



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Amar Thelidji- Laghouat

FACULTE : Sciences

DEPARTEMENT : Biologie

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par : M^{lle} Debbab Soraya

DOMAINE : Science de la Nature et de la Vie

FILIERE : Biologie

OPTION : Biochimie des Produits Naturels

Thème

**Etude phytochimique et biologique des différents extraits
d'*Alpinia officinarum***

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Grade	Qualité
LEBOUKH Mourad	Maitre Assistant Classe A	Président
SIFI Ibrahim	Maitre Assistant Classe A	Examineur
GOUZI Hicham	Maitre de Conférences Classe A	Rapporteur

Promotion : Juin - 2015

Remerciements

Tout d'abord, louange à Dieu qui nous a donné la santé, la force et le courage dans la vie et tout au long de notre cycle d'étude.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Monsieur Gouzi Hicham, Maître de Conférences au département de biologie de l'université Amar Téliidji de Laghouat, responsable de cette étude, pour avoir accepté de m'encadrer, pour le choix de thème et pour avoir participé à la correction de ce manuscrit afin de réaliser cette étude, ses conseils pratiques, techniques, et scientifiques durant nos travaux du mémoire, Merci infiniment.

Au terme de ce travail, qui a été réalisé dans les laboratoires du département de Biologie, je tiens à remercier tous les ingénieurs de laboratoire pour leur accueil et leur patience.

Je voudrais aussi remercier les membres de jury qui ont bien voulu trouver un peu de temps pour évaluer mon travail et pour les conseils prodigués et l'apport d'information judicieuses dans le parachèvement de ce labeur.

Finalement, toute ma gratitude va à mes parents qui n'ont jamais douté de moi et qui m'ont aidé et encouragé tout au long de mes études.

Il demeure important pour moi d'exprimer mes plus sincères remerciements à toutes celles et ceux qui, de près ou loin, m'a aidé à réaliser ce projet de fin d'étude.

Dédicaces

Comme le parcours de la vie m'a donné l'occasion d'exprimer ma profonde gratitude, Je dédie cet humble travail à :

Mon Père Azazi

Qui ma beaucoup aidé, conseillé et encouragé.

En vous, je vois un père dévoué à sa famille. Ta présence en toute circonstance m'a maintes fois rappelé le sens de la responsabilité.

Ma Mère Fatoum

En vous, je vois la maman parfaite, toujours prête à se sacrifier pour le bonheur de ses enfants.

Merci pour tout : Votre courage, votre bravoure, votre générosité et votre motivation.

Mes sœurs et frères

Mounir, Nadjoua, Amel, Mohamed, Abdou, Khadra, Fougou, Sebkhâoui, Saïd, Yacine merci d'avoir me soutenue et encouragé durant mon cursus.

Aux petites Ichrak, Midou, Oussama, Amoula, Manar, Zakaria, Saleh, Ayoub, Malek, Zaineb et Mohamed aded elghani.

A tous les membres de ma famille petits et grands qui me soutient à réussir. Grâce à elle j'ai enregistré le succès.

Et enfin,

À tous mes amis Zohra, Fatima, Fraïha, Rabab, Barkahoum, Imane, Sabah, Sihem, Tourkia, Akila, Dounia, Zahia, et à tous les étudiants du département de biologie surtout la section de biochimie.

ملخص

ان دراسة نوع الخولنجان (*Alpinia Officinarum*) الذي ينتمي إلى عائلة الزنجبيليات، التي ركزت من جهة على الفحص الكيميائي النباتي لتوصيف عائلات مختلفة من المركبات الكيميائية الواردة في الجذور ومن جهة اخرى تأثير مذيبي الاستخراج على النشاط المضاد للأكسدة ومضاد للبكتيريا. تم إعداد أربعة مستخلصات خامة جافة من هذا النوع باستخدام المذيبات المختلفة بأقطاب مختلفة (كلوروفورم، والأسيتون، والميثانول، وميثانول - ماء 70:30 ح / ح). الميثانول يوفر أفضل مردود استخلاص بنسبة 10.5%. الاختبارات الفيتوكيميائية تكشف عن أن التانويدات، الفينولات، و الفلافونويدات والمركبات المرجعة هي المكونات الأكثر وفرة في مذيبيات (*Alpinia Officinarum*)

المذيبات القطبية (الأسيتون، والميثانول، والميثانول / الماء) غنية بالفينولات، و الفلافونيدات والكاروتينويدات بكميات متغيرة.

وأظهر تقييم نشاط مضادات الأكسدة من خلال طريقة الحد من الحديد (FRAP) ومقتطفات الجذور الحرة DPPH أن مستخلص الميثانول لديه القدرة الأقوى المضادة للجزيئات ($EC_{50} = 0.42$ ملغ / مل) في حين أن مستخلص الأسيتون لديه أعلى سلطة خفض ($EC_{50} = 1.21$ ملغ / مل). تقييم النشاط المضاد للبكتيريا عن طريق أسلوب نشر على الوسط Muller-Hinton الهلامي أظهر ان بكتيريا *Staphylococcus aureus* هي الأكثر حساسية بين أنواع البكتيريا المختبرة ولا سيما مع المذيب الأسيتون والكلوروفورم.

الكلمات المفتاحية: *Alpinia Officinarum* ، دراسة فيتوكيميائية، الاستخلاص بالمذيبات، مركبات الفينول، مركبات الفلافونويد، النشاط المضاد للأكسدة، والنشاط المضاد للميكروبات..

Résumé

L'étude de l'espèce *Alpinia Officinarum* qui appartient à la famille des Zingibéracées, a porté d'une part sur un screening phytochimique visant à caractériser les différentes familles de composés chimiques contenus dans le rhizome et d'autre part l'effet du solvant d'extraction sur le pouvoir antioxydant et l'activité antibactérienne. Quatre extraits bruts secs ont été préparés à partir de cette espèce en utilisant différents solvants et de différentes polarités (chloroforme, acétone, méthanol et un mélange méthanol-eau 70-30 (v/v)). Le méthanol donne un meilleur rendement d'extraction de 10.5%. Les tests phytochimiques révèlent que les tanins, les phénols, les flavonoïdes et les composés réducteurs sont les constituants les plus abondants dans les extraits d'*Alpinia officinarum*.

Les solvants polaires (acétone, méthanol et méthanol/eau) sont riches en phénols, flavonoïdes et en caroténoïdes avec des teneurs variables.

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de réduction de fer (FRAP) et celle du piégeage de radical libre DPPH des extraits a montré que l'extrait méthanolique a le pouvoir antiradicalaire le plus puissant ($EC_{50} = 0.42$ mg/mL) tandis que l'extrait acétonique a le pouvoir antiradicalaire le plus élevé ($EC_{50} = 1.21$ mg/mL).

L'évaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur le milieu Muller-Hinton gélosé montre que seule la bactérie *Staphylococcus aureus* est la plus sensible parmi les bactéries testées en particulier vis-à-vis des extraits acétoniques et chloroformiques.

Mots clés : *Alpinia Officinarum*, étude phytochimique, solvant d'extraction, composés phénoliques, flavonoïdes, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

Abstract

The study of the specie *Alpinia Officinarum* that belongs to the family Zingiberaceae, focused in part on the phytochemical screening to characterize the various families of chemical compounds contained in the rhizome and in the author part the effect of extraction solvent on the antioxidant and antibacterial activity. Four dry crude extracts were prepared from this specie by using different solvents and different polarities (chloroform, acetone, methanol and a methanol-water 70:30 (v / v)). Methanol gives a better extraction yield of 10.5%. The phytochemical tests reveal that the tannins, phenols, flavonoids and reducing compounds are the most abundant constituents in extracts of *Alpinia officinarum*.

Polar solvents (acetone, methanol and methanol / water) are rich in phenols, flavonoids and carotenoids with variable contents.

The evaluation of the antioxidant activity by the ferric reducing power (FRAP) and the free radical scavenging DPPH extracts showed that the methanol extract has the most powerful anti-radical power ($EC_{50} = 0.42 \text{ mg / mL}$) while the acetone extract has the highest reducing power ($EC_{50}=1.21 \text{ mg/ mL}$).

The evaluation of antibacterial activity by diffusion method on Muller-Hinton agar medium shows that only the bacterium *Staphylococcus aureus* is the most sensitive among the tested bacteria in particular with the acetone and chloroform extracts.

Keywords: *Alpinia officinarum*, phytochemical study, solvent extraction, phenolic compounds, flavonoids, antioxidant activity, antimicrobial activity.

Sommaire

Résumé	IV
Liste des figures	XI
Liste des photos	XII
Liste des abréviations	XIII
Liste des Tableaux	X
Introduction	1
Synthèse bibliographiques	
I. Généralité sur les plantes médicinales et la phytothérapie.....	3
I.1. la phytothérapie.....	3
I.1.1. Différents types de la phytothérapie.....	3
I.1.2. Les avantages de la phytothérapie.....	4
I.2. Les plantes médicinales.....	4
I.3. Le petit galanga <i>Alpinia officinarum</i>	6
II. Principales substances active d'origine végétales.....	8
II.1. définition de métabolites secondaires.....	8
II.2. Classe de métabolites secondaires.....	9
II.2.1. Les alcaloïdes.....	9
II.2.2.les huiles essentielles.....	10
II.2.3.Les composé phénoliques.....	11
III. Activités biologiques des polyphénols.....	16
III.1 Activité antioxydante des polyphénols.....	16
II.1.1 Modes d'action des polyphénols	17
III.2. Activité antimicrobienne des polyphénols.....	18
Matériels et méthodes	
I. Matériels.....	21
I.1 Matériel biologique	21
I.2 Matériel chimiques	21
II. Méthodes.....	21
II.1 Broyage et extraction.....	21
II.2 Calcul du rendement.....	23
II.3 Tests phytochimiques.....	23
II.4 Dosage des composés phénoliques.....	25
II.4.1 Dosage des phénols totaux.....	25
II.4.2 Dosage flavonoïdes.....	26
II.5. Dosage des caroténoïdes.....	27
III. Evaluation de l'activité antioxydante.....	27

III.1 Méthode de piégeage du radical libre DPPH.....	28
III.2 Méthode de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing antioxidant power)	29
IV. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	30
V. Analyses des données.....	32
Résultats et discussion	
I. Rendement d'extraction.....	33
II. Tests phytochimiques.....	34
III. Teneur totale en caroténoïdes, en phénols totaux et en flavonoïdes <i>d'Alpinia officinarum</i>	35
IV. Evaluation de l'activité antioxydante.....	37
IV.1. Test du radical DPPH [•]	37
IV.2. Test de FRAP.....	40
V. L'activité antibactérienne.....	42
V.1. Antibiogramme.....	42
V.2. Effet antibactérienne des extraits <i>d'Alpinia officinarum</i>	42
V. 3. Evaluation de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	45
Conclusion	47
Références bibliographique	49
Annexe	57

Liste des tableaux

	Page
Tableau 01. Origines des souches utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne.	30
Tableau 02. L'effet de solvant sur le rendement d'extraction et les concentrations des extraits d' <i>alpinia officinarum</i>	33
Tableau 03. Résultats des tests phytochimiques sur l' <i>alpinia officinarum</i>	34
Tableau 04. Effet du solvant d'extraction sur les teneurs en caroténoïdes, en phénols totaux et en flavonoïdes d' <i>Alpinia officinarum</i>	35
Tableau 05. Les valeurs d'EC ₅₀ des activités antioxydantes des extraits d' <i>Alpinia officinarum</i> .	39
Tableau 06. Les valeurs des diamètres d'antibiogramme.	42
Tableau 07. Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices des extraits	46

Liste des figures

	Page
Figure 01. Image illustre les raciness <i>Alpinia officinarum</i>	06
Figure 02. Classification des alcaloïdes selon leur noyau hétérocyclique	09
Figure 03. principaux acides hydroxycinamiques	11
Figure 04. principaux acides hydroxybenzoïques	12
Figure 05. principaux types de coumarines	12
Figure 06. Structure chimique de base des flavonoïdes	13
Figure 07. structure des squelettes de base des flavonoïdes	14
Figure 08. exemple de tanin hydrolysable (pentagalloyglucose)	15
Figure 09. Structure chimique d'un tanin condensé (proanthocyanidine)	15
Figure 10. Chélation des métaux de transition par les flavonoïdes	17
Figure 11. Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.	26
Figure 12. Courbe d'étalonnage de quercétine (mg/ml) pour le dosage des flavonoïdes.	27
Figure 13. DPPH avant et après réduction	28
Figure 14. Présentations graphiques des pourcentages de DPPH résiduels en fonction de concentration des extraits et de l'acide ascorbique.	38
Figure 15. Résultats de la mesure de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques des extraits d' <i>A. Officinarum</i> et de l'acide ascorbique par la FRAP	41
Figure 16. Zones d'inhibition des extraits d' <i>Alpinia officinarum</i> sur les souches bactérienne.	43
Figure 17. Comparaison entra les diamètres d'inhibition les extraits d' <i>Alpinia officinarum</i> et l'antibiotique sur les souches bactérienne.	45

Liste des photos

	page
Photo 01. Photo illustre les raciness <i>Alpinia officinarum</i>	21
Photo 02. la poudre obtenue après le broyage de matériel végétal de plante	21
Photo 03. les extraits obtenus après filtration	22
Photo 04. Aspet des résidus obtenus après solubilisation dans le méthanol	22
Photo 05. les résultats après 30 min d'incubation à température ambiante et é labri	37
Photo 06. : les résultats de teste FRAP en présence de l'extrait à différentes concentration.	40
Photo 07. Résultats des méthodes de diffusion sur milieu	44

Liste des abréviations

°C: Degrés Celsius.

µl : microlitre.

A. *Officinarum*: *Alpinia officinarum*

ac: Acide

AEAC: Ascorbic acid Equivalent Antioxidant Capacity

AMP : Ampicilline.

ATCC: American Type Culture Collection.

BHIB: Brain-Heart Infusion Broth

C: Carbone

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

DO: Densité Optique.

DPPH : 2,2-DiPhényl-1-PicrylHydrazyl

EAG: Equivalent d'Acide Gallique

EC₅₀: Efficient concentration 50

FRAP: Ferric reducing antioxidant power

g/l : Gramme par Liter

h : Heure

HE: Huile Essential

mg: MilliGrame

min : Minute

ml : MiliLitre.

mm : MilliMètres.

nm : NanoMètre

rpm : Rotation Par Minute

UV-Vis : Ultra Violet-Visible

V: Volume

Introduction

Pendant longtemps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal recours de la médecine de nos grands parents, malgré l'important développement de l'industrie pharmaceutique qui a permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladies souvent mortelles. Environ 80 % de la population mondiale profite des apports de la médecine traditionnelle à base des plantes reconnaissant ainsi les savoirs empiriques de nos ancêtres (EL Rhaffari et Zaid, 2004).

Dans les dernières décennies il y eu un intérêt croissant pour l'étude des plantes médicinales et leur utilisations traditionnelles dans différentes régions du monde (Muthu et al., 2006). Selon certains auteurs, les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimique et ils possèdent aussi un très large éventail d'activités biologique (Bérubé-Gagnon, 2006).

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (Maurice, 1997).

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. Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes (Bahorun et al., 1996).

La reconnaissance des composés phénoliques comme des antioxydants naturels et des agents antibactériens est maintenant bien acquise et est pour une part à l'origine du regain d'intérêt que l'on port à ces composés dans le domaine de la nutrition et de la pharmacologie. En effet, un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur de leur implication dans la prévention des diverses pathologies associées au stress oxydant telles que les cancers, les maladies cardio-vasculaire ou maladies inflammatoires (Macheix, 2005).

La famille des Zingibéracée est une grande famille qui regroupe environ 50 genres et près de 1300 espèces dans le monde entier, principalement distribués dans le Sud et le Sud-Est d'Asie. Les plantes appartenant à cette famille botanique sont caractérisées par leurs rhizomes tubéreux ou non tubéreux, qui ont des fortes propriétés aromatiques et médicinales. Elles sont connues sous le nom de gingembre qui est largement utilisé dans les remèdes traditionnels et appliquée comme un additif alimentaire (Chen et al., 2008).

Le Petit galanga (*Alpinia officinarum* Hance) est un rhizome aromatique piquant et il est un membre de la famille gingembre (*Zingiberaceae*) (Eumkeb et *al.*, 2011) qu'a plusieurs activités pharmacologiques notamment anti-inflammatoire, analgésique, antipyrétique, antioxydantes, antibactérien et antifongique (Phornchai et *al.*, 2015). Les études chimiques et pharmacologiques des rhizomes de petit galanga révélé trois grands groupes de constituants chimiques: flavonoïdes, des glycosides et diarylheptanoïdes (Eumkeb et *al.*, 2011).

D'après nos connaissance aucune étude n'a était effectuée sur l'effet du solvant d'extraction sur les propriétés biologiques de le petit galanga (*Alpinia officinarum*). Pour cela, l'objectif principal de notre travail est d'étudier l'effet du solvant d'extraction sur les activités antioxydantes et antibactérienne d'*Alpinia officinarum*.

Ce mémoire est scindé en trois parties :

- La première partie, est une synthèse bibliographique qui résume les principales caractéristiques de l'espèce *alpinia officinarum* appartenant à la famille de zingibéracées, l'effet thérapeutique et des substances actives végétales.
- La deuxième partie du travail est expérimentale, elle est consacrée à :
 - L'extraction des composés phénoliques par différentes solvants.
 - La détermination des différentes classes chimiques par criblage phytochimique.
 - La détermination des phénols totaux, des flavonoïdes et des caroténoïdes.
 - L'évaluation in vitro de l'effet antioxydant des extraits selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH et celle de la réduction de fer FRAP.
 - L'évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits vis-à-vis des souches bactériennes.
- Dans la troisième partie, nous discuterons les résultats ainsi obtenus lors de cette étude et ce manuscrit est achevé par une conclusion.

Synthèse bibliographique

I. Généralité sur les plantes médicinales et la phytothérapie

I.1. la phytothérapie

La phytothérapie ; du grec, *phytos*, plante, et *therapia*, soins, c'est-à-dire le traitement des maladies par les plantes ou par leurs extrait (Houdret, 2004). Etymologiquement c'est le traitement par les plantes. C'est une méthode thérapeutique qui utilise l'action des plantes médicinales. (Pribitkin et Boger, 2001).

I.1.1. Différents types de la phytothérapie

I.1.1. 1. Aromathérapie

C'est une thérapeutique qui utilise les essences des plantes ou huiles essentielles, substances aromatiques secrétées par de nombreuses familles de plantes (Strang, 2006). Elle est devenue une médecine parallèle à part entière. Les huiles essentielles se retrouvent aussi dans des topiques médicamenteux comme principes actifs ou comme excipients (Malek et *al.*, 2015).

I.1.1. 2. Gemmothérapie

Se fonde sur l'utilisation d'extraits alcoolique de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les radicules (Strang, 2006).

I.1.1. 3. Herboristerie

Correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne. L'herboristerie se sert de la plante fraîche ou séché ; elle utilise soit la plante entière, soit une partie de celle si (écorce, fruits, fleurs). La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion ou macération. Ces préparations existent aussi sous forme plus moderne de gélule de poudre de plante sèche que le sujet avale (Strang, 2006).

I.1.1. 4. Phytothérapie pharmaceutique

Utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. Ils sont présentés sous forme de sirop, de gouttes, de gélules, de lyophilisats (Strang, 2006).

I.1.2. Les avantages de la phytothérapie

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages.

N'oublions pas que de tous temps à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont pas eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes ; rhume ou tous ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria (Iserin *et al.*, 2001) et avec la mode du « naturel » ou du « bio », la phytothérapie est de plus en plus utilisée (Avenel, 2015).

Aujourd'hui, la phytothérapie occupe une place importante dans le patrimoine culturel de la société par leurs vertus curatives de plusieurs types de maladies, considérée comme moins cher, sans effets indésirables. Par ailleurs, le danger réel de cette thérapie réside dans le traitement des maladies chroniques telles que les infections urinaires (Ghourri *et al.*, 2014), l'asthme ou l'arthrite (Iserin *et al.*, 2001).

I.2. Les plantes médicinales

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (Farnsworth *et al.*, 1986). De tout temps les plantes ont été utilisées pour soigner et introduites comme principe actif ou agent parfumant de topiques médicamenteux (Avenel, 2015)

Les plantes ont fourni à l'homme les drogues utiles pendant des siècles. Malgré la disponibilité de différentes approches pour la découverte thérapeutique, les produits naturels restent l'un des meilleurs réservoirs de la médecine traditionnelle (Malek *et al.*, 2015).

Environ 3500 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (Elqaj *et al.*, 2007).

I.2.1. parties utiles des plantes médicinales dans le domaine de la phytothérapie

Les principes actifs qui sont derrière l'effet thérapeutique des plantes se trouvent réparties d'une manière non équitable entre les différentes parties de ces dernières, dont certaines en contiennent dans les feuilles par exemple et d'autres dans les racines. C'est pour cela dans certaines recommandations de leur usage, il y a lieu à préciser la partie de la plante à appliquer. Dans le recours à leur utilisation, les feuilles sont répandues (26.3%), suivies par les fruits (11.32%), la plante entière (9.74%), des racines (8.68%), les graines (6.58%), la

floraison des sommités (4.74%), parties aériennes (4.21%), et fleurs (4%) (Elbeyrouthy et *al.*, 2008).

I.2.2. Formes d'application et mode d'emploi des plantes médicinales

Les principales formes d'application des plantes médicinales se présentent par : décoction (40.23%), infusion (15.1%), macération (11.9%), poudre (8.50%), et jus (5.41%). Les plantes médicinales sont principalement utilisées pour des usages externes sur la région affectée, mais plusieurs sont utilisées par voie orale (Elbeyrouthy et *al.*, 2008). Aujourd'hui, il existe la poudre de plante totale cryobroyée, plus pratique et plus concentrée, proposée sous forme de gélules. La technique du cryobroyage permet de sauvegarder l'intégralité des constituants de la plante, alors que dans un broyage classique, les vitamines, les enzymes, les substances volatiles et de nombreux autres constituants sont détériorés en partie (Schauenberg, 2000).

I.2.3. Intérêts d'utilisation des plantes médicinales

Les plantes médicinales sont généralement admises par beaucoup de personnes dans le monde entier que leurs effets bénéfiques peuvent être obtenus par l'ingestion de produits végétaux. Ils se comportent comme des médicaments authentiques, car les substances chimiques dont ils sont constitués, peuvent avoir une activité biologique chez l'homme (Fragoso et *al.*, 2008).

Beaucoup de végétaux et de certains compléments alimentaires sont une bonne source d'antioxydants et d'anti-inflammatoires. Ces derniers, peuvent être utilisés dans la prévention de complication de colon et de cancer du sein (Wargovich et *al.*, 2001). Les composés chimiques dans les fruits, les légumes, d'épices et des herbes médicinales jouent un rôle de protection contre des nombreuses maladies chronique chez l'homme, telles que les maladies cardiovasculaires (Tsao et *al.*, 2004).

L'importance économique des plantes médicinales occupe une place importante dans les marchés nationaux des pays en développement. Ainsi, l'Allemagne importe chaque année plus de 75 millions d'euros de plantes médicinales, provenant majoritairement de pays en développement et en transition. La vente durable de matériel végétal peut donc considérablement améliorer la balance commerciale des pays exportateurs et représente un facteur important de développement (Kasperek et al-Janabi, 2008).

I.2.4. Risques d'utilisation des plantes médicinales

La prise des plantes s'effectue soit sous leurs formes brutes soit sous forme de recettes (décoction, poudre ou infusion) qui peut provoquer des intoxications voire même des effets secondaires pour d'autres organes (cœur, poumons, foie, vésicule biliaire...) sachant que certaines espèces employées sont toxiques et d'autres deviendront toxiques à forte doses ou à utilisation répétée (Mohammadi *et al.*, 2014).

I.3. Le petit galanga *Alpinia officinarum*

Notre étude est focalisée sur l'investigation préliminaire, d'une plante appelée *alpinia officinarum*, cette plante (figure 01) est largement utilisée par la population locale comme un aromatisant du café ou comme une tisane. Cependant son utilisation est limitée à un usage traditionnel. Pour cela nous avons tenté d'établir des bases scientifiques pour son exploitation dans le domaine pharmaceutique.

Le Petit galanga est un plant annuel bien connue dans la région de Sud-Est d'Asie (Saeed *et al.*, 2014) et largement cultivée dans le sud de la Chine (Xusheng *et al.*, 2012), Taiwan (Hisashi, 2009) en Inde, le Vietnam et la Thaïlande (Griangsak *et al.*, 2010). Il est l'un des importants médicaments chinois traditionnels (Zhao *et al.*, 2010 ; Ling *et al.*, 2010), appartient à la famille des Zingiberaceae, qui comprend d'autres plantes médicinales importantes comme *Curcuma longa* et *Zingiber officinale* avec des propriétés médicinales bien documentés (Krishnan *et al.*, 2009).

La célèbre abbesse botaniste Hildegarde de Bingen considérait le petit galanga comme « l'épice de vie ». Cette plante est aujourd'hui encore volontiers utilisée comme remède stimulant, digestif, anti-inflammatoire et carminatif. On en utilise l'épi rhizome qui est aussi très apprécié en cuisine pour son gout piquant (Hans, 2007).



Figure 01 : Image illustre les raciness *Alpinia officinarum* (Hans, 2007)

I.3.1. Nomination d'*Alpinia officinarum*

- Nom vernaculaire arabe : Khoulonjan (خولنجان) (Benzeggouta et *al.*, 2012)
- Nom vernaculaire français : le petit galanga (Hans, 2007).
- Nom chinoise : Gao liang jiang (Liu et *al.*, 2014)

I.3.2. Systématique (Arti et *al.*, 2015 ; Ghosh et Rangan, 2013)

Règne : Plantae

Embrouchement : Angiospermes

Sous embrouchement : Monocotylédones

Ordre : Zingiberales

Famille : Zingiberaceae

Genre : *Alpinia*

Espèce : *Alpinia officinarum*

I.3.3. Description botanique

Grande plante herbacée, vivace ; (Ken et *al.*, 2008) pouvant mesurer jusqu'à 1.5 m (Hans, 2007), annuel (Jisuk et *al.*, 2009) avec des fleurs blanches, veinées de rose, à long filet (Paul et Ferdinand, 2010) en forme de lance (Iserin et *al.*, 2001) staminal. Le rhizome noueux est entouré de bandes circulaires de coloration plus claire (Paul et Ferdinand, 2010). Il ya environ 46 espèces de ce genre en Chine (Bei-Bei et *al.*, 2010) dont on utilise le rhizome qu'est piquant et aromatique (Griangsak et *al.*, 2010 ; Tram et *al.*, 2008).

I.3.4. Données phytochimique d'*Alpinia officinarum*

Parmi les nombreux constituants chimiques isolées à partir de cette plante du rhizome de petite galanga on peu cité les huiles volatiles (Ling et *al.*, 2010 ; Jisuk et *al.*, 2009), les glycosides (Tram et *al.*, 2004), les diarylheptanoïdes (Griangsak et *al.*, 2010), les monoterpènes, les phénylpropanoïdes (Xusheng, et *al.*, 2012) et les composés phénoliques (flavonoïdes et acides phénoliques) (Saeed et *al.*, 2014).

I.3.5. Application médicales d'*Alpinia officinarum*

Le rhizome du Petit galanga a été largement utilisé comme condiment pour les aliments et comme un médicament à base de plantes traditionnelles pour guérir divers maux depuis des siècles en Asie (Hui et *al.*, 2008). Il est largement utilisé pour traiter les douleurs et les ulcère gastrique et duodéal , nausées, indigestion, , le rhume (Dan et *al.*, 2012), comme

stomachique aromatique (Tao et *al.*, 2006) et carminative (Hisashi et *al.*, 2009), soulage les maux d'estomac et pour dynamiser le système circulatoire (Ning et *al.*, 2010 ;Dan et *al.*, 2012).

Le rhizome d'*Alpinia Officinarum* a longtemps été utilisé dans la pratique pour ses propriétés antioxydantes, antidiabétiques, anti-diarrhée, antiémétiques, anti-inflammatoires (Zhi-Sheng et *al.*, 2013 ; Hisashi, 2009), anti-thrombotique, antalgique (Ling et *al.*, 2010) antiarthritique, antispasmodique (Jisuk et *al.*, 2009), anti-tumorale, antibactérien et antifongiques (Griangsak et *al.*, 2010 ; Gao-jun et *al.*, 2007).

Ce médicament est efficace et bien établie à travers une longue histoire d'utilisation humaine, mais il manque un soutien scientifique (Jisuk et *al.*, 2009).

II. Principales substances actives d'origine végétale

Les plantes produisent un vaste groupe de composés organiques appartenant aux métabolites secondaire, qui fait une des originalités majeures des végétaux synthétisant des substances naturelles très diversifiées (Croteau et *al.*, 2000). En effet, à coté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides et acide nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représentent une source important de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (Macheix et *al.*, 2005).

Parallèlement au développement des utilisations des métabolites secondaires à usage thérapeutique, le domaine de la cosmétique est aussi très demandeur de substance végétales, par exemple les flavonoïdes sont utilisé à la fois en thérapeutique et en cosmétique (Minh et *al.*, 2004).

En raison, de leur diversité moléculaire (environs 12000 molécules) et de leur propriétés biologique important tels que antioxydantes, anti-inflammatoires, antivirales...etc. ; ces métabolites constituent une source inépuisable d'agents thérapeutiques pour lutter contre diverses pathologies (Samy et Gopalakrishnakone, 2008).

II.1. définition de métabolites secondaires

Les métabolites secondaires se présente par des groupes chimiques varies dont parmi eux on trouve les polyphénols, les huiles essentielles et les alcaloïdes. Ces groupes de composés sont très inégalement repartis chez les végétaux mais dont le niveau d'accumulation peut quelquefois atteindre des valeurs élevées (Macheix et *al.*, 2005).

II.2. Classe de métabolites secondaires

Sur la base de leurs origines biosynthétiques, les métabolites secondaires peuvent être divisés en trois grands groupes : les huiles essentielles, les alcaloïdes et les composés phénoliques (Croteau et *al.*, 2000).

II.2.1. Les alcaloïdes

II.2.1.1. Définition

Les alcaloïdes sont très importants en médecine en raison de leur grande activité biologique. Ils sont de faible poids moléculaire et l'on retrouve dans 20% des espèces végétales. Ce sont des composés azotés hétérocycliques, largement distribués dans les différents groupes de plantes.

Ils sont présents dans la vacuole des cellules sous forme des sels et peuvent en être extrait par de l'eau acidifiée, de l'éthanol, ou par d'autres solvants organiques (Csek et *al.*, 2006).

II.2.1.2. Classification

Ils contiennent plus de 10 000 composés dont le premier à avoir été découvert en 1803 par Derosne, est la narcotine (noscapin) de l'opium selon leurs hétérocycles, il existe plusieurs sous-classes d'alcaloïdes qui sont présentés dans la (figure 02) (Csek et *al.*, 2006).

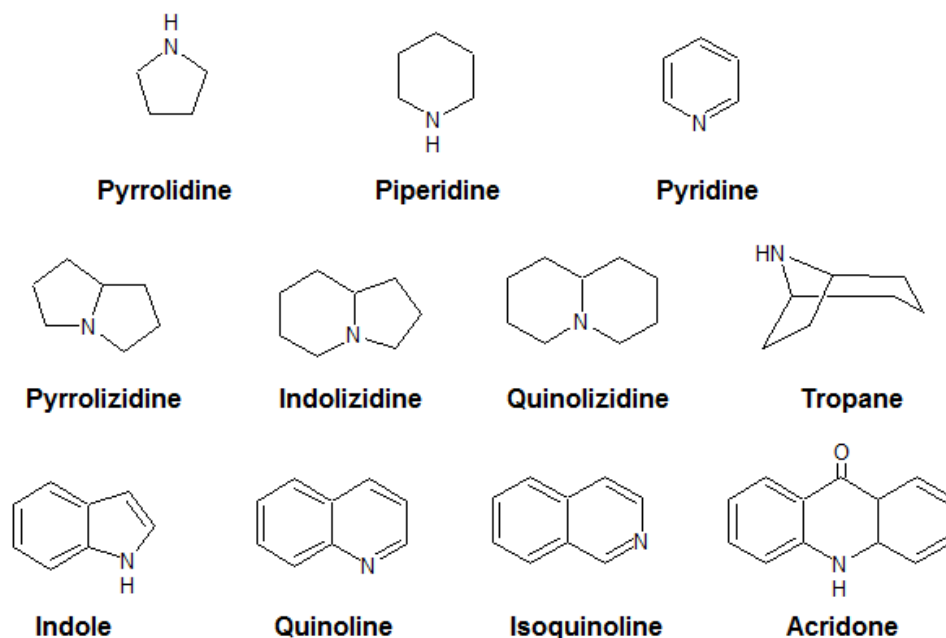


Figure 02 : Classification des alcaloïdes selon leur noyau hétérocyclique (Cseke et *al.*, 2006).

II.2.1.3. Exemples d'activité biologique des alcaloïdes

Les alcaloïdes présentent diverses activités biologiques, témoins de leurs productions par les végétaux. Certains sont des poisons pour l'homme et le bétail comme la strychnine des graines de la loganiaceae *Strychnis nuxvomica*, d'autre sont des drogues (cocaine des feuilles d'*Erythroxylon coca*). Certains ont des vertus thérapeutiques (morphine des Papaveraceae), d'autres présentent des activités antimicrobiennes comme les calystegines antivirales des feullet de *Morus* (Moraceae) et l'écorce des Berberidaceae antibactériennes (Louis, 2004).

II.2.2.les huiles essentielles

II.2.2.1. Définition

Les huiles essentielles sont des substances organiques aromatiques liquides qu'ont trouve naturellement dans diverses parties des arbres, des plantes, des épices...etc. Elles sont très concentrées, volatiles et sensibles à la décomposition sous l'effet de la chaleur (Turgeon, 2001).

II.2.2.2. Classification

La composition chimique d'une huile essentielle est assez complexe, on y trouve généralement de nombreuse constituants appartenant principalement à deux grandes familles chimiques : les composés terpéniques et les composés aromatique dérivés du phénylpropane.

- Les composés terpéniques sont formés par condensation d'unités isopréniques (en C5) et comprennent : les monoterpènes (en C10), les sesquiterpènes (en C15), les diterpènes (en C20) et les triterpènes (en C30).
- Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane ont une biogenèse différente de celle des terpènes. On peut citer l'acide et l'aldéhyde cinnamique (HE de cannelle), l'eugénol ((HE de girofle), le carvacrol (HE d'origan), l'anéthol et l'aldéhyde anisique (HE de badiane, d'anis et fenouil) qui sont les principaux membres de cette famille (Chami, 2005).

II.2.2.3. Exemples d'activité biologique des huiles essentielles

A titre d'exemple, la composition de ces huiles essentielles et en particulier, la nature de leurs composés majoritaires sont responsables de l'activité antimicrobienne. En effet, il est admis que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles se classe dans l'ordre décroissant selon la nature de leurs composés majoritaires : phénols > alcool > aldéhydes > cétones > oxydes > hydrocarbures > esters (Chami, 2005).

II.2.3. Les composés phénoliques

II.2.3.1. Définition

Les polyphénols sont des molécules spécifiques du règne végétal (Bruneton, 1993). Bien qu'étant très diversifiés, ils ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonction hydroxyles (Macheix et *al.*, 2005). Ils sont présents partout ; dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux (Middleton et *al.*, 2000). Ils sont étudiés dans le but de trouver de nouvelles structures modèles pour le développement de médicaments thérapeutiques ou protecteurs (Bossokpi, 2003).

II.2.3.2. Classification

Les composés phénoliques peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones. Ces molécules sont généralement trouvés conjuguées aux sucres et les acides organiques. (Crozier et *al.*, 2006).

II.2.3.2.1 les phénols simples et les acides phénoliques

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique.

En phytochimie l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïques et cinnamiques. (Macheix et *al.*, 2005)

Acides hydroxycinnamiques

Dérivent de l'acide cinnamique et ont une structure générale de base de type (C6-C3). Existents souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent une réactivité chimique importante de ces molécules (Figure 03) (Macheix et *al.*, 2005).

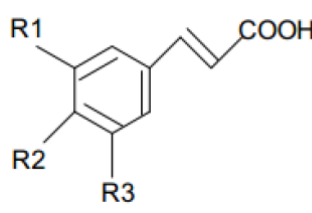
	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

Figure 03: principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Machado et Cheynier, 2006).

Acides hydroxybenzoïques

Sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure générale de base de type (C6-C1). Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides. Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans (la figure 04) (Macheix et *al.*, 2005).

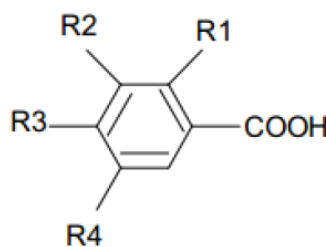
	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

Figure 04 : principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Machado et Cheynier, 2006).

Coumarines

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale (Macheix et *al.*, 2005). Appartiennent au groupe des composés connus par des benzo- α -pyrone (O’Kennedy et Thornes, 1997) et toutes sont substituées en 7 par un hydroxyle. Elles se trouvent dans la nature soit à l’état libre ou bien combiné avec des sucres. (Cowan, 1999) (Figure 05).

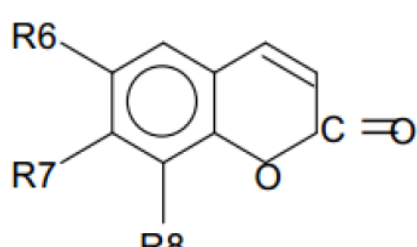
	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH3	OH	H	Scopolétole
	OCH3	OH	OH	Fraxétole
	H	OH	OH	Daphnétole

Figure 05 : principaux types de coumarines (Macheix et *al.*, 2005).

II.2.3.2.2. Les flavonoïdes

Le nom flavonoïde proviendrait du terme *flavedo*, désignant la couche externe des écorces d'orange, cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du *flavus* ; (*flavus* = jaune). Les flavonoïdes ont été désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes (Nijveldt et *al.*, 2001).

Actuellement, environ de 4000 composés flavoniques sont connus (Edenharder et Grunhage, 2003) et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones (figure 06) qui sont arrangés à une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane (Yao et *al.*, 2004).

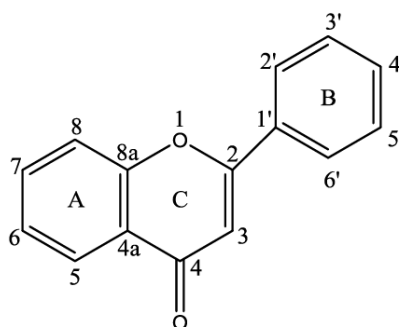


Figure 06: Structure chimique de base des flavonoïdes (Krishna et *al.*, 2001).

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leurs classes structurales, de degré d'hydroxylation et méthylation, de degrés de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C (Yao et *al.*, 2004). En basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes (figure 07) : anthocyanidines, flavonoles, isoflavonol, flavones, isoflavones, flavanes, isoflavanes, flavanol, isoflavanoles, flavanones, isoflavanones, auronnes (Edenharder et Grunhage, 2003).

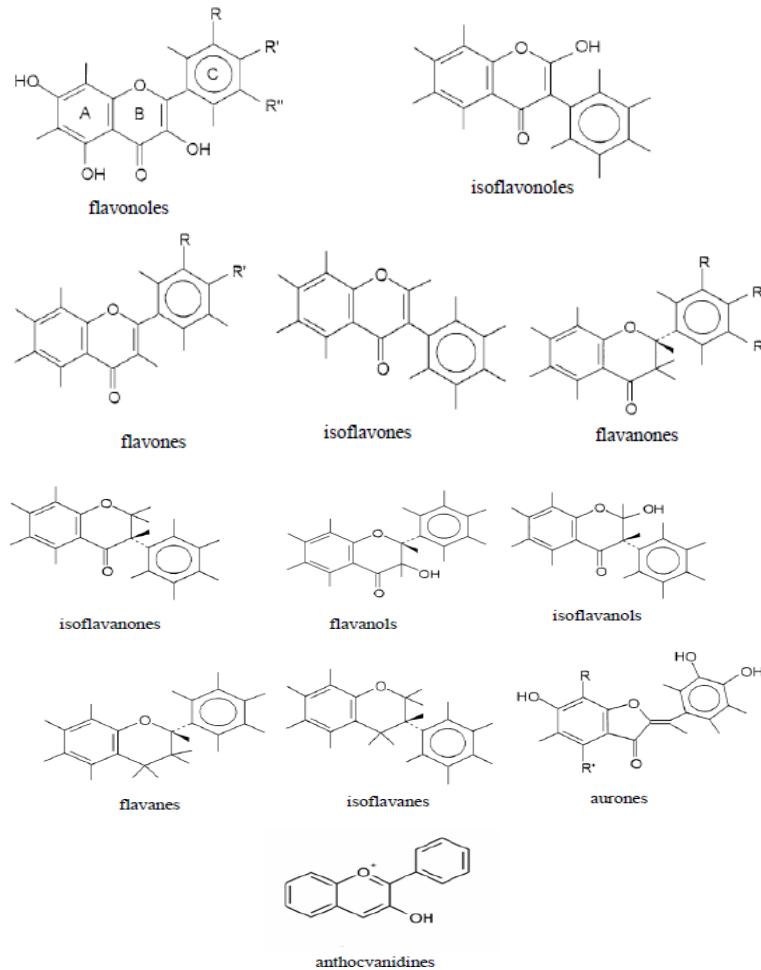


Figure 07 : structure des squelettes de base des flavonoïdes (Havsteen, 2002)

II.2.3.2.3. Les tannins

Cette classe désigne le nom général descriptif des groupes des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (Cowan, 1999). Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante (Scalbert, 1991).

Le terme tannin vient de la source de tannins utilisée pour le tannage des peaux d'animaux en cuir. Dans ce processus, les molécules de tannins se lient aux protéines par des liaisons résistantes aux attaques fongiques et bactériennes (Hagerman et Butler, 1981). On distingue deux groupes de tannins : les tannins hydrolysables et les tannins condensés.

Les tannins hydrolysables

Sont formés par liaison de plusieurs acides galliques à un carbohydrate (généralement le glucose). On parle de gallotannins. Comme leur nom l'indique, ces composés peuvent être dégradés en fragments simples (acides phénols et sucres) (figure 08) (Seigler, 1998).

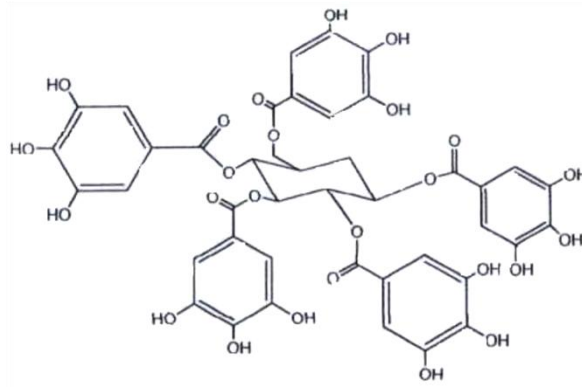


Figure 08: exemple de tanin hydrolysable (pentagalloylglucose) (Macheix et *al.*, 2005)

Les tannins condensés

Ils se différencient fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit de polymères flavaniques (figure 09) constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone (Bruneton, 1999).

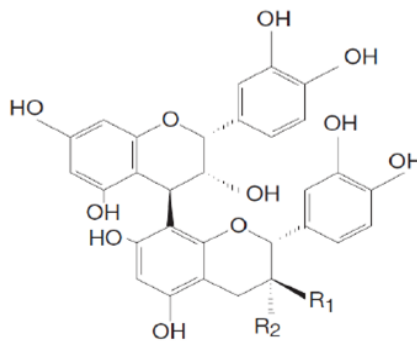


Figure 09 : Structure chimique d'un tanin condensé (proanthocyanidine) (Derbel et Ghedira, 2005).

II.2.3.3 Exemples d'activité biologique des composés phénoliques

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques comme les activités antiallergique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire ... (Ksouri et *al.*, 2007).

III. Activités biologiques des polyphénols

III.1. Activité antioxydante des polyphénols

L'oxygène est indispensable aux processus vitaux et notamment à la respiration cellulaire. Toutefois, le métabolisme de l'oxygène peut générer des éléments réactifs appelés radicaux libres, notamment l'ion superoxyde (O_2°) et l'ion hydroxyle (OH°) (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Ces espèces réactives de l'oxygène sont produites physiologiquement, certaines contribuant d'ailleurs à la régulation de fonctions biologiques, et participent à la réponse au stress, notamment d'origine infectieuse (Hennebelle et *al.*, 2004), mais leur production excessive entraîne des dommages sur l'ADN, les protéines cellulaires essentielles et les lipides membranaires (peroxydation lipidique), pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Dans les conditions dites « physiologiques », il y a équilibre entre la production de radicaux libres et les mécanismes endogènes de défenses antioxydantes. Ces mécanismes impliquent principalement des enzymes spécifiques (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase), ainsi que des molécules antiradicalaires (« scavengers »), qui piègent les radicaux libres (β -carotène et vitamines antioxydantes A, C, E) (Afonso et *al.*, 2007). Cependant, certaines conditions s'accompagnent d'une production accrue de dérivés instables d'oxygène : métabolisme des sucres au cours de l'effort physique, métabolisme graisses, réponse immunitaire notamment vis-à-vis des infections microbiennes, exposition à des rayonnements, pollution, tabagisme... Par ailleurs, des études épidémiologiques indiquent que les niveaux de défenses antioxydantes diminuent avec l'âge (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Pour échapper aux graves séquelles du stress oxydant, une consommation suffisante d'antioxydants s'impose. Les antioxydants alimentaires comprennent des vitamines (A, C et E), certains oligoéléments (Sélénium, Zinc), mais également des éléments bioactifs qui ne sont ni des vitamines ni des minéraux et qui se trouvent naturellement dans les aliments issus du règne végétal « polyphénols et caroténoïdes » (Derbel et Ghedira 2005).

De nombreux composés phénoliques naturels dont les flavonoïdes (flavonols, flavanols, les isoflavonoïdes, ...), les acides phénoliques, en particulier les dérivés de l'acide caféique, (Derbel et Ghedira ; 2005) et les tannins présentent une activité antioxydante marquée (Hagerman et *al.*, 1999). Dans tous les cas, l'effet protecteur dépend des concentrations utilisées et des structures chimiques en présence (Marcheix et *al.*, 2005).

II.1.1. Mode d'action des polyphénols

Les composés phénoliques agissent comme donneurs de protons ou d'électrons, comme chélateurs de métaux de transition (Márquez-García et al., 2009), et comme inhibiteurs d'enzymes génératrices de radicaux libres et inducteurs de la synthèse d'enzymes antioxydantes (Hennebelle et al., 2004).

Grâce à leur diversité structurale, les composés phénoliques exercent une activité antioxydante via plusieurs mécanismes et agissent à différents niveaux des réactions radicalaires (Derbel et Ghedira, 2005). Cette activité est étroitement liée à leurs propriétés structurales, à savoir le nombre et la position des groupements hydroxyles et le degré de méthylation, de glycosylation et de polymérisation (Heim et al., 2002). L'activité antioxydante des composés phénoliques augmente avec le degré de polymérisation et diminue avec le degré de méthylation et de glycosylation au niveau des groupements hydroxyles (Marcheix et al., 2005).

II.1.1.1 Chélation des métaux

Les composés phénoliques inhibent la formation de radicaux libres par la chélation de métaux tels que le Cuivre, le Fer et l'Aluminium (figure 10) (Marcheix et al., 2005). Ces ions métalliques renforcent les effets nocifs du stress oxydant, en stimulant la production des radicaux hydroxyles (OH°). Ces composés en chélatant les ions métalliques, forment des complexes de coordination avec ces métaux, en occupant tous les emplacements et peuvent ainsi convertir les ions métalliques en complexes insolubles, empêchant leurs interactions avec les intermédiaires lipidiques (Virgili et al., 2001).

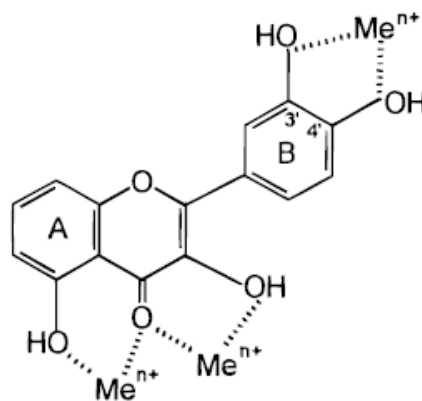
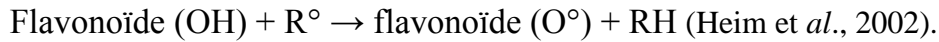


Figure 10: Chélation des métaux de transition par les flavonoïdes (Pietta, 2000).

II.1.1.2. Neutralisation des radicaux libres

Les composés phénoliques sont des piègeurs efficaces de radicaux libres (Hennebelle et *al.*, 2004), et ceci grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif (Derbel et Ghedira 2005) contre l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et l'oxygène singulet, selon la réaction suivante :



Les flavonoïdes préviennent la peroxydation lipidique en réagissant avec les radicaux libres, qui sont susceptibles d'arracher un hydrogène sur le groupement CH_2 situé entre deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés (Lahouel et *al.*, 2004) et protègent ainsi les membranes cellulaires (Havsteen, 2002).

II.1.1.3. Inhibition d'enzymes

Les composés phénoliques affectent l'activité de nombreux systèmes enzymatiques impliquée dans le stress oxydant (Marcheix et *al.*, 2005). Certains flavonoïdes comme l'apigénine, la quercétine et la myricétine inhibent la xanthine oxydase (Morelle- Lauzanne, 2006), qu'est considérée comme une source biologique importante du radical superoxyde lors de l'oxydation de l'hypoxanthine en acide urique (Nijveldt et *al.*, 2001).

III.2. Activité antimicrobienne des polyphénols

Les composés phénoliques jouissent de propriétés bactériostatiques ou bactéricides marquées grâce à leur fonction phénol par une inhibition des systèmes enzymatiques ou par découplage des réactions énergétiques. Cela se traduit par une dénaturation de la membrane cytoplasmique entraînant une fuite des constituants cellulaires (Meyer et *al.*, 1999).

De nombreux composés phénoliques purifiés de différentes plantes ; hydroxycoumarines, dérivés de l'acide hydroxycinnamique, flavonoïdes (pigallocatchine, catechine, myricétine, quercétine), proanthocyanidines (tannins condensés), hydroxystilbenes etc., sont bien documenté pour avoir une bonne activité antimicrobienne et lutter contre un grand nombre de bactéries pathogènes (Hatano et *al.*, 2005). Plusieurs études ont montré que les polyphénols fortement hydroxylés présentent un potentiel important en tant qu'agents antimicrobiens (Falleh et *al.*, 2008). Les acides caféique et cinnamique sont dotés d'activités antibactérienne, antifongique et antivirale (Cowan, 1999).

Les flavonoïdes sont connus pour se complexer avec des composants des parois cellulaires, ils possèdent une activité bactériostatique et bactéricide en perturbant les métabolismes énergétiques (Tim Cushnie et Lamb , 2005). Les flavonoïdes sont doués aussi d'une activité anti- HIV leur a également été attribuée grâce à leur potentiel inhibiteur vis-à-vis de la transcriptase inverse et l'ADN polymérase de ce virus (Derbel et Ghedira 2005).

Les micro-organismes présentent des réactions diverses en présence d'un milieu contenant les tannins. Ces comportements dépendent également des types de tannins, les tannins condensés ayant un effet inhibiteur plus marqué sur l'activité microbienne que les tannins hydrolysables (Zemmer et Cordesse, 1996). Zemmer et Cordesse (1996), indiquent que les tannins ne sont pas toxiques dans le sens usuel du terme car ils n'affectent pas le catabolisme des substances simples comme les sucres et les acides aminés. En revanche, ils diminuent l'accessibilité aux nutriments et aux ions métalliques, inhibent les activités enzymatiques et peuvent agir au niveau de la membrane cellulaire.

II.2.1. Modes d'action des composés phénoliques sur les bactéries

L'effet antibactérien des composés phénoliques met en jeu trois mécanismes ; action sur la membrane cellulaire, inhibition des enzymes microbiennes et la privation des substrats et des métaux (Rodriguer-Vaquero et *al.*, 2007).

II.2.1.1 Action sur la membrane cellulaire

Il a été rapporté, par plusieurs auteurs, que le principal site d'action des composés phénoliques était la membrane cytoplasmique. Les polyphénols pénètrent dans la cellule bactérienne et inactivent les perméases du périplasme qui sont impliquées dans le transport des aminoacides et des polysaccharides. Cela entraîne une modification de la perméabilité cellulaire, avec une lyse de la cellule bactérienne suivi par une perte de ses constituants (Saidana et *al.*, 2008).

II.2.1.2. Action sur les enzymes et privation de substrat

L'interaction des polyphénols, en particulier les tannins, avec les protéines enzymatiques (telles que les protéases et les carbohydrases), en se fixant sur les sites actifs (de reconnaissance de substrat), induit l'inhibition de l'activité de l'enzyme (Cowan, 1999).

D'autres part, les composés phénoliques peuvent aussi se lier aux molécules substrats rendent ces dernières moins accessibles aux enzymes en les insolubilisant ou en masquant les sites de reconnaissance enzyme- substrat (Leinmuller et *al.*, 1991).

II.2.1.3. Privation des métaux

L'inhibition de l'activité bactérienne par la formation du complexe ion métallique composé phénolique, peut découler de la réduction de la teneur en ARN et ADN de la bactérie suite à la réduction de l'utilisation du Phosphore, ce dernier fait partie constituante des acides nucléiques. Elle peut également découler de la réduction de l'utilisation du Fer qui est un nutriment indispensable à la survie des microorganismes (Zemmer et Cordesse, 1996). Et enfin, peut découler de la privation de divers minéraux tels que Cuivre. Ces derniers sont des cofacteurs et des activateurs enzymatiques, et ils jouent sans aucun doute un rôle très important dans le maintien de l'équilibre physicochimique de la bactérie (Ribereaux-Gayon, 1968).

Matériels et méthodes

I. Matériels

I.1 Matériel biologique

Les racines d'*Alpinia officinarum* ont été achetées auprès d'un herboriste du marché local de la région de Laghouat (photo 01).



Photo 01 : Photo illustre les racines *Alpinia officinarum* (Originale.2015)

I.2 Matériel chimiques

Méthanol, acétone, chloroforme, DPPH (2.2-diphényl-1-picrylhydrazyl), ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$, chlorure de fer ($FeCl_3$), Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , acide trichloracétique, acide hydrochlorique, iodate de potassium (KI), I_2 , NH_4OH , acide acétique, acide sulfurique (H_2SO_4), NaOH, NH_4OH , acide gallique, carbonate de sodium, folin Ciocalteu, $HgCl_2$, liqueur de Fehling, ninhydrine, nitrite de sodium, $AlCl_3$. Les autres produits chimiques utilisés dans ce travail sont d'un grade analytique.

II. Méthodes

II.1 Broyage et préparation des extraits

La plante est réduite en poudre fine suite au broyage à l'aide d'un mortier dans un premier temps puis à l'aide d'un mixeur (photo 02).



Photo 02 : la poudre obtenue après le broyage de matériel végétal de plante (Originale.2015)

La poudre obtenue est macérée dans du méthanol, de l'acétone, de chloroforme et dans un mélange méthanol-eau (70-30) à raison de 100 ml pour 10g de la poudre, pendant 24 heures sous agitation continue à la température ambiante. Les macéras obtenus sont ensuite filtrés (photo 03) puis évaporés à sec sous pression réduite à 45°C à l'aide d'un Rotavapeur.

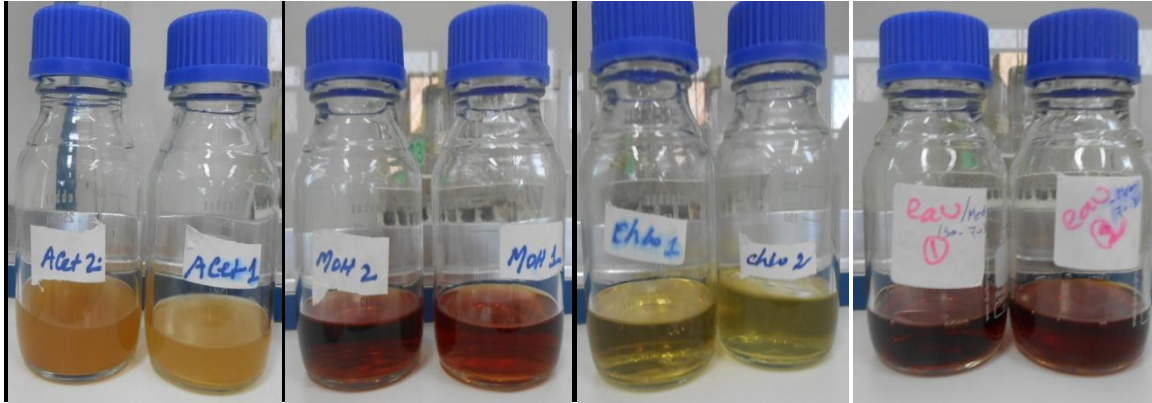


Photo 03: les extraits obtenus après filtration (Originale.2015)

Les résidus obtenus sont solubilisés dans du méthanol pur pour une concentration finale de 200 g/l et seront conservés à 4°C pour être utilisés ultérieurement (photo 04).



Photo 04: Aspect des résidus obtenus après solubilisation dans le méthanol (Originale.2015).

II.2 Calcul du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction (%) est calculé en appliquant la formule suivante :

$$R(\%) = \{(P1 - P0) / E\} \times 100$$

R (%) : Rendement exprimé en %.

P1 : poids d'extrait après évaporation (g).

P0 : poids vide du ballon (g)

E : poids de la poudre végétale (g).

II.3 Tests phytochimiques

Des tests phytochimiques ont été effectués sur les différents extraits obtenus. Cette recherche consiste en la mise en évidence des différentes familles de composés par la réalisation de réactions chimiques caractéristiques.

Les tests sont basés sur des essais de solubilité, des réactions de coloration et de précipitation ainsi que des examens en lumière ultraviolette.

II.3.1 Les tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 2 ml de l'extrait (50µl d'extrait + 1.95 ml méthanol) quelques gouttes (50 µl) de solution de FeCl₃ (2 %). Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue ou vert-noire (Palaniselvam et *al.*, 2014)

II.3.2 Les flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 ml de l'extrait (100 µl d'extrait + 4.9 ml méthanol) avec 1 ml d'HCl (1%) et 100 µl de NaOH. La présence des flavonoïdes est mise en évidence par l'apparition d'une coloration jaune. (Palaniselvam et *al.*, 2014).

II.3.3 Glucosides cardiotoniques

A 2.5 ml de chaque extrait (100 µl d'extrait + 2.4 ml méthanol), on ajoute dans l'ordre 1 ml d'acide acétique glaciale, quelques gouttes (100 µl) FeCl₃ (2%) et 0.5 ml d'acide sulfurique. La présence des glucosides cardiotoniques est confirmée par la formation de deux phases, une sous forme d'un anneau colorée en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu-vert (acide sulfurique).

II.3.4 Les composés réducteurs

Leur détection consiste à traiter 1ml de l'extrait (50µl d'extrait + 0.95 ml méthanol) avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes (500 µl) de la liqueur de Fehling, puis chauffage à ébullition (100°C). Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique (Trease et Evans, 1987).

II.3.5 Les phénols

A 1ml de l'extrait (50 µl d'extrait + 0.95 ml méthanol) 2 ml d'eau distiller est ajouter avec quelques gouttes (50 µl) FeCl₃ (10%). La présence des phénols est mise en évidence par l'apparition d'une coloration bleu ou verte. (Palaniselvam et *al.*, 2014).

II.3.6 Les résines

Leur détection consiste à traiter 5ml de l'extrait (50µl d'extrait + 4.5 ml méthanol) avec 2.5 ml d'acide acétique glaciale, puis chauffer quelques minutes et en fin ajouter 0.125 ml d'acide sulfurique. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration pourpre brillante.

II.3.7 Les glycosides

A 1 ml de chaque extrait (100 µl d'extrait + 0.9 ml méthanol) ajouter 1 ml d'acide sulfurique (5%), chauffer pendant 1 minute puis centrifuger 5 minutes. Prendre des volumes identiques ; 1 ml de surnageant avec 1ml de chloroforme. Ce mélange est incubé 5 minutes et enfin ajouter 100 µl NaOH à la phase chloroformique. La présence des glucosides est confirmée par la l'apparition d'une coloration jaune.

II.3.8 Les alcaloïdes

Réactif de Mayer (mercuritétraiodure de potassium), témoin de la présence d'alcaloïdes qui est préparé comme suit : 5 g de KI et 1,358 g de HgCl₂ solubilisés dans 100 ml d'eau distillée. Ce test se fait par ajout de quelques gouttes (100 µl) de réactif de Mayer, aux 2 ml de différents extraits étudiés (200 µl d'extrait + 0.8 ml méthanol). L'apparition d'un précipité confirme la présence des alcaloïdes (Bruneton, 1999).

II.3.9 Les acides aminés

Ce test est basé sur la réaction des acides aminés avec la ninhydrine. A 0.01 g des résidus obtenus après évaporation da chaque solvant d'extraction solubilisée dans 1 ml d'eau distillée ajouter 1ml de solution de ninhydrine préparée dans l'acétone (ou éthanol) dont la concentration est de 1%. Chauffer dans le bain marie et observer le changement de couleur. La présence des aminoacides est confirmée par l'apparition d'une couleur violette (Harbone, 1998).

II.3.10 Les stéroïdes

A 0.01 g des résidus obtenus après évaporation da chaque solvant d'extraction solubilisée dans 2 ml de chloroforme. Ajouter 10 gouttes (70 µl) d'acide acétique glacial puis 2 gouttes (10 µl) d'acide sulfurique concentré. La solution devenue rouge puis bleu et enfin bleu claire qui indiquent la présence des stéroïdes.

II.4 Dosage des composés phénoliques

II.4.1 Dosage des phénols totaux

II.4.1.1 Principe de la méthode

La teneur en phénols totaux des extraits des plantes qui font l'objet d'analyse a été déterminée par la méthode de Singleton et Rossi (1965). Cette méthode est basée sur la réaction des composés phénoliques avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif de couleur jaune est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation (Ribéreau-Gayon, 1972) par les groupements hydroxyles des phénols (Vermerris et Nicholson, 2006), en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximale est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits végétaux (Ribéreau-Gayon, 1972).

II.4.1.2 Protocole expérimentale

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé par la méthode décrite par Waterhouse (2001). Un volume de 40 μ l de l'échantillon convenablement dilué ou de solution de standard, est introduit dans un tube à essai contenant initialement 3.16 ml d'eau distillée et 40 μ l d'extrait dilué. On ajoute ensuite 200 μ l du réactif de Folin-Ciocalteu et on l'agite. Après 3 minutes, une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) d'une concentration de 200 g/l (600 μ l) est ajoutée tout en agitant.

Après une incubation de 30 min à 40° C, l'absorbance est mesurée à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, contre un blanc (le même mélange excepté l'échantillon qui est remplacé par le MéOH). Tous les essais sont reproduits au moins trois fois.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle par l'acide gallique (Voire annexe I) à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons. (Figure 11).

Les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme du poids sec de la plante en poudre en appliquant la formule suivante :

$$C = (c \times V) / m$$

C : La teneur en phénols totaux (mg d'ac. gallique/ g de matière sèche).

c : La concentration de l'ac. gallique établie à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

V : Volume de l'extrait.

m : Le poids de la matière sèche (g).

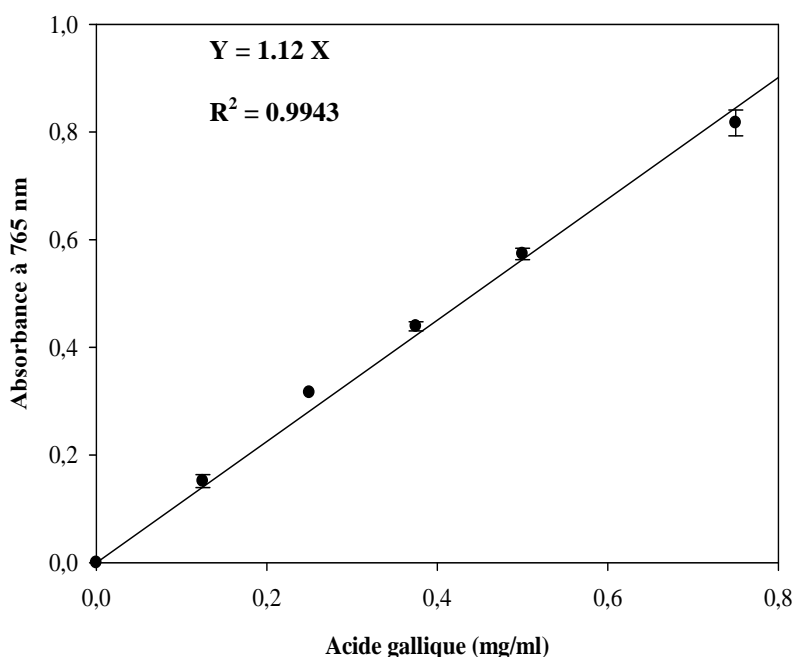


Figure 11 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

II.4.2 Dosage flavonoïdes

II.4.2.1 Principe de la méthode

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux dans les extraits est déterminé par la méthode de Bahorun et al., (1996).

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyl (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium (Boulekbache, 2005). Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (Ribéreau-Gayon, 1968).

II.4.2.2 Protocole expérimentale

La teneur totale en flavonoïde des extraits est mesurée selon la méthode spectrophotométrique décrite par (Kim et al, 2003). 500 µl de l'extrait sont ajoutés à 150 µl de la solution de nitrite de sodium (5%) suivie par l'addition de 300 µl de chlorure d'aluminium à 10%. Les tubes à essai sont incubés à la température ambiante pendant 5 min, puis 1 ml d'hydroxyde de sodium (1M) est ajouté. L'absorbance du mélange est lue à 510 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Vis.

La teneur en flavonoïdes a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée par la quercétine (Voire annexe I) à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons (figure 12). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de quercétine par gramme de la plante.

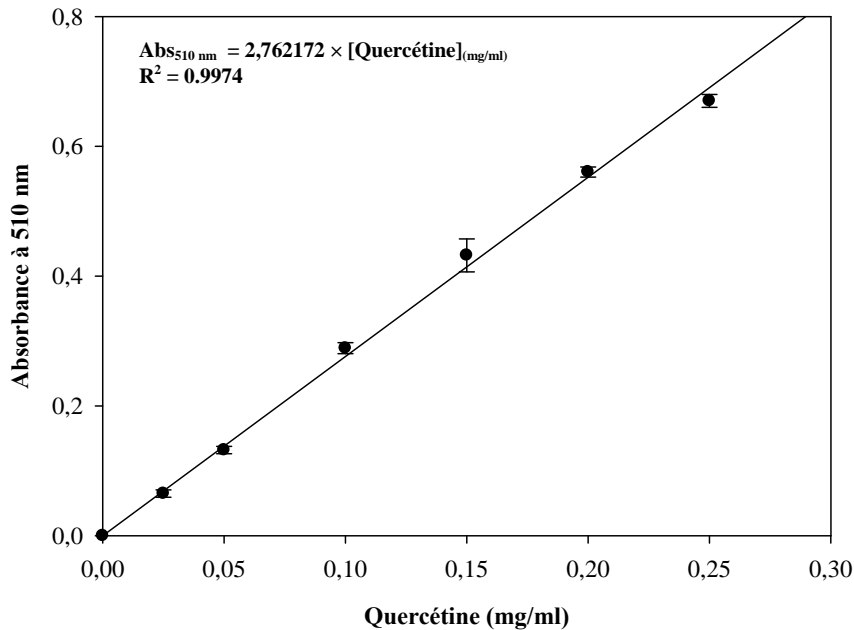


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de quercétine (mg/ml) pour le dosage des flavonoïdes.

II.5 Dosage des caroténoïdes

La teneur en caroténoïdes a été déterminé selon la méthode de Lichtenthaler et *al.*(1985). L'absorbance des extraits convenablement dilué dans du méthanol est mesurée à l'aide de spectrophotomètre UV-Vis à différentes longueurs d'ondes 470, à 653 et à 666 nm. Les concentrations des chlorophylles a et b étaient déterminées par les équations suivante :

$$\text{Chlorophylle a (mg/ml)} = 15,65 A_{666} - 7,340 A_{653}.$$

$$\text{Chlorophylle b (mg/ml)} = 27,05 A_{653} - 11,21 A_{666}.$$

$$\text{Caroténoïde totaux (mg/ml)} = 1000 A_{470} - 2,860 Ca - 129,2 Cb/245$$

III. Evaluation de l'activité antioxydante

Différentes méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante et anti-radicalaire des extraits des différents solvants d'*Alpinia Officinarum*.

III.1 Méthode de piégeage du radical libre DPPH

III.1.1 Principe du test

La molécule de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre stable, largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante de différents composés (Wojdylo et al., 2007) dont la solution possède une coloration violette et une absorption caractéristique à 517 nm. Quand une solution de DPPH est mélangée avec une substance donneuse d'atome d'hydrogène, antioxydante, il y a formation de la forme réduite (figure 13). Ceci provoque la perte de la coloration violette en coloration jaune (Molyneux, 2004) caractérisée par une bande d'absorption dans le visible à 517 nm (Brand et al., 1995). La réaction primaire est :

DPPH ox + Antioxydant red \longrightarrow DPPH red + Antioxydant ox (Rolland, 2004).

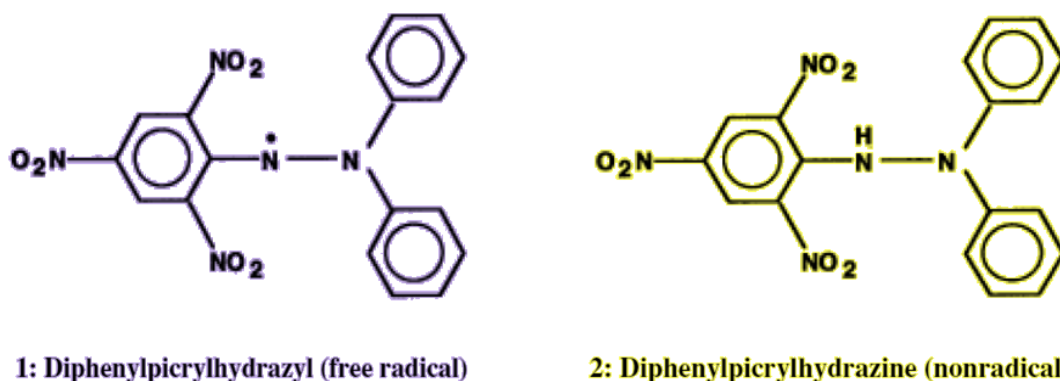


Figure 13: DPPH avant et après réduction (Molyneux, 2004)

III.1.2 Protocole expérimental

Dans un tube à essai, une quantité de 2.9 ml d'une solution méthanolique de DPPH d'une absorbance comprise entre 0.9-1 à 517 nm a été ajoutée à 100 μ l d'extrait dilué 20 fois d'*Alpinia officinarum* à des concentrations croissantes. Après incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière l'absorbance des échantillons est lue à l'aide d'un spectrophotomètre calibré par le méthanol à 517 nm (Brand et al., 1995). Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique (Voir annexe I) dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons.

Le pourcentage d'inhibition est calculé à partir de la relation suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition de DPPH} = \left\{ \frac{(\text{Abs}_c - \text{Abs}_e)}{\text{Abs}_c} \right\} \times 100$$

Abs_c : Absorbance du contrôle

Abs_e : Absorbance de l'échantillon testé

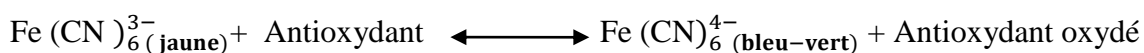
Pour chaque extrait nous avons déterminé la valeur EC₅₀ qui est la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH (Samarth et *al.*, 2008).

Nos résultats ont été exprimés en tenant compte du moyen de deux mesures obtenues.

III.2 Méthode de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

III.2.1 Principe du test

L'activité antioxydante des extraits *d'alpinia officinarum* étudiées a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible (Benzie et strain, 1997). La présence des réductants dans les extraits *d'Alpinia officinarum* provoque la réduction du Fe³⁺ sous forme d'un complexe ferricyanure à la forme ferreuse. Par conséquent, le Fe²⁺ peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu vert dans le milieu réactionnel à 700 nm. En d'autre terme, le système FeCl₃/K₃Fe(CN)₆ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semi quantitative » des concentrations des polyphénols, qui participent à la réaction redox (Amarowicz et *al.*, 2004).



III.2.2 Le protocole expérimental

L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode décrite par Oyaizu (1986), basée sur la réduction du Fe³⁺ présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en Fe²⁺. 500 µl de l'extrait dilué 10 fois à différentes concentrations est mélangé avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ à 1%. L'ensemble est incubé au bain marie à 50°C pendant 20 minutes ensuite. 2,5 ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes. 2,5 ml du surnageant sont mélangés à 2,5 ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution de chlorure ferrique fraîchement préparé à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre). Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique (Voire annexe I) dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Hubert, 2006).

IV. Evaluation de l'activité antibactérienne

Afin de mettre en évidence l'effet antibactérien *in vitro* des différents extraits d'*Alpinia officinarum*, nous avons choisi la méthode de diffusion des disques et des puits sur milieu de Mueller-Hinton gélosé.

IV.1 Provenance des germes étudiés

Les souches étudiées ont été fournies par le Docteur Belyagoubi Larbi du département de Biologie de l'Université de Tlemcen. Elles sont responsables de nombreuses maladies qui affectent actuellement l'homme, les animaux et les plantes qui, dans certaines conditions, se comportent en contaminants, provoquant ainsi, des allergies et des intoxications.

Tableau 01 : Origines des souches utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne.

<i>Bactérie</i>	<i>Gram</i>	<i>Code</i>	<i>Origine</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 6538	MNHN
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	négatif	ATCC 27853	MNHN
<i>Escherichia coli</i>		ATCC 8739	MNHN
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		IBMC Strasbourg	MNHN

MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle (France-Paris).

IV.2 Antibiotique utilisé

Nous avons testé l'effet antimicrobien d'un antibiotique (ampicilline (AMP)) couramment utilisés en médecine sur la souche pathogène.

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard des germes utilisés et le comparer avec l'effet de nos extraits bruts. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. La sensibilité des bactéries à l'antibiotique est appréciée selon le même protocole qu'avec les disques de papiers imprégnés d'extrait.

IV.3 Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne

IV.3.1 Les milieux de culture

Le Bouillon BHIB et Muller-Hinton Agar ont été utilisés comme milieu de culture des bactéries testées (Voire annexe II).

IV.3.2 Stérilisation du matériel

L'eau physiologique, 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) ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

IV.3.3 Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes sont ensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. Décharger l'anse dans 10 ml d'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne est bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à une densité optique comprise entre 0.08 à 0.10 mesurée à 625 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

IV.3.4 Ensemencement

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri. Un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées. L'opération est répétée quatre fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche.

Deux méthodes ont été employées pour évaluer l'effet antibactérien des extraits bruts de la plante.

IV.3.5 Méthode des disques

Des disques de papier filtre stérilisés de 6 mm de diamètre, imprégnés de 15µl d'extrait, sont déposés à la surface d'un milieu de Mueller-Hinton coulé en boîtes de Pétri, préalablement ensemencées en surface avec une suspension de la bactérie. Après incubation de 24h à 37 °C, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre, en mm, de la zone d'inhibition (Lesueur et *al.*, 2007).

IV.3.6 Méthode des puits

La méthode des puits ou méthode de diffusion en puits assure une diffusion radiale de l'extrait à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire facilement mesurable. La méthode consiste à découper un trou circulaire de 6 millimètres de diamètre dans la gélose et y verser (25 µl) l'extrait de concentration connue qui diffuse radialement en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablement ensemencée avec la suspension bactérienne (Eymard, 2003).

Pour les deux méthodes on fait un témoin méthanol pour avoir leur effet sur les souches bactériennes et aussi chaque expérience est répétée deux fois, en même temps et en même endroit.

IV.3.7 Détermination de l'effet bactériostatique

La CMI (la concentration minimale inhibitrice) ou l'effet bactériostatique est défini comme étant la plus basse concentration capable d'empêcher une croissance bactérienne visible (Mann et Markham, 1998).

Pour déterminer la CMI des extraits de notre plante médicinale, de dilution en milieu liquide a été utilisée (Bouillon BHIB). Ainsi, une gamme de concentrations de chaque extrait allant de 4 à 40 mg/ml a été préparée dans des tubes à essai contenant préalablement 9 ml de bouillon BHIB stérile. Chaque tube est ensemencé avec 100 µl d'un inoculum de 24 heures. Un autre tube sans extrait, servant de témoin de croissance est préparés, puis incubées 24 heures à 37 °C.

V. Analyses des données

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm écart type (n=2). Les courbes sont effectuées à l'aide du logiciel SigmaPlot (SigmaPlot for Windows Version 11.0, Copyright 2008 Systat Software, Inc.).

Résultats et discussion

I. Rendement d'extraction

L'extraction est une étape très importante pour l'isolement et l'identification des principes actifs à haute valeur ajoutée à partir de la matière végétale, notamment le cas des polyphénols, qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêt grâce à leur activités biologiques diverses en particulier leur propriétés antioxydante et antibactérienne. Beaucoup d'études ont souligné l'influence de différentes conditions physico-chimique sur les rendements d'extraction des composés phénoliques d'origine végétale, tels que le temps et la température d'extraction, le pH, la méthode d'extraction, la composition chimique des échantillons et la polarité du solvant.

D'après les résultats indiqués dans le Tableau (02) on remarque que la polarité du solvant affecte grandement le rendement d'extraction. Le méthanol seul ou mélangé avec l'eau donne un bon rendement d'extraction par rapport aux chloroforme et l'acétone.

Nos résultats sont similaires par rapport à ceux trouvé par Negi et al (2005) qui signalent que les rendements d'extraction obtenus avec le chloroforme et l'acétone sont les plus faibles comparé avec celui obtenu avec le méthanol. Chen *et al* (2008) rapportent qu'un meilleur rendement d'extraction à partir d'*A. Officinarum* est obtenu avec le méthanol comme solvant.

Tableau 02: L'effet de solvant sur le rendement d'extraction d'*alpinia officinarum*.

Type de solvant	Rendement d'extraction (g/100 g de la matière sèche)
Chloroforme	5.00±0.50*
Acétone	3.76±0.38
Méthanol	10.50±1.98
Méthanol-eau (70-30)	7.65±0.31

*Chaque valeur est exprimée en moyenne ± erreur standard (n = 2).

L'utilisation de différents solvants à polarité différente permet de séparer des composés selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. Cette méthode d'extraction menée sous agitation continue et à courte durée, permet d'extraire le maximum des composants bioactifs et de prévenir leur dénaturation ou modification probable (Hagermann et coll., 2000).

III. Teneur totale en caroténoïdes, en phénols totaux et en flavonoïdes d'*Alpinia officinarum*.

La comparaison entre les polyphénols totaux, flavonoïdes, et les caroténoïdes des différents solvants d'extraction sont présentés dans (le Tableau 04).

Tableau 04: Effet du solvant d'extraction sur les teneurs en caroténoïdes, en phénols totaux et en flavonoïdes d'*Alpinia officinarum*.

Solvant d'extraction	Caroténoïdes (mg/ml)	Phénols totaux (mg EAG/g résidu sec)	Flavonoïdes totaux (mg/g résidu sec)
Acétone	107,78±0.00	190,23±8,78*	178,38±4,52*
Chloroforme	77,78±0.00	169,88±14,42	98,74±5,60
Méthanol	157,81±0.00	135,83±8,24	177,98±16,08
Méthanol/Eau (70 :30 ; V/V)	143,87±0.00	194,76±1,25	194,67±8,45

*Chaque valeur est exprimée en moyenne ± erreur standard (n = 3).

La forte hydrophobicité des caroténoïdes conditionne leur répartition dans l'environnement cellulaire : les caroténoïdes sont associés aux bicouches lipidiques membranaires. Grâce à leur longue chaîne polyinsaturée, les caroténoïdes sont de bons piègeurs de radicaux libres (Faure et al., 1999). Les résultats ont révélé que l'extrait méthanolique d'*A. Officinarum* est le plus riche en carotenoides, tandis que l'extrait Chloroformique a montré la plus faible teneur.

Les polyphénols sont les principaux composés de plantes à activité antioxydante. Les composés phénoliques sont une classe d'antioxydants qui agissent comme terminateurs de radicaux libres en raison de leur groupement hydroxyle. La teneur en composés phénoliques totaux dans la plante a le plus souvent une corrélation avec l'activité de piégeage des radicaux libres (Gouzi et al., 2013). Les contenus phénoliques totaux d'*Alpinia officinarum* déterminés par la méthode de Folin Ciocalteu's sont présentés au tableau 2. Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalents AG par gramme de plante séché. L'extrait méthanol/Eau (70 :30 ; V/V) a la teneur la plus élevée en polyphénol (194,76 mg EAG/g résidu sec) suivie par celle de l'extrait acétonique (190,23mg EAG/g résidu sec).

Le contenu phénolique le plus faible a été observé au niveau de l'extrait méthanolique (135,83 mg GAE /g résidu sec). Ces différences en rendement en composés phénoliques peuvent être attribuées à la polarité du solvant d'extraction utilisé (Negi et al., 2005).

L'utilisation de l'eau en combinaison avec les solvants organiques contribue à la création d'un milieu modérément polaire qui assure l'extraction des polyphénols (Liyana-Pathirana et Shahidi, 2005). Des observations similaires ont été obtenues par Al-Farsi et Lee (2008) qui ont prouvé que l'acétone est le meilleur solvant pour l'extraction des composés phénoliques à partir de la datte.

Nos résultats sont en désaccord avec ceux trouvés par Srividya et al (2010). Ces auteurs ont rapporté que l'extrait méthanolique d'*Alpinia Officinarum* contient 30.6 mg EAG /g de composés phénoliques et 41.35 mg EAG /g dans l'extrait de mélange méthanol-eau. Mayachiew, De plus, Devahastin (2008) et Chan et al. (2008) ont trouvé respectivement 40.9 mg EAG /g, et 2.14 mg EAG /g de composés phénoliques dans l'extrait méthanolique.

Selon, Phang et al., (2013) notre plante est plus riche en composés phénoliques par rapport à une autre espèce de la même famille *Alpinia pahangensis* qui contient 0.75 mg/g.

Les extraits d'acétone ont une teneur moyenne en composés phénoliques de 190.23 mg/g. Cette teneur peut être expliquée par la faible solubilité des composés phénoliques polaires présents dans les extraits d'acétone en raison de sa faible polarité par rapport aux autres solvants utilisés. De plus, les sucres ne sont pas solubles dans l'acétone. Ainsi, les composés phénoliques glycosides ne peuvent pas être extraits (Kouri et al., 2007).

Les acides phénoliques très polaires (acides benzoïques et cinnamiques) ne peuvent pas être extraits complètement avec les solvants organiques purs. Le mélange alcool-eau est recommandé pour obtenir des extraits avec une teneur élevée en composés phénoliques (Zhao et Hall, 2008) et des analytes moins polaires (dérivés d'acides phénoliques) ne sont pas isolés quantitativement en utilisant l'eau pure comme solvant d'extraction (Cazes, 2005).

Des nombreuses études ont montré que la consommation d'un régime alimentaire riche en composés phénoliques est associée à une diminution du risque de maladies cardio-vasculaires et de certains cancers en raison des propriétés antioxydantes des composés phénoliques. En outre, il a été signalé que les composés phénoliques ont été associés à l'activité antioxydante et jouent un rôle important dans la stabilisation de peroxydation lipidiques (Gouzi et al, 2013).

Par conséquent, les résultats de la présente étude suggèrent que les extraits d'*A. Officinarum* pourraient réduire les dommages oxydatifs dans le corps humain et assurer la protection de la santé.

La valeur la plus élevée des flavonoïdes a été trouvée dans l'extrait méthanol/Eau (70 :30 ; V/V) (194,67 mg/g résidu sec) suivi de l'extrait acétonique (178,38 mg/g résidu sec). Alors que l'extrait chloroformique a la teneur la plus faible (98,74 mg/g résidu sec) (Tableau 2).

Nos résultats sont similaires avec ceux obtenus par Jayaprakasha et Patil (2007) et Al-Farsi et Lee (2008) qui ont montré que les teneurs les plus faibles en flavonoïdes ont été obtenues avec l'acétone. Par contre, nos résultats obtenues ne sont pas similaire de celle de Srividya et al, 2010 qui ont rapporté que les extraits méthanolique et méthanol-Eau contiennent respectivement 27.64 mg/g et 36.36 mg/g de flavonoïdes. Chen et al 2008 ont trouvé que l'extrait méthanolique contient 19.3 mg/g de flavonoïdes.

IV. Evaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes ROO• par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter); les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter); ou les radicaux ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH• (Popovici, 2009). Parmi ces différentes méthodes, les tests DPPH et FRAP sont les deux méthodes qui ont été prises en considération pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits d'*Alpinia officinarum* étudiée dans ce travail.

IV.1. Test du radical DPPH•

L'activité antiradicalaire de quatre extraits de différents solvants d'*Alpinia officinarum* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à 517 nm en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune (photo 05). Le test de DPPH est une méthode fréquemment employée pour évaluer le potentiel antioxydant de différents composés naturels vue sa rapidité, sa fiabilité et son faible coût (Senthilkumar et al., 2012).



Photo 05 : les résultats après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière du radical DPPH en présence de l'extrait de la racine d'*Alpinia officinarum* à différentes concentration.

Le DPPH a été largement employé comme un radical libre pour évaluer la réduction des substances, et il est un réactif utile pour étudier les activités antiradicalaires des composés

(Senthilkumar et al, 2012). Les résultats du pouvoir antiradicalaire, des différents extraits d'*Alpinia Officinarum* étudiée, exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont illustrés dans (la figure 14).

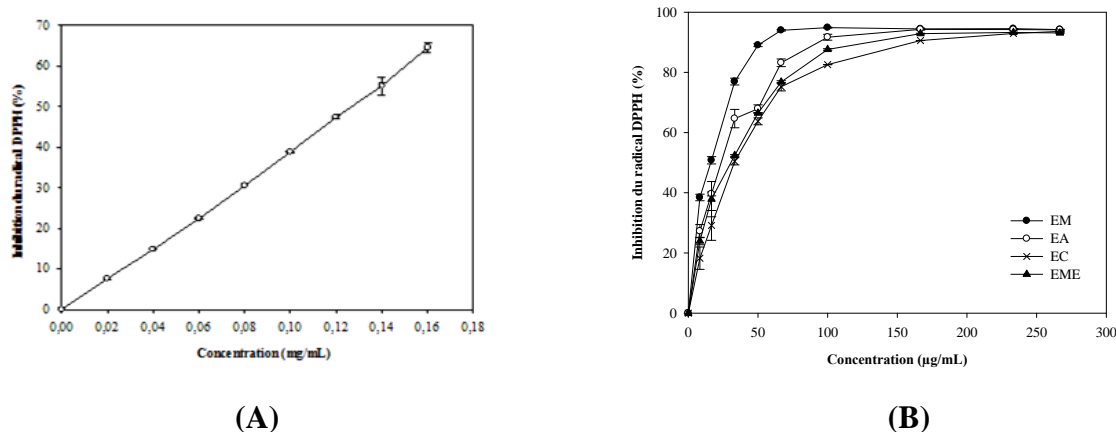


Figure 14: Présentations graphiques des pourcentages d'inhibition de DPPH résiduels en fonction de concentration des extraits (B) et de l'acide ascorbique (A).

D'après la Figure (14), tous les extraits sont capables de piéger le radical libre DPPH^{*} de manière concentration-dépendante. On constate que les allures des courbes sont différentes d'un solvant à un autre et que le taux d'inhibition du DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait d'*Alpinia officinarum*. L'extrait méthanolique, réduit fortement le radical DPPH^{*} par rapport aux autres extraits où l'extrait chloroformique a la plus faible capacité de réduction de radical DPPH^{*}. Wang et al (2012) confirment aussi que le chloroforme a la plus faible capacité de réduction de DPPH.

La variation de capacité antioxydante des différents extraits peut être attribuée aux différences en composition chimique comme les phénols, l'acide ascorbique et les caroténoïdes. C'est clair que tous les extraits donnent une augmentation de capacité antioxydante avec l'augmentation de la concentration d'échantillon (Jayaprakasha et Bhimanagouda, 2007). L'activité antioxydante de nos extraits peut être due à la présence des flavonoïdes ou des caroténoïdes.

Les valeurs d'EC₅₀ ont été déterminées à partir des courbes de réduction du radical DPPH en fonction de la concentration des extraits d'*A. Officinarum* par extrapolation à partir de l'analyse de régression non linéaire.

L'EC₅₀ d'un composé est inversement lié à son capacité antioxydante, car elle exprime la quantité d'antioxydant exigée pour diminuer la concentration de DPPH de 50%, Une faible EC₅₀ indique l'activité antioxydante la plus élevée (Senthilkumar et al., 2012).

Les valeurs de l'EC₅₀ pour chaque extrait ainsi que celle du standard, sont regroupées dans le Tableau (05).

Tableau 05: Les valeurs d'EC₅₀ des activités antioxydantes des extraits d'*Alpinia officinarum*.

Solvant d'extraction	DPPH (EC ₅₀ ; mg/ml) ^b	Test Ferricyanure/bleu de Prusse (EC ₅₀ ; mg/ml) ^a
<i>Acétone</i>	0,68±0,02	1.21±0.00 ^c
<i>Chloroforme</i>	0,98±0,02	1.39±0.18
<i>Méthanol</i>	0,42±0,00	1.78±0.11
<i>Méthanol/Eau (70 :30 ;V/V)</i>	0,84±0,04	1.90±0.12
Acide ascorbique	0.12±0.00	0.52±0.01

^aValeur EC₅₀: la concentration effective pour laquelle l'activité antioxydante est 50%; l'absorbance est 0.5 pour le pouvoir réducteur; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). La valeur EC₅₀ est obtenue par extrapolation à partir de l'analyse de la régression linéaire. ^bChaque valeur est exprimée en moyenne ± erreur standard (n = 2).

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (vitamine C), les antioxydants synthétiques BHT (butyl-hydroxy-toluène) ou le Trolox (acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique) (Popovici, 2009).

Nous avons utilisés l'acide ascorbique comme antioxydant standard qui a montré l'activité antiradicalaire plus élevée par rapport aux extraits d'*Alpinia officinarum* avec une EC₅₀ de 0.12 mg/ml.

D'après les valeurs d'EC₅₀, l'extrait méthanolique d'*A. Officinarum* est le plus actif sur le radical DPPH avec une EC₅₀ de 0.42 mg/ml, tandis que l'extrait chloroformique possède l'activité antiradicalaire la plus faible (EC₅₀ = 0.98 mg/ml).

Selon Popovici (2009), plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport Antioxydant/DPPH[•], type de solvant, pH) et le profil phénolique en particulier.

La classification des différents extraits d'*A. Officinarum* selon leur activité antioxydante d'ordre décroissant est la suivante: acide ascorbique > extrait Méthanolique > extrait Acétonique > extrait Méthanol - Eau > extrait Chloroformique.

L' EC_{50} de nos extraits est supérieure de celle trouvée par Srividya et *al* (2010) qui ont rapportés que l' EC_{50} d'extrait Méthanolique est de 0.13 mg/ml ainsi l'extrait de mélange méthanol-eau est de 0.12 mg/ml, par contre Phang et *al* (2013) ont trouvés que l'extrait Méthanolique est de 0.57 mg/ml.

Le méthanol a la meilleure capacité antioxydante qui comparé avec nos autres solvants et par l'Ethanol qui a un $EC_{50} = 27,5$ mg/ml (Juntachote et Berghofer, 2005).

IV.2. Test de FRAP

La réduction directe du complexe Fe^{3+} -ferricyanure qu'est une méthode relativement rapide, simple et économique a été utilisée pour le screening du pouvoir réducteur des extraits d'*Alpinia Officinarum*.

Le pouvoir réducteur d'un l'extrait, qui peut servir comme réflexion de son activité antioxydante, a été déterminée en utilisant le test modifié de réduction Fe^{3+} en Fe^{2+} , par lequel la couleur jaune de la solution d'essai change en couleur bleu-vert (photo 06), ceci selon la puissance réductrice de l'échantillon. La présence des antioxydants dans l'échantillon cause la réduction du complexe de Fe^{3+} /ferricyanure à la forme de Fe^{2+} , qui est surveillée en mesurant la formation du bleu de Prusse du Perl à 700 nm (Do et *al.*, 2013).

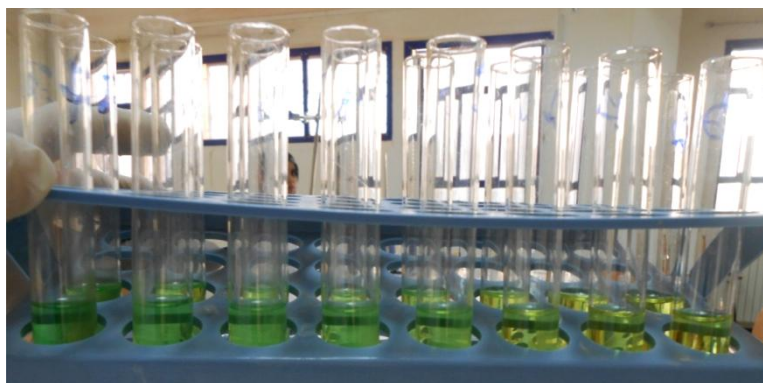


Photo 06 : les résultats de teste FRAP en présence de l'extrait à différentes concentration.

(Originale.2015)

Les résultats de l'activité réductrice des extraits sont représentés dans (la Figure 15).

Nous constatons que la capacité réductrice est proportionnelle à la concentration de l'extrait. L'acide ascorbique est un excellent donneur d'électron par rapport aux extraits d'*Alpinia Officinarum*.

Nous avons déterminé la concentration EC_{50} pour comparer l'activité réductrice des extraits qui est la concentration effective correspond à l'absorbance de 0,5. L'efficacité de réduction de fer est inversement proportionnelle à la valeur EC_{50} .

Le pouvoir réducteur des différents extraits peut être dû à leur capacité à donner des électrons. Le pouvoir réducteur peut être attribué principalement aux composés bioactifs associés à l'activité antioxydante tels que les composés phénoliques totaux, les flavonoïdes et autres antioxydants hydrophiles et hydrophobes qui sont de bons donneurs d'électrons et peuvent terminer la chaîne de réaction de radicaux libres par conversion des radicaux libres en produits plus stables (Yen et al., 2008).

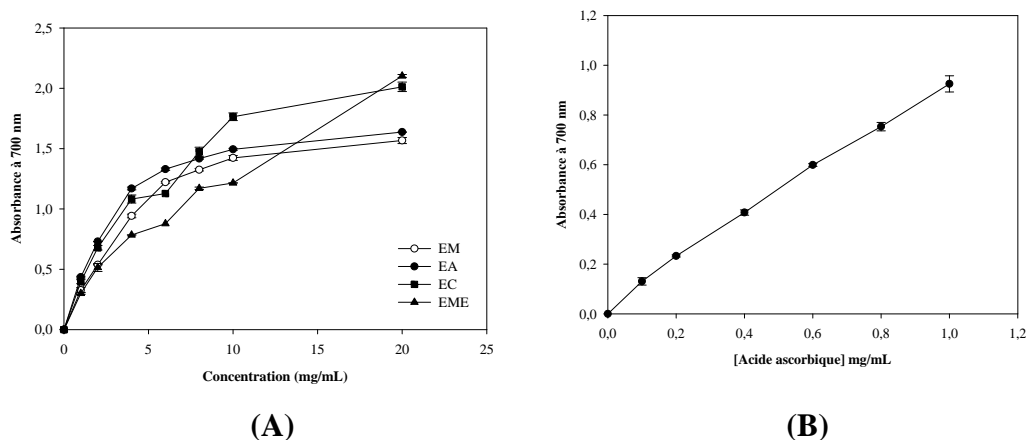


Figure 15 : Résultats de la mesure de l'activité antioxydante des extraits d'*A. Officinarum* (A) et de l'acide ascorbique (B) par la FRAP.

D'après les résultats indiqués dans le Tableau (7) et la figure 24 l'acide ascorbique a le pouvoir réducteur le plus élevé suivi par l'extrait acétonique ($EC_{50} = 1.21$ mg/ml), par contre l'extrait de mélange méthanol-Eau (70-30 v/v) a le pouvoir réducteur le plus faible ($EC_{50}=1.9$ mg/ml) donc, l'antioxydant standard et les extraits de notre plante sont classés en fonction de leur pouvoir réducteur décroissant comme suit : acide ascorbique > extrait Acétonique > extrait Chloroformique > extrait Méthanolique > extrait Méthanol – Eau (70-30 v/v).

Nos résultats sont différents de ceux trouvés par Srividya et al, 2010 qui ont rapporté que l' EC_{50} pour le teste de FRAP d'extrait Méthanolique et l'extrait de mélange Méthanol-Eau sont de 0.05 mg/ml et Juntachote et Berghofer (2005) ont rapporté que l'extrait Ethanologique d'*Alpinia Officinarum* a un $EC_{50}=0.75$ mg/ml.

V. L'activité antibactérienne

V.1. Antibiogramme

L'antibiogramme a pour but de prédire la sensibilité d'un microorganisme vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques. Cette sensibilité est exprimée par l'apparition de zones d'inhibition autour de ces disques. Les mesures de celles-ci sont présentées dans la figure suivante (Tableau 06).

Tableau 06. Les valeurs des diamètres d'antibiogramme.

Souche bactérienne	Diamètre d'inhibition (mm) (Disque d'ampicilline à 10 µg)
<i>Staphylococcus aureus</i>	13.33
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
<i>Escherichia coli</i>	15.75
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10.0

D'après le tableau 06, l'ampicilline semble avoir une action inhibitrice sur la croissance de toutes les souches à l'exception de la souche *Klebsiella pneumoniae* qui est moins sensible à l'antibiotique par rapport aux autres souches.

V.2. Effet antibactérienne des extraits d'*Alpinia officinarum*

Face aux problèmes de la résistance bactérienne aux antibiotiques synthétiques, beaucoup de travaux ont été menés sur le pouvoir antimicrobien des produits naturels extraits des plantes. Lors de cette étude, nous avons testé l'action des extraits d'*Alpinia officinarum* vis-à-vis de quatre souches bactériennes Gram-positif et Gram-négatif.

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits d'*Alpinia officinarum* obtenus par la méthode de diffusion sur le milieu Muller-Hinton gélosé sont regroupés dans la figure (16). Les valeurs indiquées sont les moyennes de deux essais (voire annexe II).

Selon la Figure 17 la méthode des puits et la méthode des disques ont donné presque des résultats similaire de l'activité antibactérienne des extraits d'*Alpinia officinarum*. On constate que la nature du solvant d'extraction influe grandement sur le pouvoir antibactérien de l'extrait de cette plante et que les souches bactériennes ont présentées des sensibilités variables.

Djenane et al (2012) ont supposés que chaque diamètre (\emptyset) d'une zone d'inhibition a une signification ; $\emptyset < 8$ mm : bactérie non sensible ; $9 < \emptyset < 14$ mm : bactérie sensible ; $15 < \emptyset < 19$ mm : bactérie très sensible et $\emptyset > 20$ mm : bactérie extrêmement sensible.

A partir de cette classification et commençant par la méthode des disques ; on constate que nos bactéries à l'exception de *Staphylococcus aureus* ne sont pas sensibles ; sauf la *Pseudomonas aureus* avec l'extrait de Méthanol-Eau (70-30 v/v) et l'*Escherichia coli* et la *Pseudomonas aureus* avec l'extrait Chloroformique sont sensibles. La *Staphylococcus aureus* est extrêmement sensible avec l'extrait Chloroformique mais avec les autres extraits elle est très sensible.

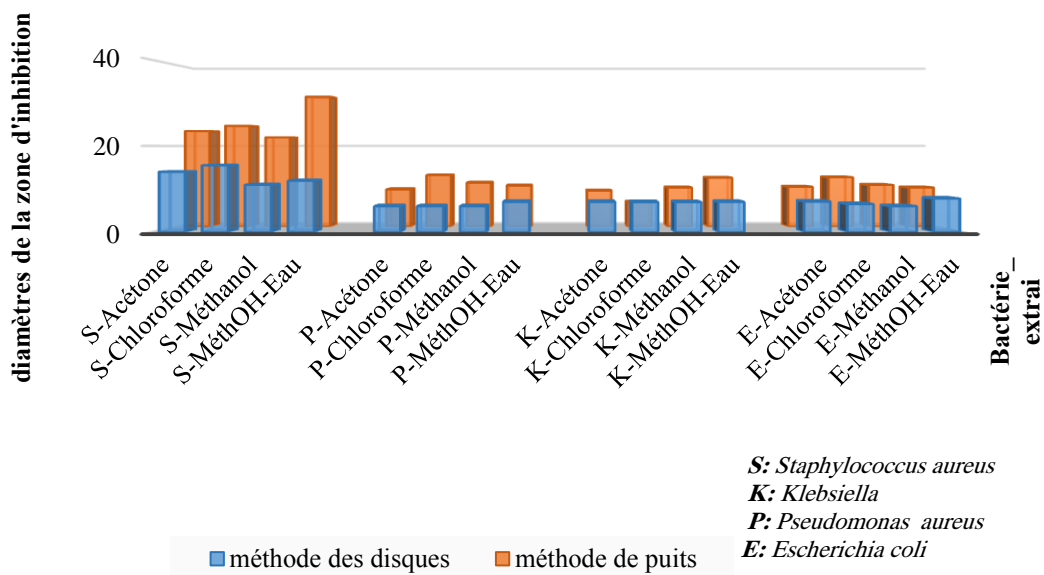
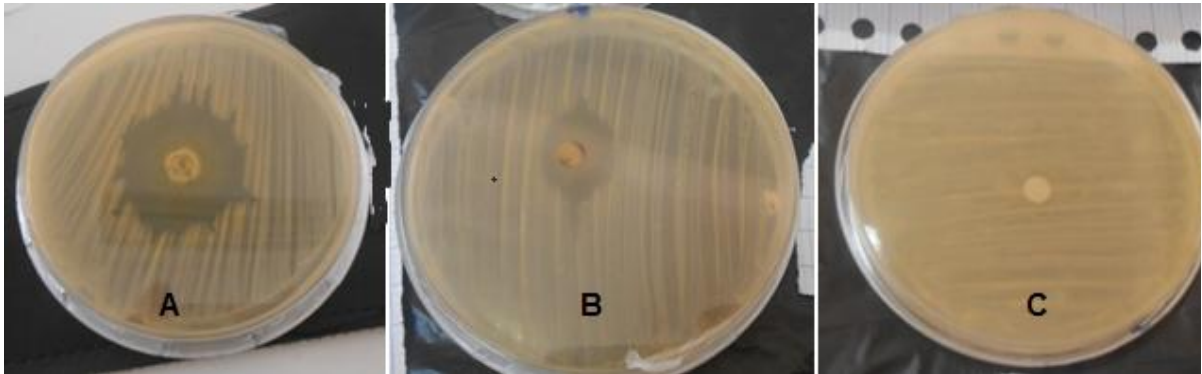


Figure 16. Résultats de l'effet des extraits d'*Alpinia officinarum* sur le diamètre d'inhibition de la croissance de quelques souches bactériennes.

Les bactéries sont toutes sensibles à l'exception de *Staphylococcus aureus* qu'est extrêmement sensible vis à vis tous les extraits d'*Alpinia Officinarum* par la méthode des puits. L'extrait chloroformique, malgré leurs teneurs très faibles en polyphénols (Tableau 4), montrent une activité antimicrobienne remarquable. L'importante action antimicrobienne démontrée par cet extrait est en relation avec sa composition en huiles essentielles réputées avoir une très grande action antimicrobienne (Yakhlef et al., 2011).

Haeng et al (2009) remarquant que l'extrait Chloroformique a une forte activité par rapport à l'extrait méthanolique *A. Officinarum*. Ray Et Majumdar (1973) ont trouvés que le rhizome d'*A. Officinarum* a une forte activité contre l'*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

L'action bactériostatique se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier ou du puits contenant l'extrait (Photo 07) et (Annexe III).



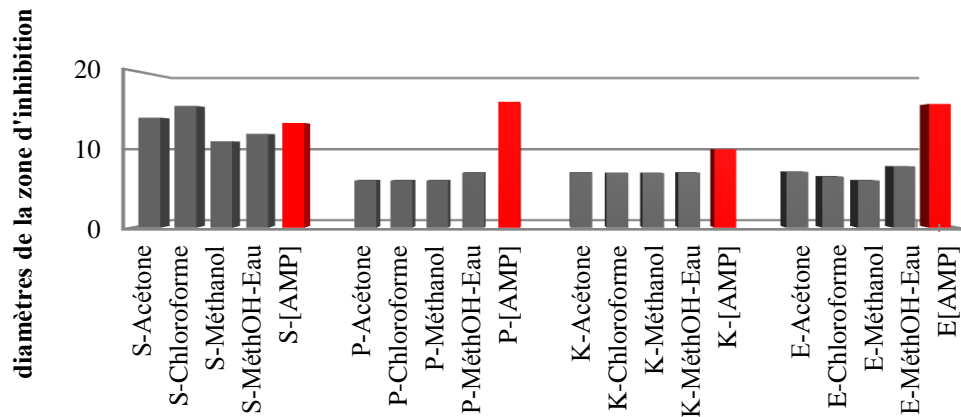
Photos 07. Résultats des méthodes de diffusion sur milieu gélose ; effet de l'extrait chloroformique testé et du méthanol sur *Staphylococcus aureus* : (A) Méthode des puits ; (B) Méthode des disques ; (C) Méthanol (Originale.2015).

Les effets antimicrobiens observés dans ce travail sont comparables, dans la plupart des cas, à ceux rapportés dans la littérature scientifique. Srividya et *al*, (2010) et Mayachiew et Devahastin (2008) ont montré respectivement que les extraits d'*Alpinia Officinarum* ont inhibé la *Staphylococcus aureus* avec des diamètres 27 mm, *Pseudomonas aureus* de 12 mm, *Escherichia coli* de 9 mm vis-à-vis l'extrait Méthanolique et une zone de 29 mm avec l'extrait Ethanolique contre *Staphylococcus aureus* respectivement.

Chen *et al.* (2008) a trouvé que l'*Alpinia Officinarum* a donnée une zone de 11 mm *Escherichia coli* et 5 mm avec *Staphylococcus aureus*. Nickell (1943) a rapporté que l'extrait d'acétone inhibe les bactéries grame positif.

Le méthanol pur utilisé n'a pas inhibé la croissance des bactéries (photo 07- C). D'après (la figure 17) on constate que le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'un extrait à un autre et d'une souche à une autre.

Les résultats obtenus pour ces extraits sont plus ou moins comparables à ceux d'ampicilline ; l'antibiotique utilisé comme un témoin positif. Selon la figure 17, on constate que l'ampicilline a des diamètres d'inhibition supérieure de celle trouvés.



S: *Staphylococcus aureus*, *K*: *Klebsiella*, *P*: *Pseudomonas aureus*, *E*: *Escherichia coli*, [AMP]: Ampicilline

Figure 17 : Comparaison entre les diamètres d'inhibition des extraits d'*Alpinia officinarum* et l'antibiotique sur les souches bactériennes.

V. 3. Evaluation de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Nous rapportons dans le Tableau 07 les CMI de nos extraits. Yakhlef et al (2011) ont proposé une classification des extraits du matériel végétal sur la base des résultats des CMI, comme suit :

- forte inhibition : CMI inférieure à 0.5 mg/mL ;
- inhibition modérée : CMI varie de 0.6 à 1.5 mg/mL ;
- faible inhibition : CMI supérieure à 1.6 mg/mL.

Ainsi selon cette classification, on constate que nos extraits ont une faible activité antibactérienne.

Les différences observées pour les valeurs de CMI peuvent s'expliquer par la présence de composés antibactériens dans les différents extraits de notre plante à concentrations, mais aussi par rapport au choix des techniques utilisées.

Le tableau 07 indique que la *Staphylococcus aureus* est la seule souche qui a une CMI inférieure à 40 mg/ml par rapport aux autres bactéries testées. La *Staphylococcus aureus* est une bactérie à gram positif qui a une CMI avec l'extrait de mélange Méthanol-Eau de 4 mg/ml et de 10 mg/ml avec les autres extraits.

Tableau 07. Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices des extraits.

Solvant	CMI (mg / mL)			
	SA *	PA	KL	EC
Acétone	10	> 40	> 40	> 40
Chloroforme	10	> 40	> 40	> 40
Méthanol	10	> 40	> 40	> 40
MéthOH-Eau	4	> 40	> 40	> 40

*SA: *Staphylococcus aureus* ; KL: *Klebsiella* ; PA: *Pseudomonas aureus* ; EC: *Escherichia coli*.

Srividya et al. (2010) ont rapportés que la CMI d'extrait Méthanolique de *Staphylococcus aureus* est de 125 µg/ml, *Pseudomonas aureus* 500 µg/ml, *Escherichia coli* µg/ml.

Hui et al. (2008) a trouvé que les CMI pour le *Pseudomonas aureus* > 1280 µg/ml et la *Staphylococcus aureus* 320-640 µg/ml. Lin Zhang et al, 2013 ont rapporté que 1 mg/ml d'extrait a inhibé 100% de croissance *Staphylococcus aureus* et 32 % de *Pseudomonas aureus*. Les extraits de notre plante a une activité vis-à-vis les bactéries gram négative. Les lipopolysacharide présentent dans la membrane externe des bactéries gram positif sont responsable de leurs résistance aux substances antibactériennes (Singh et al., 2015). La membrane externe contribuée a la résistance des bactéries gram négative.

Chabot et al., (1992) rapporte que les composés les moins polaires comme les flavonoïdes manquant le groupement hydroxyle sur leur cycle B sont plus actifs vis-à-vis des microorganismes que ceux portant le groupe OH. D'autre part, Mori et al., (1987) ont trouvé que les flavonoïdes trihydroxylés 3',4',5' sur le cycle B et substitués 3-OH sont nécessaires pour l'activité antimicrobienne.

Pour cela nous pouvons conclure que l'activité antimicrobienne des extraits dépend non seulement des composés phénoliques mais, aussi de la présence de différents métabolites secondaires. Une recherche supplémentaire sur la composition chimique de chaque extrait est plus que nécessaire pour comprendre l'évaluation de composés présentant l'activité antimicrobienne. L'activité antimicrobienne des extraits d'*Alpinia officinarum* est due aux différents agents chimiques présents dans ces extraits. La variation de la composition chimique explique donc les variations observées dans l'activité antimicrobienne des différents extraits de plante.

L'efficacité optimale d'un extrait peut être ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composés à l'origine de cet extrait.

Conclusion

La découverte de ressources naturelles du règne végétal reste capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques.

La présente étude a porté sur l'espèce *Alpinia Officinarum* qui appartient à la famille des Zingibéracées, une des familles les plus importantes et la plus utilisées par les thérapeutes traditionnels.

Parmi les solvants organiques utilisés, le méthanol donne le meilleur rendement d'extraction. Les tests phytochimiques effectués sur l'ensemble des extraits de cette plante montrent la présence des tanins, des flavonoïdes, des polyphénols, des résines, des glycosides, des acides aminés et des alcaloïdes.

Le dosage quantitatif des métabolites secondaires montre que les extraits méthanolique-eau et acétonique sont les plus riches en polyphénols totaux et en flavonoïdes. De plus le dosage des caroténoïdes révèle que les extraits méthanoliques sont les plus riches.

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de réduction de fer et celle du piégeage de radical libre DPPH des extraits a montré que tous nos extraits possèdent un pouvoir antioxydant modéré en particulier l'extrait méthanolique.

Le test DPPH montre que les extraits méthanolique et acétonique ont la capacité antiradicalaire la plus élevée par rapport aux autres extraits tandis que celle-ci est faible par rapport à l'acide ascorbique. Par ailleurs, le test FRAP a montré que le pouvoir réducteur de l'extrait acétonique est largement supérieur par rapport aux autres extraits, mais nettement inférieur à celui de l'acide ascorbique.

L'étude du pouvoir antibactérien des extraits de notre plante vis-à-vis de quatre bactéries a permis de visualiser une action inhibitrice plus intéressante de l'extrait méthanol-eau 70-30 (v/v) par rapport aux autres extraits.

La souche *Staphylococcus aureus* est la plus sensible parmi les souches étudiées vis-à-vis des extraits acétoniques et chloroformique. On peut déduire que nos extraits sont faiblement actifs sur les bactéries gram négatif.

On peut conclure que l'*Alpinia officinarum* est riche en métabolites secondaires ayant des activités antioxydante et antibactérienne. Cette plante peut être donc valorisée pour un usage pharmaceutique et agroalimentaire.

Des travaux supplémentaires seront utiles pour pouvoir identifier les molécules responsables des activités antioxydante et antibactérienne surtout au niveau des extraits les plus actifs ceci grâce à l'utilisation des méthodes chromatographiques (HPLC et CPG) et spectroscopiques (IR et RMN).

Références bibliographiques

A

- Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., et Lomri A. 2007**, Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales, *Revue du Rhumatisme*, **74** : 636–643.
- Al-Farsi M.A., et Lee C.Y. 2008**, Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds, *Food Chemistry*, **108** : 977–985.
- Amarowicz R., Estrella I., Hernandez T., Robredo S., Troszynska A., Kosinska A., et Pegg R. 2004**. Free radicals-scavenging capacity: antioxidant activity and phenolic composition of green lentil (*Lens culinaris*), *Food Chemistry*, **121**: 705-711.
- Arti D., Ankur R., et Vijender S. 2012**, *Alpinia officinarum*: Phytochemistry and Pleiotropism, *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, **122-124**.
- Avenel M. 2015**, Allergie de contact et phytothérapie, *Revue française d'allergologie*, **150–152**.

B

- Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J., et Pinkas M. 1996**, Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations, *Arznei. Forschung*, **46**: 1086-1089.
- Bei-Bei Z., Yuan D., Zhi-Xin L., et Li-Sheng D. 2010**, Three new antibacterial active diarylheptanoids from *Alpinia officinarum*, *Fitoterapia*, **81**; 948-952.
- Benzie I., Strain J. 1997**, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP, *Anal biochem*, **293**:70-76.
- Bérubé J. 2006**, Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de piceamariana. Mémoire comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables, Quebec.
- Bossokpi I. 2003**, Etude des activités biologiques de *fagara zanthoxloides Lam* (Rutaceae), These doctorat, université de bamako, **27**.p24-27.
- Boulekbache L. 2005**, Profil GC-MS des polyphénols d'une plante médicinale *Eucalyptus globulus*. Mémoire de Magister. Université de Bejaïa. 71p.
- Brand W., Cuvelier W., et Berset C. 1995**, Use of the free radical method to bruneton, J. 1993 pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales, (3^{ème} ed). Paris: Edition medicale internationale. *Edition Tec et Doc Lavoisier*, 11-20.
- Bruneton J. 1993**, Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. 2^{ème} édition, Lavoisier Techniques et Documentation, paris.
- Bruneton J. 1999**. Pharmacognosie: phytochimie, plantes Médicinales. 3^{ème} édition, Lavoisier Techniques et Documentation, paris.

C

- Cazes D. 2005**. Encyclopedia of Chromatography In « Phenolic Acids in Naturel Plants : Analysis by HPLC ». 1806 pages.
- Chabot S., Bel-Rhlid R., Chênevert R., et Piché Y. 1992**, Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂- enriched conditions. *New Phytol.*, **122**, 461-467.
- Chami, F. 2005**. Evaluation in vitro de l'action antifongique des huiles essentielles d'origane et de Girofle et de leurs composés majoritaires in vivo. Application dans la prophylaxie et le traitement de la candidose vaginale sur des modèles de rat et de souris Immunodéprimés. *Thèse doctorat : université sidi mohamed ben abellah, maroc*. P27-28.

- Chan E., Lim Y., Wong L., Lianto F., Wong S., Lim K., Joe C., et Lim T, 2008**, Antioxydant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species, *Food Chemistry* 109: 477–483.
- Chen N., Chen C., Chang C., Chung Y., Wang C., Yuan T., et Tsu L. 2008**, Antioxydant and Antimicrobial Activity of Zingiberaceae Plants in Taiwan, *Plant Foods Hum Nutr*, 63:15–20.
- Chung W., Sri N., et Halijah I. 2013**, Antioxydant potential, cytotoxic activity and total phenolic content of *Alpinia pahangensis* rhizomes, *Complementary and Alternative Medicine*, 13:243.
- Cowan M. 1999**, Plant products as Antimicrobial Agents, *Clin. Microbiol Re*, 12(4): 564-582.
- Croteau R., Kutchan T., et Lewis, N. 2000**. Natural products (Secondary Metabolites). *American Society of plant physiologists*, 24,p.1251-1254.
- Crozier A., Clifford M., et Ashihara H.. 2006**, Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Black well publishing Ltd.
- Csek J., Kirakosyane A., Kaufman P., Warber S., Duke J., et Briemann H. 2006**, Natural products from plants. *Taylor & francis Group. 2nd ed. New York. 551p.*
- D**
- Dan L., Wei Q., Ling Z., et Jing Y. 2012**, A novel dimeric diarylheptanoid from the rhizomes of *Alpinia officinarum*, *Chinese Chemical Letters*, (23), 189-192.
- Dan L., Yan-Wen L., Fu-Qin G., et Jing-Yu L. 2014**, New cytotoxic diarylheptanoids from the rhizomes of *Alpinia officinarum* Hance, *Fitoterapia*, (96),76-80.
- Derbel S. et Ghedira K. 2005**, Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*, 1 : 28-34.
- Djenane. D, Yangüela J., F. Derriche, L. Bouarab P., et Roncales, 2012**, Extrait de feuilles d'olivier ; tests in vitro vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis et *Pseudomonas aeruginosa* ; application sur la viande de dinde, *Phytothérapie* (2012) :10–18.
- Do Q., Angkawijaya A, Lan T., Phuong N., Huong H., Edi S, F., Ismadji S., et Ju, Y. 2013**, Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoids content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*, *Journal of Food and Drug Analysis*, 316-320.
- E**
- Edenharder R., et Grunhage 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. *Mutat.res*, 540: 1-18.
- ElBeyrouthy M., Arnold N, Delelis-dusollier N., et Dupony F.2008**, Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon, *Journal of ethnopharmacology*. 120:315-334.
- Elqaj M., Ahami A., et Belghyti D.2007**. La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires, Paperpresentedat the journée scientifique « ressources naturelles et antibiotique », Maroc.
- El-Rhaffari L., et Zaid A. 2004**, Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée.
- Eumkeb G., Siriwong S., Phitaktim S., Rojtinnakorn N. et Sakdarat S. 2011**, Synergistic activity and mode of action of flavonoids isolated from smaller galangal and amoxicillin combinations against amoxicillin-resistant *Escherichia coli*, *Journal of Applied Microbiology*, 1364-5072.
- Eymard S . 2003**. Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conversation et de la transformation de chinchard (*Trachurus trachurus*), choix des

procedés. Thèse de Doctorat en Génie des procédés (Ecole Doctorale en Génie des procédés : Spécialité Biochimie. Nant. France.

F

- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. et Abdelly C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*, **331** : 372–379.
- Farnsworth N., Akerrle O., Soejarto D., et Guo D. 1986.** Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. Bulletin de l'organisation mondiale de la santé, 64(2), 159-164.P3
- Faure H., Fayol V., Galabert C., Grolier P., et Moël G. 1999,** Les caroténoïdes : 1. Métabolisme et physiologie, *Annales de Biologie Clinique*, 57 : 169 183.
- Fragoso R., Reyes-Esparza J., Burchielb S., Herrera-Ruiza D., et Torrese E.2008,** Risks and Benefits of Commonly used Herbal Medicines in México. *Toxicol Appl Pharmacol.*15;227(1).125-135.

G

- Gao-jun F., Young-Hwa K., Yong N., et Byung H. 2007,** Platelet-activating factor (PAF) receptor binding antagonists from *Alpinia officinarum*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (17) 6720-6722.
- Ghosh S., et Rangan L. 2013,** *Alpinia*: the gold mine of future therapeutics, *Biotech (REVIEW ARTICLE)* 3:173–185.
- Ghourri M., Lahcen Z et Allal D. 2014,** La phytothérapie et les infections urinaires (La pyélonéphrite et la cystite) au Sahara Marocain (Tan-Tan), *Journal of Animal & Plant Sciences*,107: 265-272.
- Gouzi H., Leboukh M., et Bouchouka E. 2013,** Antioxidant and Antiradical Properties of Methanolic Extracts from Algerian Wild Edible Desert Truffles (*Terfezia* and *Tirmania*, Ascomycetes), *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 437-488.
- Griangsak E., Santi S., et Supatcharee S. 2010,** Reversing β -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime, *Phytomedicine*, (18) 40-45.

H

- Haddouchi F., Lazouni H., Ahmmer K., Carson C., et Riley T. 1991,** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of Applied Microbiology*, 86;985-990.
- Haeng-Byung L., Hyun-Kyung L., Jun-Ran K., et Young-Joon A. 2009,** Anti-Helicobacter pylori Diarylheptanoid Identified in the Rhizome of *Alpinia officinarum*, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 52(4), 367-370.
- Hagerman A., Muller-Harvey I., et Makkar H. 2000,** Quantification of tannins in tree foliage. Joint FAO/IAEA, Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Vienna 26 P.
- Hagerman A., et Butler L. 1981,** The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J. Biol. Chem.*; 256: 4494-4497.
- Hagerman A., Riedl K., et Rice R. 1999.** Tannins as biological antioxidants. *Plant Polyphenols Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology*, **2**: 495- 505.
- Hans W. 2007,** 1000 plantes aromatique et médicinales. terres édition. Toulouse, P39
- Harbone J. 1998,** *Phytochemical Methods*, a guide to modern techniques of plant analysis. Ed Chapman et Hall, 3ème Edition.
- Hatano T., Kusuda M., Inada K., Ogawa T., Shiota S., Tsuchiya T., et Yoshida T. 2005.** Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry* 66: 2047-2055.
- Havsteen B., 2002.** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, 96: 67-202.

- Heim K.E., Tagliaferro A.R. et Bobilya D. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572- 584.
- Hennebelle T., Sahpaz S., et Bailleul F. 2004 .**, Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1: 3-6.
- Hisashi M., Souichi N., Yoshimi O., Seikou N., et Masayuki Y. 2009**, Melanogenesis inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* in B16 melanoma cells, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, (17) 6048-6053.
- Houdert, J. 2004**, bien se soigner par les plantes, Un guide pratique pour traiter les troubles et affection du quotidien de toute la famille. *Pocket Evolution*.633p.
- Hubert J. 2006**, Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat à l'Institut Nationale Polytechnique de Toulouse, Ecole Doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries.
- Hui H., Dan W., Wei-Xi T., Xiao-Feng M., et Xiao-Dong W. 2008**, Antimicrobial effect by extracts of rhizome of *Alpinia officinarum* Hance may relate to its inhibition of *b*-ketoacyl-ACP reductase, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23(3):362-368.
- I**
- Iserin P., Masson M., Restellini J .,Ybert E., Meux L., Moulard F., et Botrel A. 2001.** *Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins* (larousse ED) : P3
- J**
- Jayaprakasha G et Patil B. 2007**, In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange, *Food Chemistry*, 101: 410-418.
- JiSuk L., Kyoung A., SeonHui J., SungGeum L., Hi Joon P., Nam J., et Sabina Lim, 2009**, Anti-inflammatory, anti-nociceptive, and anti-psychiatric effects by the rhizomes of *Alpinia officinarum* on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats, *Journal of Ethnopharmacology*, (126) 258-264.
- JuntachoteT., et Berghofer E. 2005**, Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of Holy basil and Galangal, *Food Chemistry*, 92:193–202.
- K**
- Kasperek M., al-Janabi S. 2008**, Plantes médicinales, La diversité biologique au service de la santé. *Deutsch Gesellschaft für Technische Zusammenarbit.* 146-149.
- Ken Y ., Yi S ., Susumu K , Naoyuki T., Motofumi M ., et Shigeyasu M. 2008**, Inhibitory effect of the rhizomes of *Alpinia officinarum* on TPA-induced inflammation and tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin, *NATURAL RESOURCE LETTER*, 62:374–378.
- Kim D., Chun O., Kim Y., Moon H .,et Lee C. 2003**, Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J. Agric, Food Chem.*, 51(22), 6509-6515.
- Koehlin-Ramonatxo C. 2006.** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20 : 165–177.
- Krishna D., Chaluvadi M., Raj N., et Sripal R. 2001**, Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.* 2001; 33: 2-16.
- Krishnan S., Chinnasamy S., Kontham S., Nabajyoti G., Sankaranarayanan M., Arun B., et Baddireddi S. 2009**, Tackling multiple antibiotic resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) clinical isolates: a diarylheptanoid from *Alpinia officinarum* shows promising antibacterial and immunomodulatory activity against EPEC and its

lipopolysaccharide-induced inflammation, *International Journal of Antimicrobial Agents*,(33), 244–250.

Ksouri R., Debez A., Falleh H., Grignon C., et Abdely C. 2007, Salinity effects on polyphenol content and antioxydant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritime*. *Plant . physiol Bioch*, 45:244-249.

L

Lahouel M., Boulkour S., Segueni N., et Fillastre J. 2004. Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Pathologie Biologie*, 52 : 314–322.

Leinmüller E., Steingass H., et Henke K. 1991, Tannins in ruminant feedsutuffs. *Animal Research and Developpement*, 33 : 9-56.

Lesueur D., Serra D., Rocca D Bighelli A., Hoi T., Ban N., Thai T., et Casanova J. 2007, Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Michelia faveolata* Meryll ex Dandy from Vietnam. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 317-321.

Lichtenthaler H. 1985, Differences in morphology and chemical composition of leaves grown at different light intensities and quality. – In: Baker, N.C., Davice, W.J., Ong, C.K. (ed): *Control of Leaf Growth*. Pp. 201-221. Cambridge – London –New Rochelle – Melbourne- Sydney.

Lin Z., Anjaneya S., Ravipati R., Koyyalamudi, Sang C., Narsimha R., Bartlett J., Paul T., Smith M., Maria C., Ángeles M., Ester J., et Francisca V. 2013, Anti-fungal and anti-bacterial activities of ethanol extracts of selected traditional Chinese medicinal herbs, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* , 673-681.

Ling Z., Jing Y., Jing Z., et Yun C. 2010, A novel diarylheptanoid bearing flavonol moiety from the rhizomes of *Alpinia officinarum* Hance, *Chinese Chemical Letters*, (21)149-196.

LIU D., QU W., ZHAO L., GUAN F., et LIANG J. 2014, A new dimeric diarylheptanoid from the rhizomes of *Alpinia officinarum*, *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(2): 0139- 0141.

Liyana-Pathirana C et Shahidi. 2005, Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology, *Food Chemistry*, 93 : 47-56.

Louis S. 2004, Diversité structurale et d'activité biologique des Albumines entomotoxique de type 1b des graines de légumineuses. *Thèse doctorat : institut national des sciences appliquées de lyon*. P.28-30.

M

Malek B, Habib M., Mssada K., Ben Jannet H., Aouni M., et Boulbaba S. 2015, Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of roots extracts from the Tunisian *Scabiosa arenaria* Forssk, *Industrial Crops and Products*, 62-69.

Mann C., et Markham J. 1998, A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils, *Journal of Applied Microbiology*, 84: 538-544.

Marcheix J., et Fleuriet A. et Jay-Allemand C. 2005. Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires Romandes. pp : 87-149.

Márquez-García B., Fernández M.Á. et Córdoba F. 2009, Phenolics composition in *Erica* sp. differentially exposed to metal pollution in the Iberian Southwestern Pyritic Belt. *Bioresource Technology*, 100: 446–451.

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

Mayachiew P., et Devahastin S. 2008, Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts - *Food Science and Technology*, 41: 1153–1159.

- Meyer A., Deiana J., et Leclerc H ., 1999.** Cours de microbiologie générale, nouveau programme. *Ed. DOIN*. pp : 212-213.
- Middleton E., Kandaswami C., et Theoharides T. 2000,** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, Vol.52, pp. 673-751.
- Minh T., Mignard B., vinter E., Ayala O ., Hong, P., Tuyen B ., Dechaux C., Lanoue A., Boitel-Conti M., Bourgaud F., et Gontier E. 2004.** Etude de la production d'alcaloïdes tropaniques chez *datura innoxia mill.* Cultive en hydroponie. Evaluation d'un procédé générique de production de métabolites végétaux a usage thérapeutique et/ou cosmétique. *UMR ENSALA-INRA*,p. 322-330.
- Mohammadi A., Nazari H., Imani S., et Amrollahi H. 2014,** Antifungal activities and chemical composition of some medicinal plants, *Journal de Mycologie Médicale*. 24, e1-e8
- Molyneux, P. 2004,** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxydant activity of the flavonoids from *Anaphalis sinica* Hance form; songklanakarin J. Sci, Technol, 26: 211-219..
- Morelle-Lauzanne E. 2006.** L'alimentation, le stress oxydatif : sources de lipoperoxydation, comment s'en protéger. *Phytothérapie*, 5 : 234-240.
- Mori A., Nishino C., Enoki N., et Tawata S ; 1987.** Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 26, 2231-2234.
- Moridani M., Pourahmad J., Bui H., Siraki A., et O'Brien P. 2003.** Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Journal of Free Radical Biology and Medicine*, 34: 243-253.
- Muthu, C., Ayyanar, M., Raja, N., et Ignacimuthu, S., 2006.** Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2:43 doi:10. 1186 /1746-4269-2-43pp.

N

- Negi P., Chauhan A., Sadia G., Rohinishree Y., et Ramteke R. 2005,** Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) seed extracts, *Food Chemistry*, 119-124.
- Nickell L.1943,** *Antimicrobial Activity of Vascular Plants, Biochemical Research and Development*, 281-318.
- Nijveldt R., Nood E., Hoorn D., Boelens P., Norren K., et Leeuwen P. 2001,** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74: 418-425.
- Ning A., Hong-wu Z., Li-zhen X., Shi-lin Y, et Zhong-mei Z. 2010,** New diarylheptanoids from the rhizome of *Alpinia officinarum* Hance, *Food Chemistry*, (119) 513-517.

O

- O'Kennedy R., et Thornes, R.D. (ed) .1997.** Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action. John Wiley and Sons Inc. New York. N.Y. Origine des pharmacopées traditionnelles et élaboration des pharmacopées savantes, 293-318.
- Oyaizu, M.,1986.** Studies on products of browning reaction-Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.

P

- Palaniselvam K., Mashitah M., Yusoff, Narasimha R., et Natanamurugaraj G., 2014.,** Evaluation of in-vitro antioxidant and antibacterial properties of *Commelina nudiflora L.* extracts prepared by different polar solvents. *Saudi Journal of Biological Sciences* : 09.016.

Paul S., Ferdinand. 2010. Guide des plantes médicinales, delanchaux et niestlé. Paris. P370
Phornchai P., Puongtip K. , Parirat K., Natthakarn C., Ampai P., et Chaiyong R., 2015, Investigation of anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic activities of *Stahlianthus involucratus* rhizome ethanol extract , *Journal of Ethnopharmacology*, 162 : 199–206.

Pietta P. 2000. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63 : 1035-1042.

Popovici C. , Saykova I., et Tylkowski B. 2009, Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*. 4 : 25-39.

Pribitkin E., et Boger G. 2001. Herbal therapy. *Arch Facial plast Surg*, 3, p.127-132.

R

Ray P., et Majumdar S., 1973, Antimicrobial Activity of Some Indian, Plants, *ECONOMIC BOTANY* 30:317-320.

Ribéreau-Gayon J, Peynaud m, Ribéreau-Gayon P et Sudraud P. 1972, Sciences et techniques du vin. Tome 1, analyse et contrôle des vins. Ed. Dunod, Paris, , p. 671.

Ribereau–Gayon P. 1968. Notion générale sur les composés phénoliques. *In : Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod.* pp : 1-40.

Rodriguer-Vaquero M., Alberto M et Manca de Nadra M. 2007. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines, *Food Control*, 18: 93-101.

Rolland Y. 2004, Antioxydants naturels végétaux. *OCL*, 11 :419-424.

S

Saidana D., Mahjoub M., Boussaada O., Chriaac J., Chéraif I., Daami M., Mighri Z., et Helal A. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile compounds of *Tamarix boveana* (Tamaricaceae). *Microbiological Research*, 163 : 445-455.

Samarghandian S., Mousalreza H., Tavakkol J., et Mohadeseh H., 2014, Antiproliferative activity and induction of apoptotic by ethanolic extract of *Alpinia galanga* rhizome in human breast carcinoma cell line, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14:192.

Samarth R., Panwar M., Soni A., Kumar M., et Kumar A. 2008, Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant Extract *Food Chemistry*, 106, 868-873.

Samy, R., et Gopalakrishnakon p. 2008, Therapeutic Potential of plants as Anti-microbial for Drug Discovery. *CAM Advance Access published*, p.1-12.

Sarni-Manchado P et Cheynier V. 2006, Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec & Doc, Paris, 2006, p. 2-10.

Scalbert A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30 : 3875-3883.

Seigler D. 1998, *Plant secondary metabolism.* Ed. **Kluwer Academic, et Boston**, p. 193-205.

Senthilkumar P., et Sudha S. 2012. Antioxidant and antibacterial properties of methanolic extract of green seaweed *Chaetomorpha linum* from Gulf of Manner : Southeast coast of India. *Jundishapur J Microbiol.* 5: 411-415.

Singh R. , Muftah A., Shushni., et Asma B. 2015, Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L, *Arabian Journal of Chemistry*, 8, 322–328.

Singleton V., et Rossi J. 1965, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-153.

Srividya A., Dhanabal S., Misra V., et. Suja G, 2010, Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Alpinia officinarum*, *Indian J Pharm Sci*, 145-148.

Strang C. 2006, *Larousse médical.* Paris : larousse. P2

T

- Tao L, Wang E., Zhu ., et Lu H, Wei D. 2006**, HPLC analysis of bioactive flavonoids from the rhizome of *Alpinia officinarum*, *South African Journal of Botany*, (72) 163-166.
- Tim C., et Lamb A. 2005**, Review Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26 : 343–356.
- Tram N., Makoto S., Koji K., et Ryo Y. 2004**, Antioxidative compounds isolated from the rhizomes of smaller galanga (*Alpinia officinarum* Hance), *BioFactors*, (21) 305-308.
- Trease E .,et Evans W. 1987**, Pharmacognosy Billiaire. Editions Tindall London 13, 61-62.
- Tsao R., et Deng Z. 2004**, Separation procedure for naturally occurring antioxydant phytochemicals. *Journal of Chromatography B.812*, p.85-99.
- Turgeon, M. 2001**, Profil des produit forestier, première transformation, huiles essentielles. *Ministère des ressources naturelles, Québec.21p.*
- V**
- Vermerris W., et Nicholson R. 2006**, Phenolic compounds biochemistry. Springer science.netherlands. 276p.
- Virgili F., Scaccini C., Packer L. et Rimbach G. 2001**, Antioxidants and health : Cardiovascular disease and nutritional phenolics. In « Antioxidants in food Practical applications ». Ed. *CRC Press LLC, North and South America*. pp : 87 96.
- W**
- Wang Y., Shuangru H., Shuhong S., Lisheng Q., et Ping X. 2012**, Studies on bioactivities of tea (*Camellia sinensis* L.) fruit peel extracts: Antioxidant activity and inhibitory potential against α -glucosidase and α _ amylase in vitro, *Industrial Crops and Products*, 520-526.
- Wargovich M., Woods C., Hollis D., et Zander M. 2001**. Herbals, Cancer prevention and Health, *The Journal of nytrition.131*, p. 3034S-3036.
- Wojdylo A., Oszmianski J., Woods C., Hollis D., et Zander M .2007**.*Herbals, Cancer prevention and health, The Journal of Nutrition*, 131: 3034S-3036.
- X**
- XU S., HUANG ., Wang Y., et Wen-Cai Y. 2012**, A new cadinane sesquiterpene from the rhizomes of *Alpinia officinarum*, *Chinese Journal of Natural Medicines*, 10(5):0374-0377.
- Y**
- Yakhlef1 G., Laroui1 S., Hambaba1 L., Aberkane M., et Ayachi A. 2011**, Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle, *Ethnopharmacologie*, 9:209-218.
- Yao L ., Jiannng .,Shi J., Tomas-Barberan F., Datta N., Singanusong R., et Chen S. 2000**, Flavonoids in food and their health benefits, *Plant. Food Hum. Nutr*, 59: 113-122.
- Yen Y., Shih C., et Chang C. 2008**, Effect of adding ascorbic acid and glucose on the antioxidative properties during storage of dried carrot. *Food Chemistry* 107: 265-272.
- Z**
- Zemmer N. et Cordesse R. 1996**, Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants, *INRA Prod. Anim*, 9 (3) : 167-179.
- Zhao B et Hall C. 2008**, Composition and antioxidant activity of raisin extracts obtained from various solvents, *Food Chemistry* 108: 511-518.
- ZHAO L., QU W., Ju-Qin F., et Jing-Yu L. 2010**, A New Diarylheptanoid from the Rhizomes of *Alpinia officinarum*, *Chinese Journal of Natural Medicines*. 8(4): 0241-0243.
- Zhi-Sheng X., Xin-Jun X., Chun-Yan X., Jie-Yun H., Mei Y., et De-Po Y, 2013**, Volatile componentsof Rhizoma *AlpiniaeOfficinarum* using threedifferentextractionmethodscombinedwith gas chromatography–massspectrometry, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3(3): 215-220.

Annexes

- **Bouillon BHIB :**

Infusion de cervelle de veau.....12.5g
 Infusion de coeur de boeuf.....5.0g
 Peptone.....10.0g
 Glucose.....2.0g
 Chlorure de sodium.....2.0g
 Phosphatase di sodique.....5g

pH= 7.4

Préparation

37g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C, 20min.

- **Eau physiologique :**

Eau distillé1000ml
 NaCl.....9g

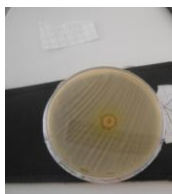
- **TABLEAU :** Les valeurs des diamètres d'inhibition des extraits d'*Alpinia officinarum* par la méthode des disques et la méthode des puits (diamètre disque = 6 mm).

Extrait	Méthode	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aureus</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Escherichia coli</i>
Acétone	<i>Disque</i>	14±1.41	6±0.00	7±0.00	7±0.14
	<i>Puits</i>	23.68±3.42	9.2±0.49	8.87±0.10	9.85±0.21
Méthanol	<i>Disque</i>	11±1.41	6±0.00	7±0.07	6±0.00
	<i>Puits</i>	22.13±2.09	10.85±0.35	9.65±1.48	10.31±0.62
MéOH-eau	<i>Disque</i>	11.95±0.07	9±1.41	6.95±1.34	7.8±1.13
	<i>Puits</i>	24.98±0.25	12.75±0.70	12.12±0.17	12.22±1.37
Chloroforme	<i>Disque</i>	15.5±2.12	6±0.00	6±0.00	6.5±0.70
	<i>Puits</i>	32.22±2.14	10.16±0.23	6±0.00	9.67±0.95

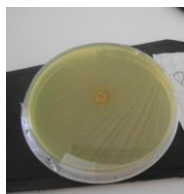
Annexes III

Photos de la méthode des puits

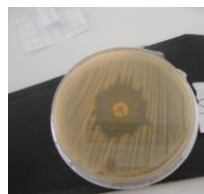
1- Chloroforme



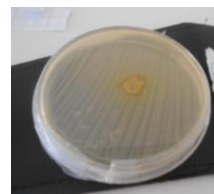
KI



Pa

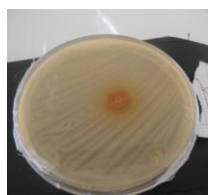


Sa

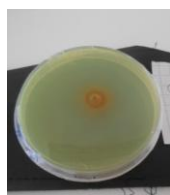


Ec

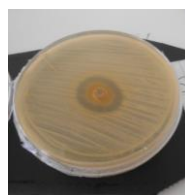
2- Acétone



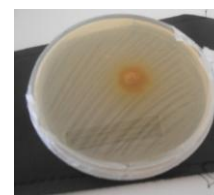
KI



Pa



Sa

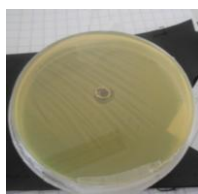


Ec

3- Contrôle



KI



Pa

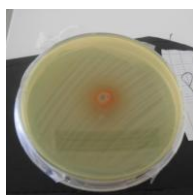


Sa

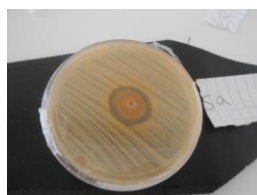


Ec

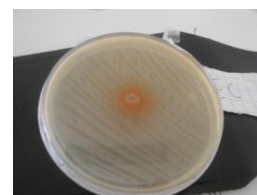
4- méOH-eau



Pa

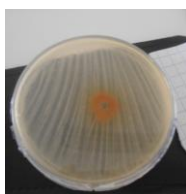


Sa



Ec

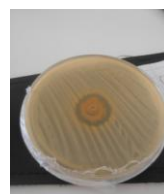
5- Méthanol



KI



Pa



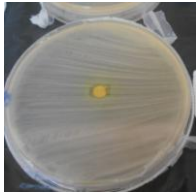
Sa



Ec

Photos de la méthode des disques

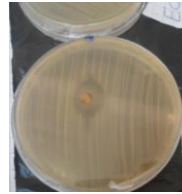
1- Chloroforme



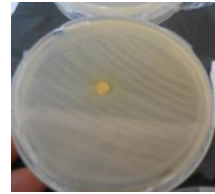
KI



Pa



Sa

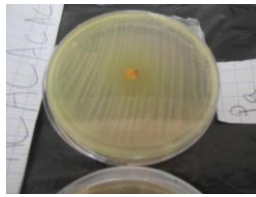


Ec

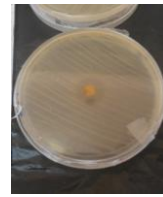
2- Acétone



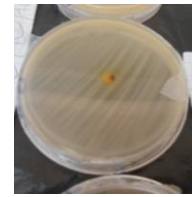
KI



Pa



Sa



Ec

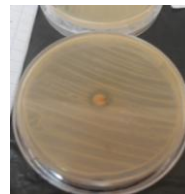
3- Méthanol



KI



Pa

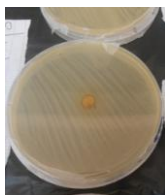


Sa

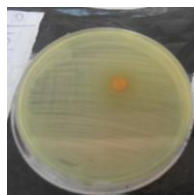


Ec

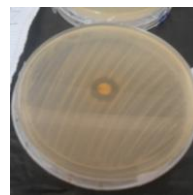
4- méOH-eau



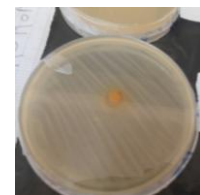
KI



Pa

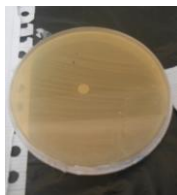


Sa



Ec

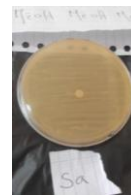
5- contrôle



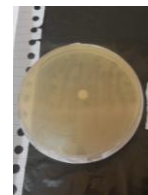
KI



Pa



Sa



Ec

Résumé

L'étude de l'espèce *Alpinia Officinarum* qui appartient à la famille des Zingibéracées, a porté d'une part sur un screening phytochimique visant à caractériser les différentes familles de composés chimiques contenus dans le rhizome et d'autre part l'effet du solvant d'extraction sur le pouvoir antioxydant et l'activité antibactérienne. Quatre extraits bruts secs ont été préparés à partir de cette espèce en utilisant différents solvants et de différentes polarités (chloroforme, acétone, méthanol et un mélange méthanol-eau 70-30 (v/v)). Le méthanol donne un meilleur rendement d'extraction de 10.5%. Les tests phytochimiques révèlent que les tanins, les phénols, les flavonoïdes et les composés réducteurs sont les constituants les plus abondants dans les extraits d'*Alpinia officinarum*.

Les solvants polaires (acétone, méthanol et méthanol/eau) sont riches en phénols, flavonoïdes et en caroténoïdes avec des teneurs variables.

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de réduction de fer (FRAP) et celle du piégeage de radical libre DPPH des extraits a montré que l'extrait méthanolique a le pouvoir antiradicalaire le plus puissant ($EC_{50} = 0.42$ mg/mL) tandis que l'extrait acétonique a le pouvoir antiradicalaire le plus élevé ($EC_{50} = 1.21$ mg/mL).

L'évaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur le milieu Muller-Hinton gélosé montre que seul la bactérie *Staphylococcus aureus* est la plus sensible parmi les bactéries testées en particulier vis-à-vis des extraits acétoniques et chloroformiques.

Mots clés : *Alpinia Officinarum*, étude phytochimique, solvant d'extraction, composés phénoliques, flavonoïdes, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

Abstract

The study of the specie *Alpinia Officinarum* that belongs to the family Zingiberaceae, focused in part on the phytochemical screening to characterize the various families of chemical compounds contained in the rhizome and in the author part the effect of extraction solvent on the antioxidant and antibacterial activity. Four dry crude extracts were prepared from this specie by using different solvents and different polarities (chloroform, acetone, methanol and a methanol-water 70:30 (v / v)). Methanol gives a better extraction yield of 10.5%. The phytochemical tests reveal that the tannins, phenols, flavonoids and reducing compounds are the most abundant constituents in extracts of *Alpinia officinarum*.

Polar solvents (acetone, methanol and methanol / water) are rich in phenols, flavonoids and carotenoids with variable contents.

The evaluation of the antioxidant activity by the ferric reducing power (FRAP) and the free radical scavenging DPPH extracts showed that the methanol extract has the most powerful anti-radical power ($EC_{50} = 0.42$ mg / mL) while the acetone extract has the highest reducing power ($EC_{50}=1.21$ mg/mL).

The evaluation of antibacterial activity by diffusion method on Muller-Hinton agar medium shows that only the bacterium *Staphylococcus aureus* is the most sensitive among the tested bacteria in particular with the acetone and chloroform extracts.

Keywords: *Alpinia officinarum*, phytochemical study, solvent extraction, phenolic compounds, flavonoids, antioxidant activity, antimicrobial activity.

ملخص

ان دراسة نوع الخولنجان (*Alpinia Officinarum*) الذي ينتمي إلى عائلة الزنجبيليات، التي ركزت من جهة على الفحص الكيميائي النباتي لتوصيف عائلات مختلفة من المركبات الكيميائية الواردة في الجذور ومن جهة أخرى تأثير مذيبي الاستخراج على النشاط المضاد للأوكسدة ومضاد للبكتيريا. تم إعداد أربعة مستخلصات خامة جافة من هذا النوع باستخدام المذيبات المختلفة بأقطاب مختلفة (كلوروفورم، والأسيتون، والميثانول، وميثانول - ماء 70:30 ح / ح). الميثانول يوفر أفضل مردود استخلاص بنسبة 10.5%. الاختبارات الفيتوكيميائية تكشف عن أن التانينات، الفينولات، والفلافونويدات والمركبات المرجعة هي المكونات الأكثر وفرة في مذيبات (*Alpinia Officinarum*)

المذيبات القطبية (الأسيتون، والميثانول، والميثانول / الماء) غنية بالفينولات، والفلافونويدات والكاروتينويدات بكميات متغيرة. وأظهر تقييم نشاط مضادات الأوكسدة من خلال طريقة الحد من الحديد (FRAP) ومقتطفات الجذور الحرة DPPH أن مستخلص الميثانول لديه القدرة الأقوى المضادة للجزيئات ($EC_{50} = 0.42$) ملغ / مل في حين أن مستخلص الأسيتون لديه أعلى سلطة خفض ($EC_{50} = 1.21$) ملغ / مل.

تقييم النشاط المضاد للبكتيريا عن طريق أسلوب نشر على الوسط Muller-Hinton الهلامي أظهر ان بكتيريا *Staphylococcus aureus* هي الأكثر حساسية بين أنواع البكتيريا المختبرة ولا سيما مع المذيب الأسيتون والكلوروفورم.

الكلمات المفتاحية : *Alpinia Officinarum* ، دراسة فيتوكيميائية، الاستخلاص بالمذيبات، مركبات الفينول، مركبات الفلافونويد، النشاط المضاد للأوكسدة، والنشاط المضاد للميكروبات..