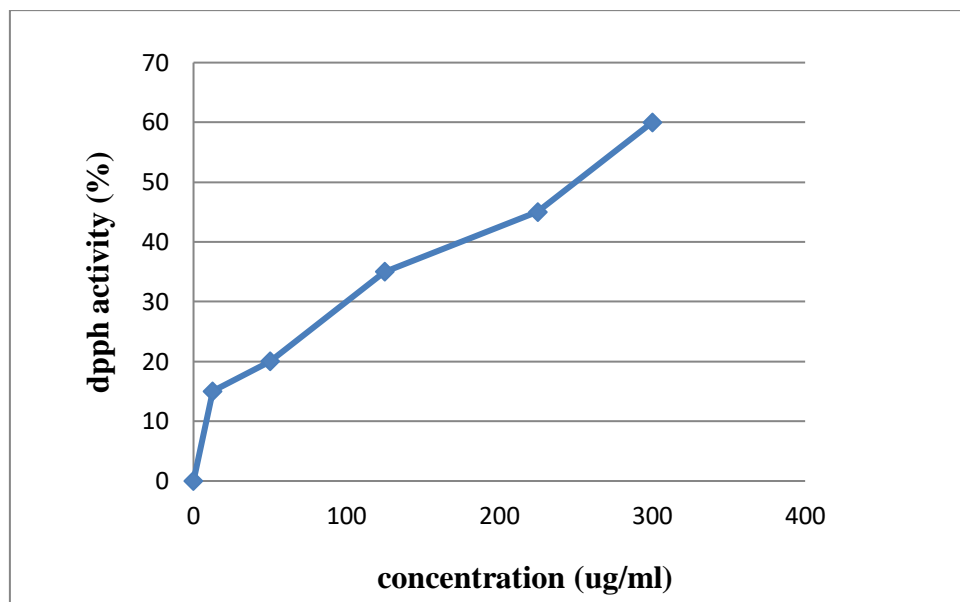
**Tableau 5.** Activité antioxydant des extraits de feuilles de *Morus nigra* L. (Souza G.R. *et al.*, 2018).

<b>Extract</b>	<b>DPPH (IC50, µg/mL)</b>
<b>Mn-EtOH</b>	$69.10 \pm 1.88$
<b>Hexane</b>	> 243
<b>CHCl3</b>	> 243
<b>AcOEt</b>	$50.40 \pm 1.16$
<b>Ascorbic acid</b>	$5.68 \pm 0.03$
<b>BHA</b>	$1.67 \pm 0.30$
<b>BHT</b>	$0.65 \pm 0.13$

### 3.3.3.Évaluation de l'activité antioxydante à l'aide d'extraits d'éthanol : selon (Thabti *et al.*, 2011)

L'activité de piégeage radical de la DPPH est variable d'une espèce à l'autre et dépend de la concentration (Figure 1). L'extrait de *M. nigra* a le meilleur effet antioxydant, pour lequel la CI50 la plus faible est enregistrée ( $20,7$  µg / ml). Cependant, la CI50 la plus élevée ( $300,3$  µg / ml) est détectée dans l'extrait de *M. nigra*. L'activité de piégeage des extraits de méthanol contre le radical DPPH dépend de la concentration. Ce résultat s'explique par leur teneur élevée en polyphénols et en flavonoïdes. L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *M. nigra* sur le radical DPPH a IC50 entre 80 et 90 µg / ml. Grâce à leur importante composition antioxydante, les feuilles de mûrier peuvent être considérées comme protectrices contre l'oxydation des LDL et donc contre l'athérosclérose, comme le démontrent

Enkhmaa *et al.*, (2005). Andallu et Varadacharyulu (2003) ont étudié l'effet thérapeutique de l'extrait de feuilles de mûrier sur des rats Wistar mâles comme modèles expérimentaux et ont observé une diminution de l'activité antioxydante de la glutathion réductase, de superoxyde dismutase, de la glutathion peroxydase et de la glutathion S-transférase (Thabti *et al.*, 2011).

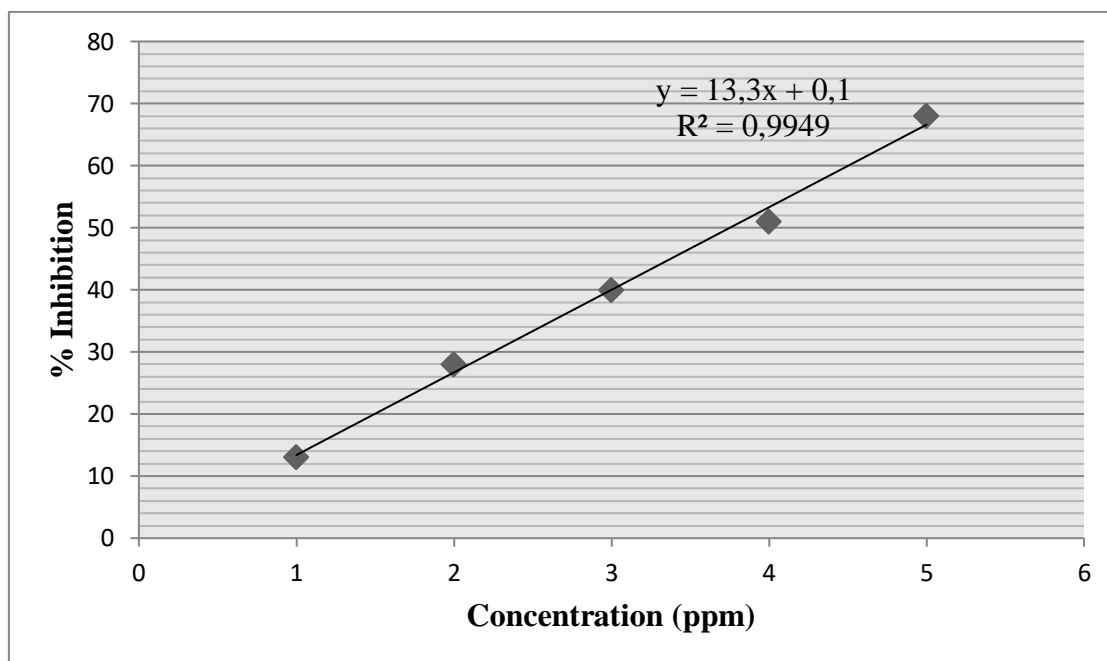


**Figure 15.** Activités d'élimination des radicaux DPPH d'extraits à l'éthanol pour le mûrier étudié laisse des espèces (Thabti *et al.*, 2011).

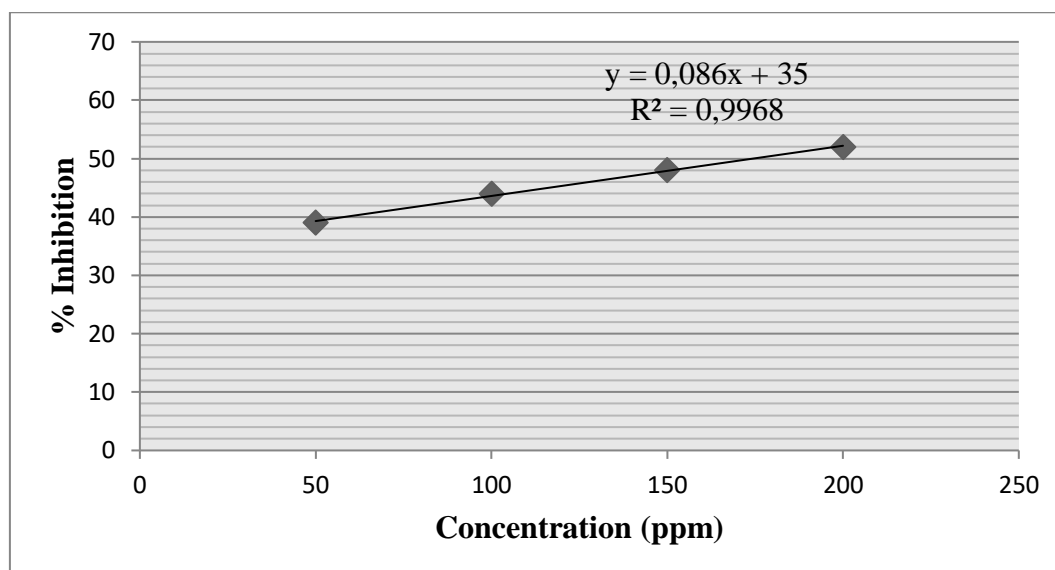
### 3.3.4.Évaluation de l'activité antioxydante à l'aide des concentrations de vitamine C : selon (Budiman *et al.*, 2017)

Le test d'activité antioxydante basé sur la méthode DPPH est l'une des méthodes les plus courantes pour les tests préliminaires d'extraits de plantes (Clarke *et al.*, 2013) (Windono *et al.*, 2001). Cette méthode est la plus appropriée pour les composés polaires tels que les anthocyanes car les cristaux de DPPH peuvent facilement se dissoudre dans un solvant et donner une absorbance maximale. Selon une étude précédente (Apak *et al.*, 2007), l'activité antioxydant en utilisant de l'éthanol à 96% a la valeur d'inhibition la plus élevée par rapport aux autres solvants. Cette méthode peut être appliquée au composé antioxydant qui est hydrophile et lipophile (Memon *et al.*, 2010) La relation entre les concentrations en vitamine C et le pourcentage d'inhibition de la DPPH est visible sur la figure 1. Ces graphiques montrent que la CI50 d'une solution de vitamine C est de 3,7057. Selon une étude antérieure (Jun *et al.*, 2003), un antioxydant est considéré comme très puissant si sa CI50 est <50 mg/ml. L'atome d'hydrogène dans le groupe hydroxyle se lie aux radicaux libres, ce qui augmente la stabilité des radicaux libres. La vitamine C possède quatre groupes hydroxyles et son activité antioxydant est donc considérée comme très puissante. Ces groupes hydroxyles

peuvent donner des électrons aux radicaux libres. La relation entre les concentrations d'extrait de mûre et le pourcentage d'inhibition de la DPPH est illustrée à la figure 2. Dans notre étude, la CI50 pour l'extrait de mûre était de 146 731  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , ce qui se situe dans la fourchette des valeurs de CI50 de 100-250  $\mu\text{g} / \text{mL}$  pour les antioxydants.<sup>33</sup> Les anthocyanes de l'extrait de mûre dans de l'éthanol à 96 % ont une valeur de CI50 de 1,2 mg / L. Les facteurs pouvant entraîner des différences sont les différentes variétés de mûre utilisées, l'utilisation de différents solvants pour l'extraction et l'utilisation de différentes DPPH. L'anthocyanine présente dans la mûre est la raison de son activité antioxydante plus élevée (Memon *et al.*, 2010). L'extrait de mûre a 39,5 fois moins d'activité antioxydante qu'une solution de vitamine C. La raison en est que l'extrait de mûre contient non seulement des anthocyanes mais aussi de nombreux autres métabolites secondaires qui ne pourraient pas travailler aussi fort que la vitamine C, qui est un composé antioxydant pur. (Budiman *et al.*, 2017).



**Figure 16.** Relation entre les concentrations de vitamine C et pourcentage d'inhibition de la DPPH. (Budiman *et al.*, 2017).



**Figure 17.** Relation entre les concentrations de mûrier noir extrait et pourcentage d'inhibition de la DPPH (Budiman *et al.*, 2017).

### 3.4. L'activité antibactérienne

Le pouvoir antimicrobien des extraits isolés de *Morus nigra* a été étudié *in vitro* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosés solides, Mueller-Hinton pour les bactéries.

L'activité antimicrobienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de germes pathogènes d'origine hospitalière dont 3 bactéries Gram (+) et Gram (-).

Cette partie est une synthèse des travaux de quatre articles réalisés sur *Morus nigra*.

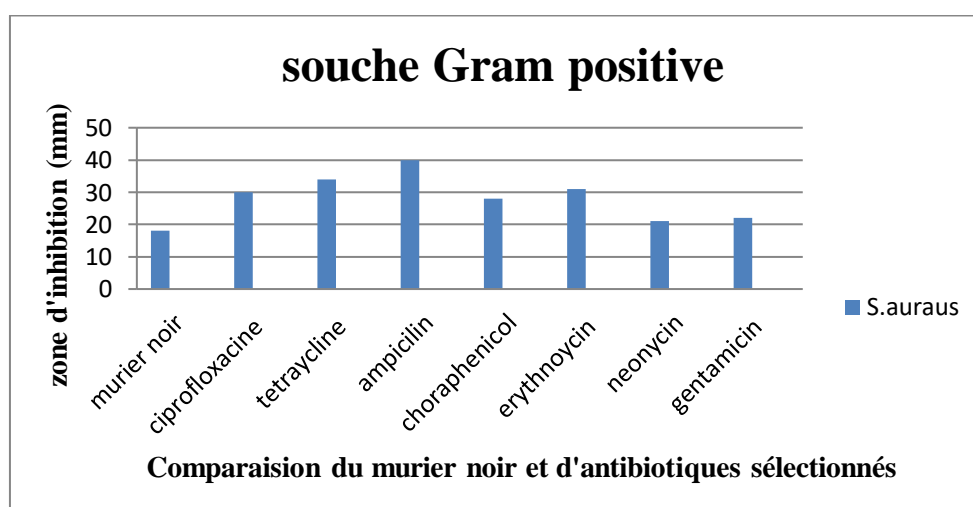
#### 3.4.1. L'activité antibactérienne du *Morus nigra* par zone d'inhibition avec des antibiotiques sélectionnés: selon (Khalid *et al.*, 2011)

L'activité antimicrobienne du jus frais de *mûrier noir* est présentée dans le tableau 1. Les zones d'inhibition contre diverses bactéries Gram-positives et Gram-négatives ont été mesurées en mm. Des zones d'inhibition ont été observées contre toutes les espèces, confirmant l'activité antimicrobienne de jus de mûrie noire. *Morus nigra*. Parmi les espèces Gram positif La zone maximale d'inhibition était contre *Pseudomonas aeruginosa* (19,87 mm). La zone minimale d'inhibition est de obtenu contre *Escherichia coli* (9,98 mm) (tableau 1) pour les Gram- négatifs *Pseudomonas aeruginosa* a une inhibition plus élevée que *Escherichia coli*. Selon cette étude, La tige, l'écorce et le bois de tige et feuille du *Morus*

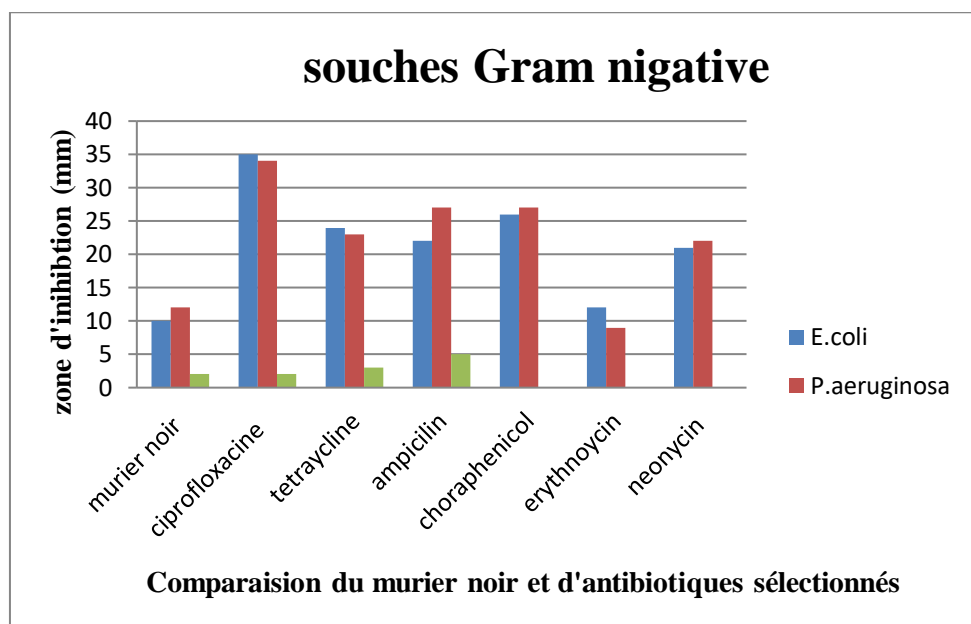
*nigra* ont également montré une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*, et *Pseudomonas aeruginosa* (Mazimba *et al.*, 2011). L'activité antibactérienne était également rapporté à partir d'un extrait méthanolique d'écorce de la tige de *Morus mésozygie* (Kuete *et al.*, 2009). Le jus de *mûres noires*, par rapport à la norme des antibiotiques comme l'ampicilline, le chloramphénicol, ciprofloxacine, tétracycline, érythromycine, néomycine et gentamicine, produisait généralement des zones plus petites de (tableau 1) ; cependant, le jus de mûres noires a avantages par rapport aux antibiotiques testés, car les microbes n'ont pas encore développé de résistance contre elle et elle contient des quantités plus importantes de substances phytochimiques (Figure 1 et 2).. (Khalid *et al.*, 2011).

**Tableau 6.** Comparaison de l'activité antibactérienne du *murier noir* (*Morus nigra*) avec des antibiotique sélectionnés (Khalid *et al.*, 2011).

Souches bacteriennes testées pour leur activité antibacterienne	Zone moyenne d'inhibition (mm)							
	Jus frais (100µl)	CIP 5µg	TE 30µg	AMP 25µg	C 30µg	E 15µg	N 30µg	CN 10µg
<b>Souches gram positives :</b>								
<i>Staphylococcus aureus</i>	17.37	29.87	33.46	39.98	27.49	28.90	20.12	21.68
<b>Souches gram négatives :</b>								
<i>Escherichia coli</i>	9.98	36.10	24.70	21.67	25.68	11.86	20.79	23.16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19.87	30.10	0.00	0.00	0.00	0.00	10.99	20.03



**Figure 18.** Comparaison de l'activité antibactirienne du *Morus nigra* avec des antibiotiques standard (Gram positif) (Khalid *et al.*, 2011).



**Figure 19.** Comparaison de l'activité antibactérienne du *Morus nigra* avec des antibiotiques standard (Gram négatif) (Khalid *et al.*, 2011).

#### 3.4.2. L'activité antibactérienne du *Morus nigra* par zone d'inhibition et solvants d'extraction : selon (Minhas *et al.*, 2016).

Au cours de cette étude, les activités antibactériennes du méthanol et des extraits aqueux des fruits et des feuilles de *M. nigra* ont été testées contre les pathogènes bactériens tels que *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* par la méthode de diffusion sur disque. Yigit et Yigit (2009) Dans la recherche actuelle, comme Par rapport aux solvants non polaires, les solvants polaires ont montré une inhibition significative des agents pathogènes infectieux. Les zones de l'inhibition de la croissance contre diverses bactéries. Inhibé des zones ont été trouvées contre tous les pathogènes bactériens testés à l'exception des microbes fongiques, ce qui indique l'utilisation efficace de *M. nigra* comme agents antimicrobiens (tableau 1). Les extraits d'éthanol et d'acétone montraient l'inhibition maximale d'*E. coli* ( $20,0 \pm 0,0$  mm et  $20,0 \pm 0,0$  mm), *S. aureus* ( $20,0 \pm 0,0$  mm et  $20,0 \pm 0,0$  mm), respectivement. Ces résultats sont conformes à ceux de Mazzimba *et al.*, (2011) et Kuete *et al.*, (2009). Ils représentent l'activité antibactérienne de l'écorce de la tige et des feuille et du bois de la tige de *M. nigra* contre *S. aureus*, et *P. aeruginosa*. De même, Parmi les solvants, l'extrait de chloroforme a montré le maximum inhibition de *P. aeruginosa* et *S. aureus* ( $25,0 \pm 0,0$  mm, et  $25,0 \pm 0,0$  mm). D'autre part, les extraits d'éther diéthylique n'ont eu que peu ou pas d'effet contre tous les pathogènes bactériens (tableau 1). CCM bioautographie de *M. nigra* des extraits ont étayé les résultats de l'activité antimicrobienne obtenue par la méthode de diffusion de puits de gélose. Précédent



les activités antimicrobiennes et l'anti-inflammatoires de *Morus nigra* ont été bien démontrées dans la littérature (Butt *et al.*, 2008).

**Tableau 7.** Zone d'inhibition d'extraits de *Morus nigra* contre les pathogènes bactérienne .

	Source d'isolement	Zone d'inhibition des extraits du <i>Morus nigra</i>				
		Méthanol pH 6.85	Ethanol pH 6.32	Acétone pH 5.85	d'éther diéthylique pH 4.86	Chloroforme pH 5.59
Bactérie photogène	Escherichia coli	1.7	20.0	20.0	00.0	00.0
	Pseudomonas aeruginosa	15.0	15.0	15.0	00.0	25.0
	Staphylococcus aureus	15.0	20.0	20.0	00.0	25.0

#### a. Analyse des antibiogrammes

Parmi tous les antibiotiques, la ciprofloxacine a montré une inhibition maximale de presque toutes les bactéries testées comme c'est indiqué dans le tableau II. La kanamycine montre une inhibition modérée zone inhibée, contre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*. De même, la streptomycine a montré une inhibition maximale de *P. aeruginosa*, et *S. aureus* ( $30,0 \pm 0,0$  mm, et  $33,0 \pm 0,0$  mm), suivi du Chloramphénicol avec  $27,0 \pm 0,0$  mm, et  $29,0 \pm 0,0$  mm de zone d'inhibition (Tableau 2). Les résultats ont également révélé que la tétracycline avait un effet faible ou nul par rapport à d'autres agents pathogènes testés. D'autre part main, l'amoxiciline la tétracycline et la pénicilline G n'avaient pas d'effet sur *S. aureus* et l'ampicilline n'a pas montré un tel effet contre tous les pathogènes bactériens testés. Les zones d'inhibition d'antibiotiques enregistrées étaient en accord avec les conclusions de Nouman *et al.*, (2011). Les extraits de fruits de *M. nigra*, en comparaison avec la sensibilité des antibiotiques standards utilisés en général a produit une zone d'inhibitions plus petite. Cependant, *M. nigra* a un avantage sur les antibiotiques testés car les microbes bactériens et

fongiques n'ont pas développés de résistance contre elle. Elle est due à la présence de quantité de constituants phytochimiques.

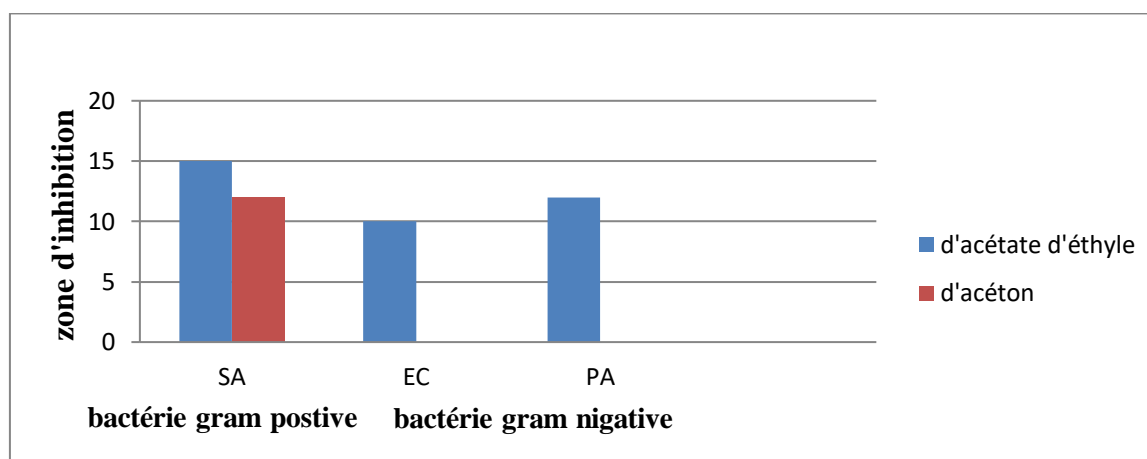
**Tableau 8.** Zone d'inhibition des antibiotiques contre les bactéries (Minhas *et al.*, 2016).

Phatogènes	Zone d'inhibition des antibiotique						
	Antibiotiques bactérienne						
	Strepto mycine	Kanamy cine	Ampicil line	Pénicill ine G	Tétracyc line	Ciproflo xacine	chloramphé nicol
Escherichia coli	15.0	12.0	0.0	0.0	0.0	20.0	15.0
Pseudomona s aeruginosa	30.0	13.0	6.0	6.0	6.0	6.0	32.0
Staphylococc us aureus	33.0	16.0	0.0	0.0	0.0	6.0	33.0

#### 3.4.3. Activité antimicrobienne des feuilles d'acétate d'éthyle et d'acétone extraits de *Morus nigra* avec antibiotique selon (Rizwan *et al.*, 2016)

Selon cette étude, La présence de zones d'inhibition sur les plaques de géloseensemencées a montré que l'extrait végétal possède une activité antibactérienne sur les organismes testés qui comprenaient des organismes à Gram positif et à Gram négatif. Bien que les zones d'inhibition aient été inférieures à celles du médicament standard gentamycine, cela pourrait être dû au fait que l'extrait végétal est brut et contient d'autres constituants les extraits aqueux de *Morus nigra* n'ont montré aucune activité contre toutes les souches bactériennes sélectionnées. Cependant, l'extrait d'acétate d'éthyle de *Morus nigra* a montré une activité notable contre toutes les souches bactériennes sélectionnées, alors que les extraits d'acétone de *Morus nigra* se sont avérés actifs contre les bactéries gram positives seulement (figure 1) (tableau 4, figure 2). En comparant la concentration en CMI de différents extraits de plantes avec la gentamycine (10 µg/ml), il a été observé que l'extrait d'acétate d'éthyle de *Morus nigra* donnait les meilleurs résultats contre *Streptococcus aureus*, (figure 3). Dans le cas des bactéries gram négatives, l'extrait d'acétate d'éthyle de *Morus nigra* a donné les meilleurs résultats contre *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Une analyse phytochimique préliminaire a révélé la présence de tanins et de terpénoïdes. Les autres métabolites secondaires comme les glycosides cardiaques, les flavonoïdes, les stéroïdes, les saponines, etc. étaient présents à l'état de traces dans certaines des plantes, ce qui pourrait être corrélé aux propriétés antimicrobiennes. La nature exacte et le mode d'action de ces principes

actifs sont encore assez obscurs à ce stade. Des travaux ultérieurs pourraient toutefois révéler si ces composants agissent comme inhibiteurs d'enzymes bactériennes intracellulaires, ou s'ils altèrent le système de synthèse de la paroi cellulaire, ou toute autre altération de la réaction biologique qui entraîne l'arrêt de la croissance ou la mort des cellules bactériennes. Ainsi, ici, il n'est pas non plus possible de savoir si ces extraits sont de nature bactéricide ou bactériostatique. Le potentiel de développement d'antimicrobiens à partir de plantes supérieures semble gratifiant car il conduira au développement d'une phytothérapie pour agir contre les microbes. Les antimicrobiens d'origine végétale ont un potentiel thérapeutique énorme, car ils peuvent servir à cette fin avec des effets secondaires moins importants que ceux qui sont souvent associés aux antimicrobiens de synthèse (Rizwan *et al.*, 2016).



**Figure 20.** Activité antimicrobienne des feuilles d'acétate d'éthyle et d'acétone extraits de *Morus nigra* (Rizwan *et al.*, 2016).

**Tableau 9.** Activité antibactérienne de l'acétate d'éthyle et des extraits de feuilles d'acétone de plantes (Zone d'inhibition en mm) (Rizwan *et al.*, 2016).

Plants		Bactérie gram positive		Bactérie gram négative	
		SA	EC	PA	
<i>M.nigra</i>	D'acétate d'éthyle	15	10	12	
	D'acétone	12	-	-	
<b>Gentamycin (10µg/ml)</b>		30	21	34	

Les valeurs sont la zone d'inhibition moyenne (mm), (-) aucune inhibition, SA-S.aureus, EC-E.coli, PA-P.aeruginosa.

#### 3.4.4. Activité antibactérienne des extraits de *Morus nigra* à l'aide de plusieurs solvants selon (Souza *et al.*, 2018)

Certaines plantes synthétisent des substances ayant des propriétés antimicrobiennes telles que les terpénoïdes, les phénoliques (surtout les flavonoïdes) et les composés azotés (Politi *et al.*, 2011). Les résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de *M. nigra* sont présentés dans le tableau 1 et sont exprimés en concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration bactéricide (MBC). L'activité antibactérienne a été évaluée par rapport à trois des bactéries de référence. Les extraits ont montré une activité contre la plupart des microorganismes testés. L'éthanol brut (Mn-EtOH) a montré une activité bactéricide contre la souche d'E.coli à Gram négatif (tableau 1). L'extrait d'hexane était également efficace, elle pourrait inhiber la croissance d'E.coli à une concentration de 3,12 mg/mL (Tableau 1). L'extrait d'acétate d'éthyle est composé principalement de composés polaires tels que les substances phénoliques. De nombreuses études ont montré que ces classes de métabolites secondaires présentent des propriétés antibactériennes et sont, probablement, responsables des résultats obtenus à partir de cet extrait. Dans une revue publiée sur l'activité antimicrobienne de flavonoïdes, Cushnie et Lamb (2005) ont indiqué que de nombreux chercheurs ont isolé et identifié la structure de flavonoïdes qui exercent une activité antibactérienne. Exemples de ces flavonoïdes sont l'apigénine, la galangine, la pinocembrine, ponciretin, genkwanin, sophoraflavanone G et leurs dérivés. Autres flavones, glycosides de flavone, isoflavones, flavanones, isoflavones, isoflavanes, flavonols, flavonol Les glycosides et les chalcones à activité antibactérienne ont également été identifiés (Cushnie et Lamb, 2005). Il est possible pour les substances présentes dans les extraits afin d'exercer une action antimicrobienne. Le mécanisme exact et les principes bioactifs responsables de cet effet restent à expliquer. Ainsi, il serait très intéressant de fractionner les extraits, d'isoler les composés et obtenir une évaluation plus précise. (Souza *et al.*, 2018).

**Tableau 10.** Activité antibactérienne des extraits éthanoliques (EtOH), hexane, chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) et acétate d'éthyle (AcOEt) des feuilles de *Morus nigra*. (Souza *et al.*, 2018).

Microorganismes	Activité antibactérienne des extraits de <i>Morus nigra</i>							
	CMI (mg/mL)				MBC (mg/mL)			
	EtOH	Hexane	CHCl <sub>3</sub>	AcOEt	EtOH	Hexane	CHCl <sub>3</sub>	AcOEt
<i>Escherichia coli</i>	<0.195	3.12	1.56	0.78	<0.195	6.25	12.50	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.50	6.25	6.25	6.25	-	6.25	6.25	6.25

**CMI:** concentration inhibitrice minimale; **MBC:** concentration bactéricide minimale; (-) Croissance microbienne à toutes les concentrations testées.

## **Conclusion**

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Une étude des propriétés antioxydante et antimicrobienne a concerné une plante appartenant à la famille des Moracées.

Dans le cadre de nos travaux de recherche, nous nous sommes intéressés à une plante choisie et identifiée qui a fait l'objet d'une étude d'extraction, Il s'agit de « *Morus nigra* ».

Quantitativement, l'évaluation du contenu des polyphénols totaux en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu est estimée à (0,21 mg EAC / g MS). De même nous avons dosé les flavonoïdes par la méthode d'AlCl<sub>3</sub> Cette teneur est estimée à (0,011 mg EQ / g MS). Il ressort de ces analyses que *Morus nigra* est riche en flavonoïdes et polyphénols.

Le potentiel antiradicalaire des extraits de *Morus nigra* ont été étudiées lors de la synthèse de quatre articles L'activité antioxydante a été déterminé par la méthode de DPPH. Les résultats montrent que l'activité antioxydante de *Morus nigra* présente une variation saisonnière. la IC<sub>50</sub> la plus faible a été observée en octobre (l'activité antioxydante la plus élevée), la valeur la plus élevée est en février (l'activité antioxydante la plus faible). Donc l'activité antioxydante de *Morus nigra* est maximale en automne. Cependant l'étude de la variation de l'activité antioxydante suivant les solvants d'extraction montrée a que les extraits l'hexane, l'éthanol (EtOH), le chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) et l'acétate d'éthyle (AcOEt), ont une faible activité antioxydante, avec une valeur IC<sub>50</sub> supérieur. Le BHT était l'antioxydant le plus efficace. Une autre recherche montre que l'Évaluation à l'aide d'extraits d'éthanol. L'extrait de *M. nigra* le meilleur effet antioxydant, la IC<sub>50</sub> la plus faible est enregistrée (20,7 µg / ml). Cependant, la CI<sub>50</sub> la plus élevée (300,3 µg / ml). Une autre étude a été réalisée sur l'Évaluation de l'activité antioxydante à l'aide des concentrations de vitamine C La relation entre les concentrations en vitamine C et le pourcentage d'inhibition de la DPPH, l'antioxydant est considéré comme très puissant si son IC<sub>50</sub> est <50 mg/ ml. Donc cette plante contient des molécules qui sont considérées comme des agents antioxydants de première classe et peuvent être employées pour des applications thérapeutiques, sachant que les antioxydants contribuent de manière très efficace à la prévention des maladies telles que le cancer, et les maladies cardiovasculaires.

Les études du test antimicrobien vis-à-vis de 3 bactéries (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*), ont montré que les extraits de *M. nigra* ont une bonne action sur les espèces bactériennes testées. L'étude de l'activité antibactérienne du jus frais de *Morus nigra* par zone d'inhibition avec des antibiotiques sélectionnés montre que les espèces Gram négatives qui donnent une zone maximale d'inhibition étaient surtout *Pseudomonas aeruginosa* par rapport aux autres bactéries. Dans une deuxième approche, les activités antibactériennes du méthanol et des extraits aqueux des fruits et des feuilles de *M. nigra* ont été testées contre les pathogènes bactériens tels que *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* par la méthode de diffusion sur disque. Les extraits d'éthanol et méthanol et d'acétone montraient une inhibition maximale d'*E. coli*, *S. aureus*, l'extrait de chloroforme a montré le maximum inhibition de *P. aeruginosa* et *S. aureus*. D'autre part, les extraits d'éther diéthylique n'ont eu que peu ou pas d'effet contre tous les pathogènes bactériens. Parmi tous les antibiotiques, la streptomycine et Chloramphénicol a montré une inhibition maximale de presque toutes les bactéries testées. Par rapport à d'autres antibiotiques testés. Il a été démontré également que l'extrait d'acétate d'éthyle de *Morus nigra* montrée une activité notable contre toutes les souches bactériennes sélectionnées, alors que les extraits d'acétone de *Morus nigra* se sont avérés actifs contre les bactéries gram positives seulement. L'Activité antibactérienne des extraits de *Morus nigra* à l'aide de plusieurs solvants montre une activité contre la plupart des microorganismes testés est l'extrait d'hexane est le plus efficace par rapport. Sachant que notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches, de cet effet, et comme perspectives on propose de :

Faire une étude biochimique sur les fruits de *morus nigra*

- Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.
- Développer des médicaments antiradicalaire à base de plantes, doués d'une activité antioxydante.



## **Références bibliographiques**

- ✓ Abd El-mawla A., Mohamed K. M., Mostafa A. M., 2011. Induction of biologically active flavonoids in cell cultures of *Morus nigra* and testing their hypoglycemic efficacy. *Scientia Pharmaceutica*, 79(4), 951-962.
- ✓ Agbor G. A., Vinson J. A., Donnelly P. E., 2014. Folin -Ciocalteu reagent for polyphenolic assay. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics*, 3(8), 147-156.
- ✓ Akhloufi A., 2010. Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru (Doctoral dissertation).
- ✓ Akinyemi K. O., Oladapo O., Okwara C. E., Ibe C. C., and Fasure K. A., 2005. Screening of crude extracts of six medicinal plants used in South-West Nigerian unorthodox medicine for anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity. *BMC complementary and alternative medicine*, 5(1), 6.
- ✓ Ali-Shtayeh M. S., Yaghmour R. M. R., Faidi Y. R., Salem K., and Al-Nuri, M. A., 1998. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of Ethnopharmacology*, 60(3), 265-271.
- ✓ Allag H., 2017. Structures bactériennes et classification simplifiée. p9.
- ✓ Alshamaony L., Alkhazraji S., and Twaij H. J., 1994. *Ethnopharmacology*, 43(3), 167-171.
- ✓ Jakupovic J., Chen Z. L. and Bohlmann F., 1994. *Phytochemistry*, 26(10), 2777-2779.
- ✓ Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik S. E., Bektaşoğlu B., Özyurt D., 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7), 1496-1547.
- ✓ Bae S. H., and Suh H. J., 2007. Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea. *LWT-Food Science and Technology*, 40(6), 955-962.

- 
- ✓ Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Pinkas M., 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-forschung*, 46(11), 1086.
  - ✓ Banerjee A., Dasgupta N., De B., 2005. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food chemistry*, 90(4), 727-733.
  - ✓ Belaïch R., Boujraf S., 2016. Facteurs inflammatoires et stress oxydant chez les hémodialysés: effets et stratégies thérapeutiques. *Médecine des maladies Métaboliques*, 10(1), 38-42.
  - ✓ Bendif H., Lazali M., Harir M., Miara M. D., Boudjeniba M., and Venskutonis, P. R., 2017. Biological screening of *Ajuga iva* extracts obtained by supercritical carbon dioxide and pressurized liquid extraction. *Journal of Medicinal Botany*, 33-41.
  - ✓ Benites R. S. R., Formagio A. S. N., Argandoña E. J. S., Volobuff C. R. F., Trevizan L. N. F., Vieira M. C., Silva M. S., 2015. Contents of constituents and antioxidant activity of seed and pulp extracts of *Annona coriacea* and *Annona sylvatica*. *Brazilian Journal of Biology*, 75(3), 685-691.
  - ✓ Bindseil K. U., Jakupovic J., Wolf D., Lavayre J., Leboul J., van der Pyl D., 2001. Pure compound libraries; a new perspective for natural product based drug discovery. *Drug Discovery Today*, 6(16), 840-847.
  - ✓ Bobba S., Ponnaluri V. C., Mukherji M., Gutheil W. G., 2011. Microtiter plate-based assay for inhibitors of penicillin-binding protein 2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(6), 2783-2787.
  - ✓ Bouakaz I., 2006. Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister, Batna.
  - ✓ Boubekri C., 2014. Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider Biskra).
  - ✓ Bouterfas K., Mehdadi Z., Latreche A., Hazem Z., and Bouredja N., 2013. Quantification de quelques polyphénols de *Marrubium vulgare* L. du mont de Tessala

- (Algérie occidentale) pendant les deux périodes de végétation et de floraison. Les technologies de laboratoire, 8(31).
- ✓ Brama, S. O., 1972. Activité antibactérienne d'extraits d'*Euphorbia hirta* (Linn), une plante utilisée traditionnellement dans le traitement des infections urinaires (Doctoral dissertation, universite de ouagadougou).
  - ✓ Budiman A., Aulifa D. L., Kusuma A. S. W., and Sulastrri A., 2017. Antibacterial and antioxidant activity of black mulberry (*Morus nigra* L.) extract for acne treatment. Pharmacognosy Journal, 9(5).
  - ✓ Butt M.S., Nazir A., Sultan M.T. and Schroen K., 2008. *Morus alba* L. nature's functional tonic. Trends Fd. Sci. Technol., 19: 505-512.
  - ✓ Clarke G., Ting K. N., Wiart C., and Fry J., 2013. High correlation of 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, ferric reducing activity potential and total phenolics content indicates redundancy in use of all three assays to screen for antioxidant activity of extracts of plants from the Malaysian rainforest. Antioxidants, 2(1), 1-10.
  - ✓ Cushnie T. T., Lamb A. J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. International journal of antimicrobial agents, 26(5), 343-356.
  - ✓ Dacosta E., 2003. Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (Ed). Paris, p317.
  - ✓ Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgards J. F., and Stocker P., 2007. Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. European Food Research and Technology, 224(6), 801-809.
  - ✓ Doumbia A. S., 2012. Développement de filaments nanocomposites à base de polylactide «PLA» : application aux textiles antibactériens (Doctoral dissertation, Lille 1).
  - ✓ Edenharder R., Grünhage D., 2003. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 540(1), 1-18.

- 
- ✓ Elberry A. A., Harraz F. M., Ghareib S. A., Gabr S. A., Nagy A. A., Abdel-Sattar E., 2015. Methanolic extract of *Marrubium vulgare* ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *International journal of diabetes mellitus*, 3(1), 37-44.
  - ✓ Engonga O., Clémen L., 2009. Etude Phytochimique, Activités Antimicrobiennes et Antioxydantes de Quelques Plantes Aromatiques et Médicinales Africaines, ,P 85-86.
  - ✓ Enkhmaa B., Shiwaku K., Katsube T., Kitajima K., Anuurad E., Yamasaki M., Yamane Y., 2005. Mulberry (*Morus alba* L.) leaves and their major flavonol quercetin 3-(6-malonylglucoside) attenuate atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *The Journal of nutrition*, 135(4), 729-734.
  - ✓ Ercisli S., Orhan E., 2007. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chemistry*, 103(4), 1380-1384.
  - ✓ Farnsworth N. R., 1988. Screening plants for new medicines. *Biodiversity*, 15(3), 81-99.
  - ✓ Favier A., 2003. Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*, (11/12), 108-117.
  - ✓ Ferrari J., 2002. Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles: " *Gnidia involucrata*" Steud. ex A. Rich (Doctoral dissertation, Université de Lausanne, Faculté des sciences).
  - ✓ Ghnimi W., 2015. Étude phytochimique des extraits de deux Euphorbiaceae: *Ricinus communis* et *Jatropha curcas*. Évaluation de leur propriété anti-oxydante et de leur action inhibitrice sur l'activité de l'acétylcholinestérase (Doctoral dissertation).
  - ✓ Gómez-Caravaca A. M., Gómez-Romero M., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., 2006. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4), 1220-1234.

- 
- ✓ Guillouty A., 2016. Plantes médicinales et antioxydants (Doctoral dissertation, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
  - ✓ Hernández I., Alegre L., Van Breusegem F. and Munné-Bosch S., 2009. Trends in Plant Science, 14 (3), 125–132.
  - ✓ Ignacio J., Plazaola G. and Becerril J.M., 2001. Seasonal changes in photosynthetic pigments and antioxidants in beech (*Fagus sylvatica*) in a Mediterranean climate: implications for tree decline diagnosis. *Aust. J. Plant Physiol.* 28(3): 225–232.
  - ✓ Issam K. M., and Said G. M., 2017. Using geomatics for assessing vulnerability to cutaneous leishmaniasis. Application to the wilaya of Batna (Algeria). *International Journal*, 13(40), 9-15.
  - ✓ Iwu M. W., Duncan A. R., Okunji C. O., 1999. New antimicrobials of plant origin. Perspectives on new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA, 457-462.
  - ✓ Jun M., Fu H. Y., Hong J., Wan X., Yang C. S., and Ho C. T., 2003. Comparison of antioxidant activities of isoflavones from kudzu root (*Pueraria lobata* Ohwi). *Journal of food science*, 68(6), 2117-2122.
  - ✓ Kahlouche-Riachi F., 2014. évaluation chimique et activité antibactérienne de quelques plantes médicinales d'Algérie.
  - ✓ Khaled-Khodja N., Boulekbache-Makhlouf L., and Madani K., 2014. Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Industrial crops and products*, 61, 41-48.
  - ✓ Khalid N., Fawad S. A., and Ahmed I., 2011. Antimicrobial activity, phytochemical profile and trace minerals of black mulberry (*Morus nigra* L.) fresh juice. *Pak. J. Bot.* 43, 91-96.
  - ✓ Koehn F. E., and Carter G. T., 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*, 4(3), 206-220.
  - ✓ Kostic D. A., Dimitrijević D. S., Mitić S. S., Mitić M. N., Stojanović G. S., Živanović A. V., 2013. Phenolic content and antioxidant activities of fruit extracts of

- Morus nigra* L (Moraceae) from Southeast Serbia. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 12(1), 105-110.
- ✓ Koudou P. J., 2009. Etude phytochimique, activités antimicrobiennes et antioxydantes de quelques plantes aromatiques et médicinales africaines (Doctoral dissertation, Université de Ouagadougou).
  - ✓ Kuete V., Fozing D. C., Kapche W. F. G. D., Mbaveng A. T., Kuate J. R., Ngadjui B. T., and Abegaz B. M., 2009. Antimicrobial activity of the methanolic extract and compounds from *Morus mesozygia* stem bark. Journal of ethnopharmacology, 124(3), 551-555.
  - ✓ Leverve X., 2009. Stress oxydant et antioxydants?. Cahiers de Nutrition et de Diététique, 44(5), 219-224.
  - ✓ Lucas H., jardinier C., 2013. Le *murier noir*, du semis à la confiture en passant par la culture.
  - ✓ Majinda R. R. T., Mazimba O., and Motlhanka D., 2011. Antioxidant and antibacterial constituents from *Morus nigra*.
  - ✓ Mane S., 2014. Etude comparee des proprietes antioxydantes des extraits d'ecorces de tronc, des feuilles et des fruits (coques et graines) de khaya senegalensis (Desr.) A. Juss (Meliaceae).
  - ✓ Marc T., Gerard W., and Denis L., 2001. Classification des anti-inflammatoires in Guide pharmacologie. Etudiants et professionnels paramédicaux. 4ème Edition. P, 426.
  - ✓ Mazimba O., Majinda R.R.T., Motlhanka D., 2011. Antioxidant and antibacterial constituents from *Morus nigra*. Afr J Pharm Pharacol P: 5. 751-54.
  - ✓ Memon A. A., Memon N., Luthria D. L., Bhangar M. I., and Pitafi A. A., 2010. Phenolic acids profiling and antioxidant potential of mulberry (*Morus laevigata* W., *Morus nigra* L., *Morus alba* L.) leaves and fruits grown in Pakistan. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 60(1).
  - ✓ Minhas M. A., Begum A., Hamid S., Babar M., Ilyas R., Ali S., and Andleeb S., 2016. Evaluation of Antibiotic and Antioxidant Activity of *Morus nigra* (Black

- Mulberry) Extracts Against Soil Borne, Food Borne and Clinical Human Pathogens. Pakistan Journal of Zoology, 48(6).
- ✓ Molyneux P., 2004. The use of the stable free radical of Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) for restination antioxidant activity .songklankarin J.sec technol .Page 211-219.
  - ✓ Moussaid M., Elamrani A. A., Berhal C., Moussaid H., Bourhim N., Benaissa M., 2012. Comparative evaluation of phytochemical and antimicrobial activity between two plants from the Lamiaceae family: Marrubium vulgare (L.) and Origanum majorana (L.). Int J Nat Prod Res, 1(1), 11-13.
  - ✓ Mulberry (*Morus nigra* l.) fresh juice. Pak. J. Bot., 43: 91-96.
  - ✓ Nicole T., et François G., 2013. Des fruits et des graines comestibles du monde entier. Lavoisier.
  - ✓ Nouman K., Sardar A.F. and Iftikhar A., 2011. Antimicrobial activity, phytochemical profile and trace minerals of black.
  - ✓ Novelli G. P., 1997. Role of free radicals in septic shock. Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society, 48(4), 517-527.
  - ✓ OMS : Organisation mondiale de la Santé, 2012. Médecine traditionnelle : des textes anciens aux nouveaux médicaments, 90 (8), pp 557-632.
  - ✓ Pietta P. G., 2000. Flavonoids as antioxidants. Journal of natural products, 63(7), 1035-1042.
  - ✓ Pocidalo J. J., 1989. Des infections d'origine microbiennes ou virale. Brisset C et Stoufflet J (Directeurs) Santé et médecine, l'état des connaissances et des recherches. Editions La Découverte/INSERM/ORSTOM.
  - ✓ Politi F. A., de Mello J. C., Migliato K. F., Nepomuceno A. L., Moreira R. R., and Pietro R. C., 2011. Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities and determination of the total tannin content of bark extracts *Endopleura uchi*. International Journal of Molecular Sciences, 12(4), 2757-2768.



- 
- ✓ Radojković M. M., Zeković Z. P., Vidović S. S., Kočar D. D., and Mašković P. Z., 2012. Free radical scavenging activity and total phenolic and flavonoid contents of mulberry (*Morus spp.* L., Moraceae) extracts. *Hemijska industrija*, 66(4), 547-552.
  - ✓ Remmelt V., 2013. Evaluation du pouvoir Antioxydant des aliments: recherche de leurs effets modulateurs sur le stress oxydant dans le cas du diabète, p25-36.
  - ✓ Ribéreau-Gayon P., 1968. Les Composés phénoliques des végétaux: par Pascal Ribéreau-Gayon, Dunod.
  - ✓ Rizwan A., Aziz A., 2016. Evaluation of antibacterial activity of *Morus nigra* & Citrus limon , ,p215-216.
  - ✓ Rochette L., 2008. Stress oxydant et sepsis. *Réanimation*, 17(6), pp.1-4.
  - ✓ Rolland Y., 2004. Antioxydants naturels végétaux. Oléagineux, Corps gras, Lipides, 11(6), 419-424.
  - ✓ Saffidine K., 2018. Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *carthamus caeruleus* L. et de *plantago major* L (Doctoral dissertation).
  - ✓ Sahli R., 2017. Etude phytochimique de quelques plantes extrêmophiles tunisiennes et exploration de leurs activités biologiques (Doctoral dissertation).
  - ✓ Sasmita N., 2018. Species Test of *Morus alba*, *Morus cathayana* and *Morus nigra* on Agroforestry Land as Silkworm Feed (*Bombyx mori* Linn.) for Silk Yarn Quality Improvement in Bali Indonesia.
  - ✓ Sellami S., Mezrket A., and Dahmane T., 2010. Activité nématocide de quelques huiles essentielles contre *Meloidogyne incognita* Nematicidal activity of some essential oils against *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Mediterranea*.
  - ✓ Shorr A. F., 2009. Review of studies of the impact on Gram-negative bacterial resistance on outcomes in the intensive care unit. *Critical care medicine*, 37(4), 1463-1469.
  - ✓ Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R. M., 1999. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178).

- ✓ Singleton V. L., Rossi J. R., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid. *Am. J. Enol. Vitic*, 16 : 144–158.
- ✓ Souza G. R., Oliveira-Junior R. G., Diniz T. C., Branco A., Lima-Saraiva S. R. G., Guimarães A. L., ... and Costa M. P., 2018. Assessment of the antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Morus nigra* L.(Moraceae). *Brazilian Journal of Biology*, 78(2), 248-254.
- ✓ Sývácý A., Sökmen M., 2004. Seasonal changes in antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin constituent of the stems of two *Morus* species (*Morus alba* L. and *Morus nigra* L.). *Plant Growth Regulation*, 44(3), 251-256.
- ✓ Tawaha K., Alali F. Q., Gharaibeh M., Mohammad M., and El-Elimat T., 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food chemistry*, 104(4), 1372-1378.
- ✓ Thabti I., Marzougui N., Elfalleh W., and Ferchichi A., 2011. Antioxidant composition and antioxidant activity of white (*Morus alba* L.), black (*Morus nigra* L.) and red (*Morus rubra* L.) mulberry leaves. *Acta botanica gallica*, 158(2), 205-214.
- ✓ Van Del den C., Iglewski B. H., 1998. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging infectious diseases*, 4(4), 551.
- ✓ Van Der Werf R., 2013. Evaluation du pouvoir anti-oxydant des aliments: recherche de leurs effets modulateurs sur le stress oxydant dans le cas du diabète (Doctoral dissertation, Université de Strasbourg).
- ✓ Vuorela S., 2005. Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics.
- ✓ Windono T., Hendrajaya K., Nurfatmawati H., and Soraya F., 2001. Uji perendaman radikal bebas terhadap DPPH dari ekstrak kulit buah dan biji anggur (*Vitis liniferol*) Probolinggo Biru dan Bali. *Artikel hasil penelitian Artocarpus*, 1, 34-43.
- ✓ Wright C. W., *Artemisia* V., 2002. Taylor & Francis. London and New York.
- ✓ Yiğit D., and Yiğit N., 2008. Antibacterial activity of black mulberry (*Morus nigra*) fruits and leaves. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 1(1), 39-48.
- ✓ Yiğit N., Yiğit D., Özgen U., Aktaş A. E., 2007. Anticandidal activity of black mulberry (*Morus nigra* L.). *Türk. Mikrobiyol. Cem. Derg.*, 37, 169-173.

Site web :

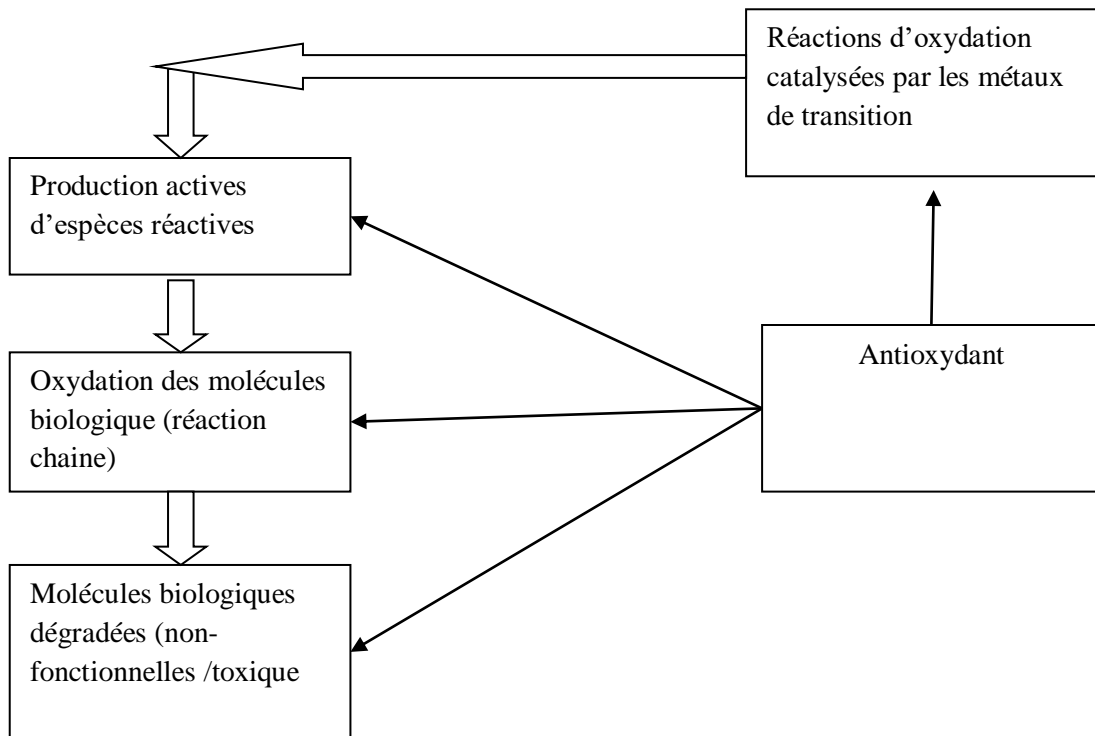
- [deco.fr/jardin-jardinage/arbre-a-fruits/murier-noir](http://deco.fr/jardin-jardinage/arbre-a-fruits/murier-noir)
- <http://www.complements-alimentaires.co/murier-noir/>

## **Annexe**

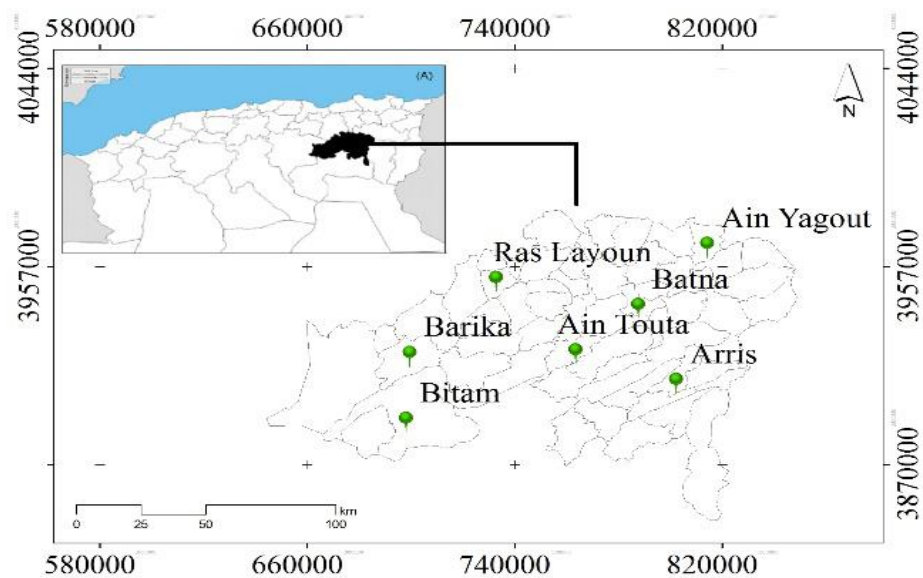
**La liste de article**

- ✓ Abd El-mawla A., Mohamed K. M., Mostafa A. M., 2011. Induction of biologically active flavonoids in cell cultures of *Morus nigra* and testing their hypoglycemic efficacy. *Scientia Pharmaceutica*, 79(4), 951-962.
- ✓ Budiman A., Aulifa D. L., Kusuma A. S. W., and Sulastris A., 2017. Antibacterial and antioxidant activity of black mulberry (*Morus nigra* L.) extract for acne treatment. *Pharmacognosy Journal*, 9(5).
- ✓ Ercisli S., Orhan E., 2007. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chemistry*, 103(4), 1380-1384.
- ✓ Khalid N., Fawad S. A., and Ahmed I., 2011. Antimicrobial activity, phytochemical profile and trace minerals of black mulberry (*Morus nigra* L.) fresh juice. *Pak. J. Bot*, 43, 91-96.
- ✓ Kostic D. A., Dimitrijević D. S., Mitić S. S., Mitić M. N., Stojanović G. S., Živanović A. V., 2013. Phenolic content and antioxidant activities of fruit extracts of *Morus nigra* L (Moraceae) from Southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(1), 105-110.
- ✓ Mazimba O., Majinda R.R.T., Motlhanka D., 2011. Antioxidant and antibacterial constituents from *Morus nigra*. *Afr J Pharm Pharmacol* P: 5. 751-54.
- ✓ Memon A. A., Memon N., Luthria D. L., Bhangar M. I., and Pitafi A. A., 2010. Phenolic acids profiling and antioxidant potential of mulberry (*Morus laevigata* W., *Morus nigra* L., *Morus alba* L.) leaves and fruits grown in Pakistan. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 60(1).
- ✓ Minhas M. A., Begum A., Hamid S., Babar M., Ilyas R., Ali S., and Andleeb S., 2016. Evaluation of Antibiotic and Antioxidant Activity of *Morus nigra* (Black Mulberry) Extracts Against Soil Borne, Food Borne and Clinical Human Pathogens. *Pakistan Journal of Zoology*, 48(6).
- ✓ Radojković M. M., Zeković Z. P., Vidović S. S., Kočar D. D., and Mašković P. Z., 2012. Free radical scavenging activity and total phenolic and flavonoid contents of mulberry (*Morus spp.* L., Moraceae) extracts. *Hemijska industrija*, 66(4), 547-552.
- ✓ Rizwan A., Aziz A., 2016. Evaluation of antibacterial activity of *Morus nigra* & Citrus limon , ,p215-216.

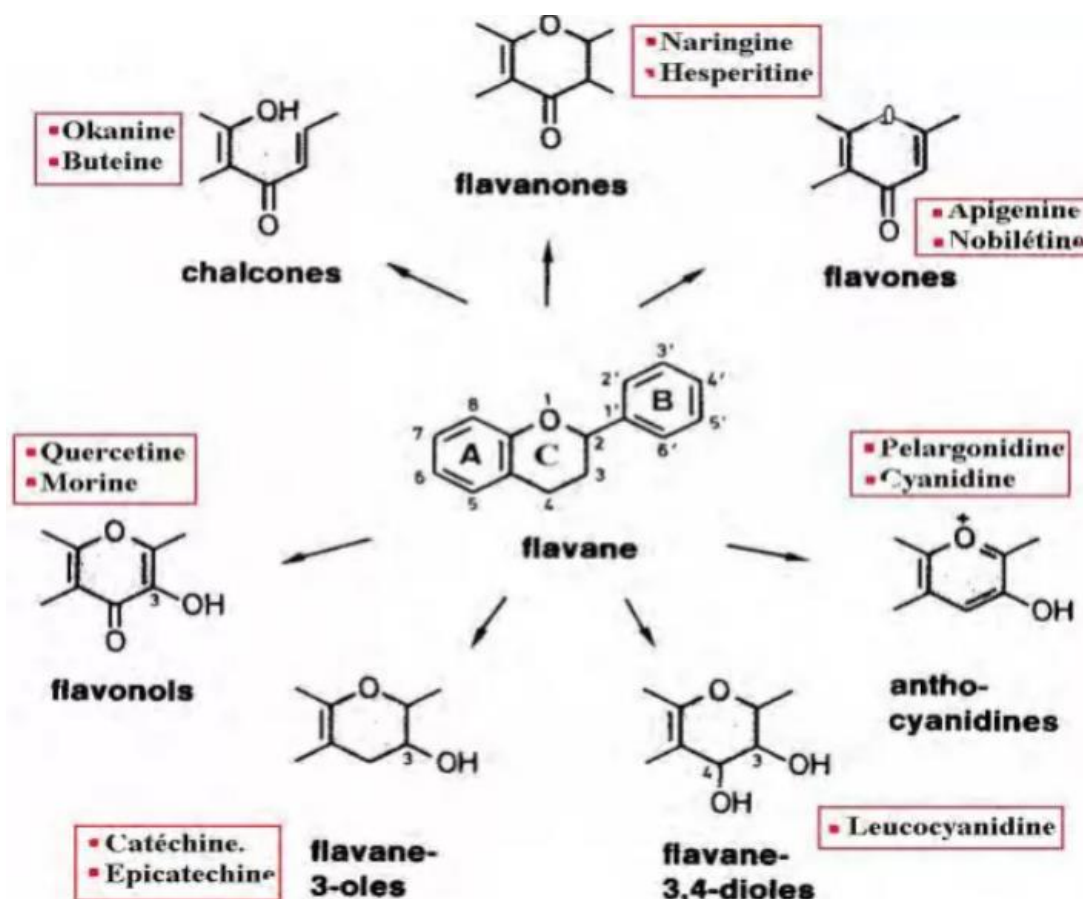
- ✓ Sasmita N., 2018. Species Test of *Morus alba*, *Morus cathayana* and *Morus nigra* on Agroforestry Land as Silkworm Feed (*Bombyx mori* Linn.) for Silk Yarn Quality Improvement in Bali Indonesia.
- ✓ Souza G. R., Oliveira-Junior R. G., Diniz T. C., Branco A., Lima-Saraiva S. R. G., Guimarães A. L., ... and Costa M. P., 2018. Assessment of the antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Morus nigra* L.(Moraceae). *Brazilian Journal of Biology*, 78(2), 248-254.
- ✓ Sývacý A., Sökmen M., 2004. Seasonal changes in antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin constituent of the stems of two *Morus* species (*Morus alba* L. and *Morus nigra* L.). *Plant Growth Regulation*, 44(3), 251-256.
- ✓ Thabti I., Marzougui N., Elfalleh W., and Ferchichi A., 2011. Antioxidant composition and antioxidant activity of white (*Morus alba* L.), black (*Morus nigra* L.) and red (*Morus rubra* L.) mulberry leaves. *Acta botanica gallica*, 158(2), 205-214.
- ✓ Yiğit N., Yiğit D., Özgen U., Aktaş A. E., 2007. Anticandidal activity of black mulberry (*Morus nigra* L.). *Türk. Mikrobiyol. Cem. Derg.*, 37, 169-173.



**Annexe 1.** Les différents niveaux de mécanismes anti-oxydants (Remmelt, 2013).



**Annexe 2.** Carte de localisation de la zone d'étude (A) Ville de Batna, (B) Municipalités de Batna (Issam *et al.*, 2017).



**Annexe 3.** Définition de différents types de flavonoïdes à partir du squelette flavane (Dacosta, 2003 et Louis, 2004).

**Annexe 4.** Absorbance des standards en fonction de concentration.

C (mg/ml)	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625
A	0,869	0,386	0,204	0,103	0,055	0,032	0,019

Polyphénole

C (mg/ml)	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625
A	3	2,153	1,121	0,606	0,362	0,236	0,19

Flavonides



# Résumés

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم النشاط المضاد للأكسدة والمضاد للبكتيريا لمستخلصات الإيثانول من أوراق التوت الأسود ، في النهج الأول قمنا باستخراج وتقييم محتوى البوليفينول الكلي و الفلافونويد. يقدر محتوى البوليفينول الكلي بـ (0.21 مجم EAC / مجم DM). قيمة مركبات الفلافونويد هي (0.011 مجم EQ / مجم DM) الجزء الثاني من دراستنا يتكون من إجراء توليف لعدة مقالات حول النشاط المضاد للأكسدة والبكتيريا لهذا النبات ، وأظهرت النتائج أن النشاط المضاد للأكسدة من التوت الأسود ، يُظهر تباينًا موسميًا ، أظهرت دراسة تباين نشاط مضادات الأكسدة أن BHT كان أكثر مضادات الأكسدة فعالية. أظهر التقييم باستخدام مستخلصات الإيثانول أن مستخلص *M. nigra* له أفضل تأثير مضاد للأكسدة. تُظهر العلاقة بين تركيزات فيتامين ج والنسبة المئوية لتثبيط DPPH أي مضادات الأكسدة تعتبر قوية جدًا إذا كان تركيزه في 50 أقل من 50 مجم / مل. أظهرت دراسة النشاط المضاد للبكتيريا لعصير *Morus nigra* الطازج أن الأنواع سالبة الجرام التي تعطي منطقة أقصى للتثبيط. تم اختبار الأنشطة المضادة للبكتيريا للميثانول والمستخلصات المائية لثمار وأوراق *M. nigra* ضد مسببات الأمراض البكتيرية عن طريق طريقة الانتشار القرصي. أظهرت مستخلصات الإيثانول والميثانول والأسيتون والكورفورم أقصى تثبيط. من بين جميع المضادات الحيوية ، أظهر النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلصات *Morus nigra* نشاطًا ضد معظم الكائنات الحية الدقيقة التي تم اختبارها ، وكان مستخلص الهكسان هو الأكثر فاعلية ، وقد سمحت نتائج هذا العمل لتأكيد أن التوت الأسود هو غني بالفلافونويد والبوليفينول. وله نشاط مضاد للأكسدة ومضاد للبكتيريا فعال للغاية.

**كلمات مفتاحية:** توت الاسود , المضاد للاكسدة , المضاد للبكتيريا , الفينولات , الفلافونيد .

## Résumé

Cette étude vise à évaluer l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'éthanol des feuilles de *Morus nigra*, Dans une première approche nous avons réalisé l'extraction et l'évaluation du contenu des polyphénols totaux et des flavonoïdes. La teneur en polyphénols totaux est estimée à (0,21 mg EAC / g MS), la valeur des flavonoïdes est de (0,011 mg EQ / g MS). La deuxième partie de notre étude consiste à réaliser une synthèse de plusieurs articles sur l'activité étudiée, les résultats montrent que l'activité antioxydante de *Morus nigra*, présente une variation saisonnière, Cependant un autre l'étude a montré que le BHT est plus efficace pour l'extraction. par contre l'éthanol est la meilleur effet antioxydant pour notre plant. La relation entre les concentrations en vitamine C et le pourcentage d'inhibition de la DPPH montre que l'antioxydant est considéré comme très puissant. L'étude de l'activité antibactérienne du jus frais de *Morus nigra* par zone d'inhibition avec des antibiotiques sélectionnés montre que les espèces Gram négatives qui donnent une zone maximale d'inhibition, les activités antibactériennes du méthanol et des extraits aqueux des fruits et des feuilles de *M. nigra* ont été testées contre les pathogènes bactériens par la méthode de diffusion sur disque. Les extraits d'éthanol et méthanol et d'acétone, chloroforme montraient une inhibition maximale. Parmi tous les antibiotiques, L'Activité antibactérienne des extraits de *Morus nigra* à l'aide de plusieurs solvants montrait une activité contre la plupart des microorganismes testés est l'extrait d'hexane est le plus efficace les résultats de ce travail ont permis de confirmer que le *Morus nigra* est riche en flavonoïdes, polyphénols et possède une activité antioxydante et antibactérien très efficaces.

**Mots clés:** *Morus nigra* L. Polyphénols flavonoïdes DPPH activité antioxydant activité antibactériennes

## Abstract

This study aims to evaluate the antioxidant and antibacterial activity of ethanol extracts from the leaves of *Morus nigra*. In a first approach we performed the extraction and evaluation of the total polyphenol content by adopting and flavonoid. The total polyphenol content is estimated at (0.21 mg EAC / g MS). The value of flavonoids is (0.011 mg EQ / g DM) The second part of our study consists of carrying out a synthesis of several articles on the antioxidant and antibacterial activity of this plant. The results show that the antioxidant activity of *Morus nigra*, presents a seasonal variation. However, the study of the variation of antioxidant activity according to the extraction solvents showed that BHT was the most effective antioxidant. Evaluation using ethanol extracts shows that *M. nigra* extract has the best antioxidant effect. The relationship between vitamin C concentrations and the percentage of DPPH inhibition shows which antioxidant is considered very potent. The study of the antibacterial activity of fresh juice of *Morus nigra* by zone of inhibition with selected antibiotics shows that the Gram-negative species that gave a maximum zone of inhibition. The antibacterial activities of methanol and aqueous extracts of fruits and leaves of *M. nigra* were tested against bacterial pathogens by the disc diffusion method. The extracts of ethanol and methanol and acetone, chloroform showed maximum inhibition. . the antibacterial activity of *Morus nigra* extracts using several solvents showed activity against most of the microorganisms tested is the hexane extract is the most effective the results of this work confirmed that *Morus nigra* is rich in flavonoids and polyphenols . and has a very effective antioxidant and antibacterial activity.

**Keywords:** *Morus nigra* L. polyphenols. flavonoids. DPPH. antioxidant activity. antibacterial activity.