

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abou Bekr Belkaïd -Tlemcen-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie

Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-Chimie, Synthèse et Activité Biologique

Laboratoire Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement

Mémoire de Magister en Biologie

Option

Maitrise de la Qualité Microbiologique et du Développement Microbien

Présenté et soutenu par :

Mlle MEZOUAR Dounia

Recherche d'activités biologiques de
Berberis vulgaris

Au près du Jury suivant :

- ❖ **BOUCHERIT-ATMANI Zahia**, Dr. à l'Université de Tlemcen, Présidente du jury.
- ❖ **ABDELOUAHID Djamel Eddine**, Prof. à l'Université de Tlemcen, Directeur de recherche.
- ❖ **DJAZIRI Rabah**, Prof. à l'Université de Tlemcen, Co-Directeur de Recherche.
- ❖ **ATIK-BEKKARA Fawzia**, Prof. à l'Université de Tlemcen, Examineur.
- ❖ **LAHFA Farid Boucif**, Dr. à l'Université de Tlemcen, Examineur.

Année Universitaire : 2012 – 2013

À la mémoire de ma grand-mère
Mehtari Fatima

« Le meilleur médecin est la nature : elle guérit
les trois quarts des maladies et ne dit jamais de
mal de ses confrères. » Louis Pasteur

Table des matières

Table des matières	4
Liste des tableaux	8
Liste des figures	10
Liste des abréviations	12
Résumé.....	14
Abstract.....	15
الملخص.....	16
Introduction.....	17
Synthèse Bibliographique.....	20
I. Plantes médicinales	21
1. Introduction	21
2. Métabolites secondaires.....	22
a. Phénols et polyphénols	22
➤ Acide phénolique	22
➤ Flavonoïdes	23
➤ Quinones.....	24
➤ Tanins	24
➤ Coumarines.....	25
b. Terpénoïdes et stéroïdes	25
c. Alcaloïdes.....	26
3. Rôles des plantes médicinales dans le développement des traitements	28
II. Stress oxydatif	31
1. Introduction	31
2. Stress oxydatif	33
3. Antioxydants	33
a. Antioxydants enzymatiques.....	34
b. Antioxydants non enzymatiques	35
III. Antimicrobiens	36
1. Antibiotiques	36

2.	Antifongiques	38
IV.	<i>Berberis vulgaris</i>	41
1.	Classification	41
2.	Description botanique	41
3.	Répartition géographique	42
4.	Composition chimique.....	42
5.	Activités biologiques	45
6.	Utilisation traditionnelle	47
7.	Travaux antérieurs sur <i>Berberis vulgaris</i>	48
8.	Berberine	49
	Matériels et Méthodes	52
I.	Etude phytochimique.....	53
1.	Matériel végétal	53
2.	Extraction	54
3.	Extraction des alcaloïdes totaux	54
4.	Tests phytochimiques	54
a.	Alcaloïdes.....	55
b.	Substances polyphénoliques	55
	➤ Flavonoïdes : Réaction à la cyanidine.....	55
	➤ Anthocyanines (Leucoanthocyanes)	55
	➤ Tanins	55
c.	Coumarines.....	55
d.	Anthraquinones	56
e.	Stérols et triterpènes Lieberman – Burchardt.....	56
f.	Terpénoïdes : Test de Slakowski	56
g.	Saponosides	56
h.	Composés réducteurs.....	56
i.	Mucilages	56

j.	Glycosides cardiaques : Test Keller- Killani	57
5.	Dosage des polyphénols totaux.....	57
6.	Dosage des flavonoïdes	57
7.	Chromatographie sur couches minces CCM.....	58
II.	Activité biologique	60
1.	Activité antibactérienne.....	60
a.	Souches utilisées.....	60
b.	Technique de diffusion sur gélose	61
c.	Méthode de microdilution sur milieu liquide.....	61
2.	Activité antifongique	62
a.	Technique de diffusion sur gélose	62
b.	Détermination de la concentration minimale inhibitrice	63
3.	Activité antioxydante.....	63
a.	Réduction du fer – FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power	63
b.	Piégeage du radical libre DPPH.....	64
	Résultats et Interprétation.....	66
I.	Etude phytochimique.....	67
1.	Extraction	67
2.	Tests phytochimiques	68
3.	Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes	69
4.	Alcaloïdes totaux et CCM	70
II.	Activité biologique	71
1.	Activité antibactérienne.....	71
a.	Evaluation de l'activité des extraits de <i>Berberis vulgaris</i> par la méthode de diffusion des disques.....	71
b.	Détermination de la concentration minimale inhibitrice	74
2.	Activité antifongique	75
a.	Méthode de diffusion des disques.....	75

b. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	78
3. Activité antioxydante.....	80
a. Réduction du fer FRAP	80
b. Piégeage du radical libre DPPH.....	81
Discussion.....	86
Conclusion Générale.....	93
Références Bibliographiques.....	97
Annexes.....	112

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales classes d'alcaloïdes.....	27
Tableau 2 : Quelques exemples des principaux médicaments d'origine végétale de produits naturels.....	29
Tableau 3 : Principales espèces réactives oxygénées.....	31
Tableau 4 : Antioxydants enzymatique et non enzymatique.....	34
Tableau 5 : Classes d'antibiotiques et leurs cibles.....	36
Tableau 6 : Classes d'antifongiques et leurs cibles.....	39
Tableau 7 : Composition chimique de <i>Berberis vulgaris</i>	43
Tableau 8 : Quelques activités biologiques de <i>Berberis vulgaris</i>	45
Tableau 9 : Souches utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne.....	60
Tableau 10 : Résultats de l'examen phytochimique.....	68
Tableau 11 : Analyse chromatographique des alcaloïdes totaux de <i>Berberis vulgaris</i>	70
Tableau 12 : Zones d'inhibition obtenues pour les extraits de <i>Berberis vulgaris</i>	72
Tableau 13: Concentrations minimales inhibitrices CMI des extraits de <i>Berberis vulgaris</i> vis-à-vis des souches bactériennes.....	74
Tableau 14: Zones d'inhibition obtenues pour les extraits de <i>Berberis vulgaris</i>	76
Tableau 15: Concentrations minimales inhibitrices CMI des extraits de <i>Berberis vulgaris</i> vis-à-vis des levures.....	79
Tableau 16: Valeurs des IC ₅₀ des extraits de <i>Berberis vulgaris</i>	82
Tableau 17 : Rendements obtenus pour les extraits bruts sous reflux de <i>Berberis vulgaris</i>	117
Tableau 18 : Rendements obtenus pour les extraits bruts macérés de <i>Berberis vulgaris</i>	117
Tableau 19 : Densités optiques obtenues pour l'extrait hydrométhanolique de <i>Berberis vulgaris</i> testé par la méthode FRAP.....	118

Tableau 20 : Densités optiques obtenues pour les alcaloïdes totaux de <i>Berberis vulgaris</i> testé par la méthode FRAP.....	118
Tableau 21 : Densités optiques obtenues pour l'acide ascorbique testé par la méthode FRAP...	119
Tableau 22 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydrométhanolique.....	119
Tableau 23 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations des alcaloïdes totaux.....	120
Tableau 24 : Activité antiradicalaire de l'extrait hydrométhanolique de <i>Berberis vulgaris</i>	120
Tableau 25 : Activité antiradicalaire des alcaloïdes totaux de <i>Berberis vulgaris</i>	121

Liste des figures

Figure 1 : Structure de l'acide caféique.....	23
Figure 2 : Structure d'une molécule de quinone.....	24
Figure 3 : Structure d'une molécule de coumarine.....	25
Figure 4 : Production et neutralisation des espèces réactives de l'oxygène.....	32
Figure 5 : Réactions enzymatiques de piégeage des espèces réactives oxygénées.....	34
Figure 6 : <i>Berberis vulgaris</i>	42
Figure 7 : Structure de berberine.....	49
Figure 8 : Ecorce des racines de <i>Berberis vulgaris</i>	53
Figure 9 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.....	59
Figure 10 : Schéma récapitulatif des tests biologiques.....	65
Figure 11 : Rendements des extraits sous reflux de <i>Berberis vulgaris</i>	67
Figure 12 : Rendements des extraits macérés de <i>Berberis vulgaris</i>	67
Figure 13 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	69
Figure 14 : Courbe d'étalonnage de la catéchine.....	70
Figure 15 : Photos des plaques CCM prises avant et après révélation à la lumière UV à 366 nm.....	71
Figure 16 : Zones d'inhibition des extraits butanolique (7) macéré et alcaloïdes (9) vis-à-vis de <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047.....	73
Figure 17 : Zones d'inhibition des extraits butanolique (7) macéré et alcaloïdes (9) vis-à-vis de <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876.....	73
Figure 18 : Zones d'inhibition des extraits aqueux et hydrométhanoliques macérés et sous reflux (1, 2, 5 et 6) et l'extrait butanolique sous reflux (3) vis-à-vis de <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876.....	73
Figure 19 : Zones d'inhibition de l'extrait des alcaloïdes (9) vis-à-vis de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311.....	73
Figure 20 : Zones d'inhibition des extraits aqueux, hydrométhanoliques sous reflux et macérés (1, 2, 5 et 6) et butanolique et acétate d'éthyle sous reflux (3 et 4) vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> ATCC 26790.....	77
Figure 21 : Zones d'inhibition des extraits butanolique macéré (7) et alcaloïdes (9) vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> ATCC 26790.....	77
Figure 22 : Zones d'inhibition des extraits aqueux, hydrométhanoliques sous reflux et macérés (1, 2, 5 et 6) et butanolique sous reflux (3) vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> 444 IP...	77

Figure 23 : Zones d'inhibition des extraits butanolique macéré (7) et alcaloïdes (9) vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> 444 IP.....	77
Figure 24 : Zones d'inhibition des extraits aqueux, hydrométhanoliques sous reflux et macérés (1, 2, 5 et 6) et butanolique et sous reflux (3) vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	79
Figure 25 : Zones d'inhibition des extraits butanolique macéré (7) et alcaloïdes (9) vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	79
Figure 26 : Pouvoir réducteur des extraits hydrométhanolique et alcaloïdes totaux de <i>Berberis vulgaris</i> testés par la méthode FRAP.....	79
Figure 27 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydrométhanolique.....	81
Figure 28 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait des alcaloïdes totaux.....	81
Figure 29 : Représentations des régressions linéaires des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydrométhanolique.....	82
Figure 30 : Représentations des régressions linéaires des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait des alcaloïdes totaux.....	83
Figure 31 : Activité antiradicalaire de l'extrait hydrométhanolique.....	84
Figure 32 : Activité antiradicalaire de l'extrait des alcaloïdes totaux.....	84
Figure 33 : Activité antiradicalaire de l'acide ascorbique.....	85

Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

¹O₂ : Oxygène singulet

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ATCC : American Type Culture Collection

CCM : Chromatographie sur Couches Minces

CH₃OH : Méthanol

CHCl₃ : Chloroforme

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI : Concentrations Minimales Inhibitrices

DMSO : Diméthyl Sulfoxyde

DO : Densité Optique

DPPH : 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FeCl₃ : Chlorure de fer

FRAP : Ferric reducing antioxidant power

GPx : Glutathion Peroxidase

IC₅₀ : Concentration permettant d'inhiber 50% du radical DPPH

IP : Institut Pasteur

M : Molaire

MeOH : Méthanol

mg CEQ/g : mg équivalent catéchine par gramme de matière sèche

mg GAE/g : mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche

mg : Miligramme

mm : Millimètre

N : Normalité

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NCTC : National Collection of Type Cultures

NH₄OH : Ammoniaque

nm : Nanomètre

NO : Oxyde d'azote

O₂ : Oxygène moléculaire

PI : Pourcentage d'inhibition

RSA : Radical Scavenging Activity

SOD : Superoxyde dismutase

SRP : Superoxide Radical Production

TBA : Acide Thiobarbiturique

v/v : Rapport volume par volume

Zn : Zinc

Résumé

Les substances naturelles issues des végétaux présentent des intérêts multiples mis à profit dans la biotechnologie tant dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique. Parmi ces composés on retrouve une grande partie des métabolites secondaires qui se sont illustrés dans beaucoup de domaines et même en thérapie. Dans ce contexte, nous avons recherché les effets biologiques de *berberis vulgaris*, une plante utilisée dans le monde, en Algérie, et elle est particulièrement utilisée dans la région de Tlemcen pour traiter le diabète sucré.

L'examen phytochimique qualitatif réalisé sur les écorces de racines de *Berberis vulgaris* a montré la présence des alcaloïdes, des tanins, des stérols, des triterpènes et des composés réducteurs en quantité importante, il a en outre révélé des quantités plus faibles de coumarines, de terpénoïdes, de saponosides et de mucilages.

La détection de ces familles chimiques est suivie de l'extraction des écorces de racines de *Berberis vulgaris* par des solvants de polarité croissante et une extraction des alcaloïdes totaux. L'extrait des alcaloïdes a été analysé par chromatographie sur couche mince, révélant la présence de 6 tâches. Une analyse quantitative des polyphénols et des flavonoïdes de l'extrait hydrométhanolique sous reflux est réalisée, montrant une teneur de 10.48 mg GAE/g en polyphénols totaux et 2.05 mg CEQ/g en flavonoïdes.

Afin de pouvoir exploiter une éventuelle activité thérapeutique, des extraits bruts sous reflux et macérés, ainsi que l'extrait des alcaloïdes totaux ont été testés pour leur pouvoir antimicrobien vis-à-vis de souches de bactéries et de levures de référence, en utilisant la technique de diffusion sur gélose et la détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI. L'extrait hydrométhanolique macéré a présenté la meilleure activité antibactérienne avec des diamètres d'inhibition de 12.5 à 21 mm pour certaines souches. Les extraits de *Berberis vulgaris* et plus spécifiquement les alcaloïdes totaux, ont montré une forte activité antifongique vis-à-vis des levures de *Candida albicans* avec des zones d'inhibition de 19 à 29 mm.

L'activité antioxydante des extraits hydrométhanolique sous reflux et alcaloïdes totaux a été évaluée par deux méthodes : la réduction du fer et le piégeage du radical libre DPPH. Les résultats obtenus ont montré une activité élevée de l'extrait hydrométhanolique par rapport aux alcaloïdes totaux, avec un IC_{50} de 1.40 mg/ml et une activité antiradicalaire de 89.3 % à la concentration de 4 mg/ml.

Les résultats obtenus dans cette étude, montre la richesse de *Berberis vulgaris* en substances chimiques et qui pourraient représenter une nouvelle source potentielle de molécules bioactives en thérapeutique.

Mots-clés : *Berberis vulgaris*, extraits bruts, alcaloïdes totaux, activité antimicrobienne, activité antioxydante.

Abstract

Natural substances from plants have multiple interests exploited in the biotechnology industries both in food, cosmetic and pharmaceutical. These compounds include a large proportion of secondary metabolites which are illustrated in many areas and even in therapy. In this context, we investigated the biological effects of *Berberis vulgaris*, a plant used in the world, in Algeria, and it is particularly used in the Tlemcen region to treat diabetes mellitus.

The qualitative phytochemical examination performed on the root bark of *Berberis vulgaris* showed the presence of alkaloids, tannins, sterols, triterpenes and reducing compounds in large quantities, it also revealed lower amounts of coumarins, terpenoids, saponins and mucilage.

The detection of these chemical classes is followed by extraction of root bark of *Berberis vulgaris* using solvents with increasing polarity and extraction of total alkaloids. The alkaloid extract was analyzed by thin layer chromatography, revealing the presence of six tasks. A quantitative analysis of polyphenols and flavonoids is performed on hydromethanol extract under reflux, showing a content of 10.48 mg GAE / g of total polyphenols and 2.05 mg CEQ / g of flavonoids.

In order to exploit a possible therapeutic activity, crude under reflux and macerated extracts and total alkaloids were tested for their antimicrobial potency on different reference strains of bacteria and yeasts, using the agar diffusion technique and the determination of minimum inhibitory concentration MIC. The hydromethanolic macerated extract had the best antibacterial activity with inhibition diameters from 12.5 to 21 mm for some strains. Extracts of *Berberis vulgaris* and more specifically the total alkaloids showed a strong antifungal activity on *Candida albicans* yeasts with zones of inhibition of 19 to 29 mm.

The antioxidant activity of hydromethanolic extracts under reflux and total alkaloids was evaluated by two methods: reducing power and DPPH free radical scavenging. The results showed a high activity of methanolic extract than the total alkaloids, with an IC₅₀ of 1.40 mg / ml and antiradical activity of 89.3% at a concentration of 4 mg / ml.

The results obtained in this study show the richness of *Berberis vulgaris* with chemical substances and may represent a new potential source of bioactive compounds in therapy.

Keywords: *Berberis vulgaris*, crude extracts, total alkaloids, antimicrobial activity, antioxidant activity.

المخلص

المواد الطبيعية المستخلصة من النباتات لها مصالح متعددة لاستغلالها في التكنولوجيا الحيوية باستعمالها في المواد الغذائية، مستحضرات التجميل و المستحضرات الصيدلانية. تتضمن هذه المواد نسبة كبيرة من المركبات الثانوية التي يتضح استعمالها في العديد من المجالات و منها العلاج. في هذا السياق، نقوم بالتحقيق بالتأثيرات البيولوجية للغريس *Berberis vulgaris* ، و هو نبات يستخدم في العالم، و في الجزائر، و يتم استخدامه في منطقة تلمسان خاصة لعلاج داء السكري.

الفحص الكيميائي النباتي النوعي الذي أجري على لحاء جذر الغريس أظهرت وجود القلويدات ، العفص، الستيروول، التربينات الثلاثية و السكريات المختزلة بكميات كبيرة، كما كشفت وجود الكومارين، التربينويد، الصابونين و المواد المخاطية بكمية اقل. و يتبع الكشف عن هذه المجموعات الكيميائية استخلاص لحاء جذر الغريس مع مذيبات متزايدة الأقطاب واستخراج القلويدات الكلية. تم تحليل مستخلص القلويدات بطبقة رقيقة كروماتوغرافية، وكشف عن وجود ستة مركبات. كما تم التحليل الكمي للبوليفينول و الفلافونويد لمستخلص الهيدروميتانول، مما يدل على محتوى 48.10 ملغ معادل حمض الغاليك/غ من البوليفينول و 2.05 ملغ معادل الكاتشين/غ من الفلافونويد.

و من أجل دراسة النشاطات البيولوجية، تم اختبار المستخلصات الخامة و القلويدات على مجموع من السلالات المرجعية للبكتيريا و الخميرة. و ذلك باستخدام تقنية الانتشار على الأغار و تحديد تركيزات الحد الأدنى المثبطة. قدم المستخلص الهيدروميتانولي أفضل نشاط مضاد للبكتيريا بأقطار تثبيط 12.5 حتى 21 مم لبعض السلالات. و أظهرت مستخلصات الغريس و تحديدا القلويدات الكلية نشاط مضاد قوي على الخميرة بأقطار تثبيط 19 الى 29 مم.

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص الهيدروميتانولي و القلويدات الكلية للغريس بطريقتين : إرجاع الحديد و تثبيط الجذر الحر. أظهرت النتائج نشاط عالي للمستخلص الهيدروميتانولي مقارنة بالقلويدات الكلية، مع 1.40 ملغ/مل و نشاط جذري مضاد ب 89.3 % عند التركيز 4 ملغ/مل.

النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة توضح ثراء الغريس بالمواد الكيميائية التي قد تمثل مصدرا جديدا من الجزيئات البيولوجية النشطة المحتملة في العلاج.

الكلمات المفتاحية : *Berberis vulgaris* ، المستخلصات الخامة، القلويدات الكلية، النشاط المثبط للبكتيريا، النشاط المثبط للفطريات ، النشاط المضاد للأكسدة.

Introduction Générale

Les plantes médicinales ont été utilisées comme une source importante de médicaments pour des milliers d'années de l'histoire humaine, et même aujourd'hui, elles constituent la base des pratiques systématiques de médecine traditionnelle pendant plusieurs siècles dans le monde entier [Pan *et al.*, 2009].

Les plantes et les autres organismes peuvent être considérés comme des bibliothèques de petites molécules de métabolites secondaires des composés organiques avec une diversité structurale qui, autrement, ne pourraient pas être disponibles dans un laboratoire chimique de synthèse [Bindseil *et al.*, 2001; Koehn et Carter, 2005].

Le nombre total de produits naturels produits par les plantes a été estimé à plus de 500000. Une centaine de soixante-mille produits naturels ont été identifiés, d'une valeur de plus en plus de 10000 produits par an [Zhang et Demain, 2005].

L'échec des traitements pharmaceutiques conventionnels, surtout dans le cas des maladies chroniques, la forte incidence des effets indésirables qui leur sont associés, le prix élevé des médicaments et l'insuffisance des infrastructures sanitaires dans les pays en voie de développement font qu'une large tranche de la population mondiale dépend essentiellement de la médecine naturelle ou complémentaire pour se soigner [Eddouks *et al.*, 2007].

De plus, la recherche de produits naturels est nécessaire en raison de : remarquable diversité de structures et d'activités, l'utilité en tant que sondes biochimiques, les méthodes d'analyse originales et sensibles, des améliorations dans l'isolement, la purification et la caractérisation, et de nouvelles méthodes de production [Demain et Zhang, 2005].

L'étude de l'utilisation de ces plantes pour la thérapeutique des populations fait partie de l'ethnobotanique [Iwu et Jacqueline, 2002]. Aujourd'hui, la découverte de médicaments à partir des plantes est basée principalement sur l'isolement des molécules bioactives, et des groupes de scientifiques d'horizons différents, y compris la recherche botanique, la biochimie, la pharmacologie, la pharmacie, la pharmacognosie, la chimie médicinale, la chimie organique et la toxicologie sont importants pour entreprendre cette recherche [Kinghorn, 2001 ; Butler, 2004; Koehn et Carter, 2005; Jones *et al.*, 2006].

C'est ainsi que l'équipe de « Recherche d'activités biologiques de la flore locale » du laboratoire LAPSAB a engagé depuis plusieurs années une recherche de nouvelles molécules bioactives présentant des activités biologiques, à partir de plantes locales dont *Citrullus colocynthis*, *Punica granatum*, *Berberis vulgaris*... Parmi ces activités : l'activité

antidiabétique, étudiée chez des rats Wistar *in vitro* sur des cellules isolées et *in vivo* chez les rats normaux et rendus diabétiques par la streptozotocine [Hamza Chérif et Chenini, 2006 ; Benariba *et al*, 2009 ; Belkacem *et al*, 2011]. L'activité antioxydante *in vitro* [Benariba *et al*, 2012] et antimicrobienne *in vitro* sur des souches bactériennes et de levures [Azzi et Boumellah, 2002 ; Frioui, 2012].

Le travail entrepris dans ce mémoire s'inscrit dans le cadre de la valorisation de *Berberis vulgaris* de la famille des Berberidacées, une plante utilisée dans plusieurs régions du monde, dont la région de Tlemcen – Algérie, où *Berberis vulgaris*, nommé localement Ghriss, est connu dans cette région, pour ces propriétés antidiabétiques [Azzi *et al*, 2012]. Plusieurs recherches ont été menées sur ses activités biologiques et plus spécifiquement sur berberine, un alcaloïde isoquinoléinique, considéré comme molécule active dans plusieurs maladies dont les maladies infectieuses, le diabète sucré, et le cancer [Tan *et al*, 2006 ; Kosalec *et al*, 2009 ; Yin *et al*, 2012].

Le travail expérimental réalisé dans ce mémoire consiste à faire des extractions à partir des écorces de racines de *Berberis vulgaris* et une analyse qualitative et quantitative de différents composés chimiques susceptibles d'avoir une activité biologique.

Nos travaux ont porté sur l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits bruts et des alcaloïdes totaux des écorces de racines de *Berberis vulgaris*.

Synthèse Bibliographique

I. Plantes médicinales

1. Introduction

Les produits naturels issus des plantes, des microorganismes et des animaux ont eu un rôle très important tout au long des 200 dernières années dans le traitement et la prévention des maladies, et continuent à servir comme source importante dans la découverte de nouvelles molécules bioactives [Kinghorn et Balandrin, 1993 ; Paterson et Anderson, 2005]. Une proportion considérable des produits naturels utilisés comme drogues dérivent des plantes terrestres, offrant une ressource inestimable et encore incomplètement épuisé à cet effet [Osbourn et Lanzotti, 2009]. Les plantes médicinales ont été utilisées comme une source importante de médicaments pour des milliers d'années dans l'histoire humaine, et même aujourd'hui, ils constituent une base de la pratique de la médecine traditionnelle systématique dans plusieurs pays partout dans le monde.

La documentation d'abord enregistrée sur les plantes médicinales remonte à des tablettes d'argile écrites en caractères cunéiformes, et se retrouvent en Mésopotamie datant de 2600 avant notre ère, alors que la médecine égyptienne remonte à environ 2900 avant notre ère, avec le meilleur enregistrement égyptien pharmaceutique connu étant le Papyrus Ebers, datant de 1500 avant notre ère [Borchardt, 2002 ; Osbourn et Lanzotti, 2009]. La *Materia Medica* chinoise a été largement documentée au fil des siècles avec le premier enregistrement contenant 52 prescriptions, datant d'environ 1100 avant notre ère [Chang et But, 1986 ; Huang, 1999] bien que les enregistrements de *Pent'sao* sont réputés pour être encore plus tôt et le système de documentation indienne ayurvédique date à environ 1000 avant notre ère [Kapoor, 1990 ; Dev, 1999].

Les Grecs ont contribué de manière substantielle au développement rationnel de l'utilisation de médicaments à base de plantes. Galien, qui a pratiqué et enseigné la pharmacie et la médecine à Rome, a publié pas moins de 30 livres sur ces sujets et est bien connu pour ses prescriptions complexes et formules utilisées dans la préparation des drogues, contenant parfois des dizaines d'ingrédients "galéniques".

Pendant le Moyen Age (5^{ème} au 12^{ème} siècle), ce sont les Arabes qui étaient responsables de la préservation d'une grande partie de l'expertise gréco-romaine et de l'élargir pour y inclure l'utilisation de leurs propres ressources. Les Arabes ont été les premiers à établir les pharmacies privées au 8^{ème} siècle et le pharmacien persan, médecin, philosophe et poète,

Avicenne, a beaucoup contribué aux sciences de la pharmacie et de la médecine à travers des œuvres telles que Canon Medicinæ « Kitab Al Qanûn fi Al-Tibb » [Petersen et Amstutz, 2008].

2. Métabolites secondaires

Les composés organiques des plantes sont divisés en deux catégories : la première, représente les composés qui existent dans toute les cellules et jouent un rôle centrale dans le métabolisme et la reproduction des cellules incluant les acides nucléiques, les acides aminés, les oses, et les lipides et connues sous le nom de métabolites primaires. La deuxième catégorie, sont les métabolites secondaires, qui n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de la plante [Guignard, 1996 ; Hanson, 2003].

D'après leur biosynthèse, les métabolites secondaires peuvent être divisés en trois classes :

- Phénols et polyphénols ;
- terpénoïdes et stéroïdes ;
- alcaloïdes.

a. Phénols et polyphénols

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisé en une dizaine de classes chimiques, qui présentent tous un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles OH [Hennebelle *et al*, 2004].

Les polyphénols peuvent être divisés en différents groupes selon leur nombre de cycle phénol ainsi que des éléments de structure qui lient leurs anneaux les uns aux autres.

➤ **Acide phénolique**

Les acides phénoliques sont présents en abondance dans les aliments et divisés en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique.

Les acides hydroxycinnamiques sont plus fréquents que les acides hydroxybenzoïques et comprennent essentiellement l'acide p-coumarique, caféique, férulique et sinapique [Pandey et Rizvi, 2009].

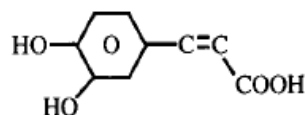


Figure 1 : Structure de l'acide caféique [Cowan, 1999]

➤ Flavonoïdes

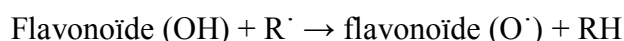
Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires [Erlund, 2004]. Ils constituent les pigments responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux [Havsteen, 2002]. Les flavonoïdes sont rencontrés dans les fruits et les légumes, le thé et le café. Les flavonoïdes sont retrouvés également dans plusieurs plantes médicinales, des remèdes utilisés en médecine traditionnelle dans le monde [Di Carlo *et al*, 1999].

Les flavonoïdes dérivent de l'enchaînement benzo- γ -pyrone, et c'est la structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation qui permet de distinguer les différentes classes de flavonoïdes [Macheix *et al*, 2005] :

- ✚ Flavones et flavonols ;
- ✚ flavonones, flavanols et dihydroflavanols.

Les flavonoïdes peuvent se présenter sous forme d'aglycones ou génines (entité dépourvue de reste osidique) ou d'hétérosides (portant un ou plusieurs résidus osidiques) [Ghedira, 2005].

Les flavonoïdes présentent plusieurs activités biologiques, dont l'activité la mieux décrite est leur activité antioxydante [Bors *et al*, 1997 ; Montoro *et al*, 2005] et leur capacité à piéger les radicaux libres : radicaux hydroxyles $\text{OH}\cdot$, anions superoxydes $\text{O}_2^{\cdot -}$ et radicaux peroxylipidiques, selon la réaction suivante :



Les flavonoïdes ont une action sur les vaisseaux sanguins sous forme d'activité vitaminique « P » [Beretz et Cazenave, 1991]. Cette activité intervient dans le maintien d'une perméabilité vasculaire normale [Youdim *et al*, 2002 ; Shih *et al*, 2004]. Ils exercent aussi une activité antidiabétique, comme la myricétine qui présente des effets hypoglycémiants et hypotryglycéridémiants chez les animaux diabétiques [Ong et Khoo, 1997 ; Ong et Khoo, 2000].

➤ Quinones

Les quinones sont des noyaux aromatiques avec deux substitutions cétones. Ces composés, étant colorés, sont responsables de la réaction de brunissement dans les fruits et végétaux coupés ou lésés. En plus de fournir une source de radicaux libres stables, les quinones sont connus pour se complexer de manière irréversible avec les nucléophiles des acides aminés dans les protéines. Par conséquent, les quinones inactivent les protéines et altèrent leur fonction [Arif *et al*, 2009].



Figure 2 : Structure d'une molécule de quinone [Cowan, 1999]

➤ Tanins

Utilisés depuis l'antiquité par l'homme pour le traitement des peaux d'animaux, les tanins ont une importance économique et écologique importante et sont responsables de l'astringence de nombreux fruits et légumes et des produits qui en sont dérivés (thé, vin ...). On peut considérer que les tanins sont des formes phénoliques condensées capables de se lier aux protéines en solution et de les précipiter [Macheix *et al*, 2005].

Ils sont divisés en deux groupes :

- ✓ **Tanins hydrolysables :** Ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique ou enzymatique. Ils libèrent alors une partie non phénolique (le plus souvent du glucose ou de l'acide quinique) et une partie phénolique qui peut être de l'acide gallique [Macheix *et al*, 2005]. Ils ont la propriété de coaguler les protéines du derme, d'où leur utilisation dans le tannage des peaux [Guignard, 1996].
- ✓ **Tanins condensés :** Ce sont des oligomères ou des polymères de flavane – 3 – ols dérivés de la (+) – catéchine ou de ses nombreux isomères. À la différence des tanins hydrolysables, ils ne s'hydrolysent pas sous l'action des acides dilués [Guignard, 1996 ; Macheix *et al*, 2005].

➤ **Coumarines**

Les coumarines sont des substances phénoliques synthétisées à partir de la fusion des noyaux benzènes et α -pyrone [O’Kennedy et Thomes, 1997]. Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et dans les solvants organiques ou les solvants chlorés alors que les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l’eau [Bruneton, 1999]. Ils ont des activités antithrombotiques, anti-inflammatoires et vasodilatatrices [Cowan, 1999].

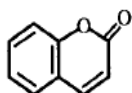


Figure 3 : Structure d’une molécule de coumarine [Cowan, 1999]

b. Terpénoïdes et stéroïdes

L'interface entre le métabolisme primaire et secondaire est moins facile à définir dans le cas des métabolites terpéniques (dérivés isoprénoïdes), parce que les unités terpéniques sont également présents dans de nombreux composés associés au métabolisme primaire, comme les hormones et les vitamines. Les précurseurs de tous les isoprénoïdes, le pyrophosphate d'isopentényle (IPP) et son isomère allylique pyrophosphate diméthylallyl (DMAPP), sont synthétisés dans les plantes supérieures [Modolo *et al.*, 2009].

Selon le nombre d'unités isopréniques qui les constituent, on distingue : les terpènes ou monoterpènes en C_{10} , les sesquiterpènes en C_{15} , les diterpènes en C_{20} , les triterpènes C_{30} , et les tétraterpènes C_{40} [Guignard, 1996 ; Cowan, 1999].

Les monoterpénoïdes sont des composants majeurs des arômes de plantes. Ces produits naturels volatiles, appelés huiles essentielles, constituent la base de l'industrie de la parfumerie et des arômes [Hanson, 2003].

Les stéroïdes sont dérivés de triterpènes tétracycliques et possèdent un squelette cyclopentaperydrophénanthrène. La disponibilité, la cristallinité et la conformation bien définie des stéroïdes signifient qu'ils sont devenus des substrats appropriés pour étudier l'influence des facteurs stériques sur les taux de réaction et les mécanismes.

Beaucoup de stérols se produisent sous forme de glycosides caractérisés par les saponines stéroïdiens. Ceux-ci sont responsables de la formation de mousse produite par de nombreuses plantes.

Un certain nombre de stéroïdes végétaux possèdent une activité pharmacologique intéressante. Il s'agit notamment des glycosides digitaliques (cardénolides) de la digitale *Digitalis lanata*. Ceux-ci sont utilisés dans le traitement de l'insuffisance cardiaque.

Les caroténoïdes sont des pigments rouges ou jaunes que l'on retrouve dans de nombreuses plantes. Ainsi, le β -carotène offre la coloration rouge de carottes et le lycopène est le pigment rouge foncé des tomates. Les caroténoïdes sont importants en tant que précurseurs de la vitamine A, qui joue un rôle central dans la vision. Ils sont de bons antioxydants et contribuent à des effets bénéfiques à de nombreux aliments [Hanson, 2003].

c. Alcaloïdes

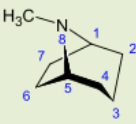
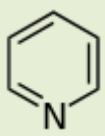
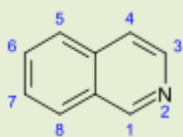
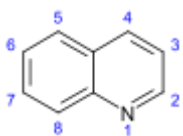
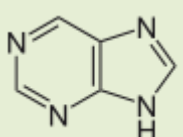
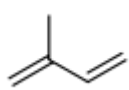
Parmi les premiers produits naturels isolés de plantes médicinales sont les alcaloïdes. Quand ils ont d'abord été obtenus à partir de la matière végétale durant les premières années du 19^{ème} siècle, il a été constaté qu'ils contiennent des bases azotées qui forment des sels avec les acides. Le nom d'alcaloïde date du pharmacien allemand Meissner. Ils sont chimiquement des matières organiques composés de carbone, d'hydrogène, d'azote et d'oxygène [Schauenberg et Paris, 2005].

En raison de leur puissante activité biologique, la plupart des alcaloïdes connus, environ 12.000, ont été exploités en tant que médicaments, des stimulants, des narcotiques, et des poisons. Contrairement à la plupart des autres types de métabolites secondaires, les nombreuses classes d'alcaloïdes ont des origines biosynthétiques uniques [Ziegler et Facchini, 2008].

On distingue trois types d'alcaloïdes :

- **Alcaloïdes vrais** : d'après certains auteurs, ils sont issus du seul règne végétal. Ils existent à l'état de sels et l'on peut ajouter qu'ils sont biosynthétiquement formés à partir d'un acide aminé.
- **Pseudo-alcaloïdes** : ils représentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas dérivés des acides aminés.
- **Proto-alcaloïdes** : se sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique ; ils ont une réaction basique et sont élaborés *in vivo* à partir d'acides aminés [Bruneton, 1999].

Tableau 1 : Principales classes d'alcaloïdes [Hanson, 2003 ; Springob et Kutchan, 2009]

Classe	Principaux groupes	Exemples
Dérivés du tropane 	Atropines Substitution en positions 3, 6 ou 7	Atropine, scopolamine, hyoscyamine
	Cocaines Substitution en positions 2 et 3	Cocaïne, ecgonine
Dérivés de la pyridine 	Dérivés simples de la pyridine	Trigonelline
	Dérivés polycycliques de pyridine non condensé	Nicotine
Dérivés isoquinoléiniques et alcaloïdes associés 	Dérivés de 1 - et 2-benzyl-izoquinolines	Papaverine
	Protoberberines	Berberine
	Morphines	Morphine, codéine
Dérivés de la quinoléine 	Quinines	Quinines, quinidines
Dérivés de purine 		Caféine, théobromine
Diterpènes 	Lycoctonine	Aconitine

Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques qui s'exercent dans les domaines les plus variés :

Au niveau du système nerveux central, qu'ils soient antidépresseurs (morphine, scopolamine) ou stimulants (strychnine, caféine) ;

Au niveau du système nerveux autonome : sympathomimétiques (éphédrine) ou sympatholytiques, parasymphatomimétiques, anticholinergiques et ganglioplégiques.

On notera aussi l'existence de curarisants, d'anesthésiques locaux, d'antifibrillants, d'antitumoraux, et d'antipaludiques [Bruneton, 1999].

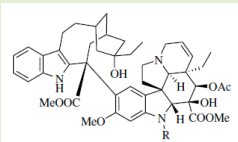
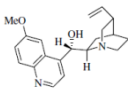
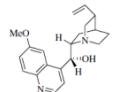
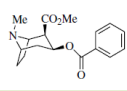
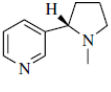
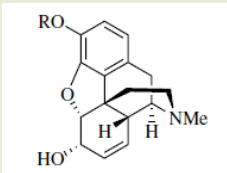
3. Rôles des plantes médicinales dans le développement des traitements

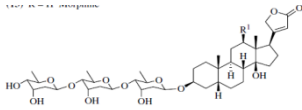
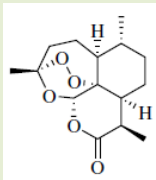
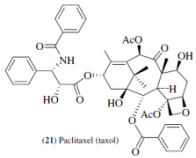
Les plantes médicinales représentent non seulement une source naturelle de nouvelles molécules bioactives ; mais aussi une source de produits naturels qui pourraient être utilisés comme agents médicamenteux.

La recherche des plantes médicinales se base sur quatre domaines : l'ethnobotanique, pour rechercher et répondre aux questions concernant la plante et son utilisation traditionnelle ; l'ethnopharmacie, pour explorer tous les aspects en rapport avec la préparation de médicaments à partir d'extraits bruts de plantes ; l'ethnopharmacologie, pour résoudre les questions concernant les phénomènes biologique, pharmacologique et thérapeutique ; et finalement, l'ethnomédecine, pour évaluer toute les données en respectant la maladie et les traitements [Kinghorn, 2001 ; Butler, 2004 ; Koehn et Carter, 2005 ; Jones *et al*, 2006 ; Rios, 2011].

Quelques exemples regroupés dans le tableau 2, représentent des composés de plantes qui jouent un rôle dans le traitement de plusieurs maladies.

Tableau 2 : Quelques exemples des principaux médicaments d'origine végétale de produits naturels [Bahar *et al*, 2008].

	Composé ou classe	Source botanique	Catégorie thérapeutique/utilisation
A. Alcaloïdes	<p>1. Alcaloïdes de Catharanthus (Vinca)</p>  <p>R = CH₃ Vinblastine R = CHO Vincristine</p>	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don (pervenue de Madagascar)	Anticancéreux
	<p>2. Alcaloïdes du quinquina</p> <p>Quinidine</p>  <p>Quinine</p> 	<i>Cinchona</i> spp. (Écorce de quinquina)	antiarythmique cardiaque antipaludique
	<p>3. Cocaine</p> 	<i>Erythroxylum coca</i> Lam. (feuilles de coca)	anesthésique local
	<p>4. Nicotine</p> 	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Sevrage tabagique (comme patch transdermique)
	<p>5. Alcaloïdes d'opium</p>  <p>R = Me Codéine R = H Morphine</p>	<i>Papaver somniferum</i> L. (pavot à opium)	antitussif analgésique narcotique

<p>B. glycosides stéroïdiens</p>	<p>glycosides digitaliques</p>  <p>R1=H, Digitoxine R1=OH Digoxine</p>	<p><i>Digitalis purpurea</i> L., <i>D. lanata</i> Ehrhart (digitales)</p>	<p>Glycosides cardiotoniques</p>
<p>C. Terpénoïdes</p>	 <p>Artemisinin</p>	<p><i>Artemisia annua</i> L.</p>	<p>Antipaludique</p>
	 <p>Paclitaxel</p> <p>(21) Paclitaxel (taxol)</p>	<p><i>Taxus brevifolia</i> Nutt. (occidentale ou if du Pacifique)</p>	<p>Anticancéreux</p>

II. Stress oxydatif

1. Introduction

L'oxygène, un élément essentiel à la vie, peut être également une source pour la destruction des tissus et / ou de nuire à leur capacité de fonctionner normalement [Kehrer *et al*, 1993].

Un radical libre est une espèce capable d'existence indépendante (d'où le terme libre) qui contient un ou plusieurs électrons non appariés [Halliwell et Gutteridge, 2006]. Un électron non apparié est un électron qui occupe une orbitale atomique ou moléculaire par elle-même. Le plus simple des radicaux libres est l'hydrogène atomique. Beaucoup de radicaux libres existent dans les systèmes vivants (certaines mauvaises, certaines bonnes et certaines les deux), bien que la plupart des molécules *in vivo* sont non radicalaires.

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et le radical hydroxyle $OH\cdot$, ou de l'azote tel le monoxyde d'azote $NO\cdot$ [Yoshikawa *et al*, 2000]. D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène ERO [Favier, 2003].

Tableau 3 : Principales espèces réactives oxygénées [Sies, 1993]

Espèces réactives oxygénées (ERO)	
Radicalaires	Non radicalaires
$\cdot OH$ Radical hydroxyle	H_2O_2 Peroxyde d'hydrogène
$RO\cdot$ Radical alkoxyl	ROOH Peroxyde organique
$ROO\cdot$ Radical peroxy	HOCl Acide hypochloreux
$O_2^{\cdot-}$ Anion superoxyde	1O_2 Oxygène singulet
$NO\cdot$ Radical oxynitrique	ONOO $^-$ Peroxynitrite

La plupart des radicaux libres proviennent de la chaîne respiratoire, du NADPH, et de l'activité de la xanthine oxydase, alors que les espèces réactives du monoxyde d'azote NO sont essentiellement produites par la NO-synthase. La production d'espèces réactives de l'oxygène et les principaux moyens de neutralisation sont schématisés dans la Fig. 4. La production de radicaux libres est donc largement physiologique : elle est déterminée, dirigée, et utile. Parmi les exemples les plus communs, on peut citer la production de superoxyde pendant la phagocytose, et la libération de NO par l'endothélium, qui constitue un des mécanismes de régulation du tonus vasculaire. Les radicaux libres interviennent aussi dans la signalisation cellulaire.

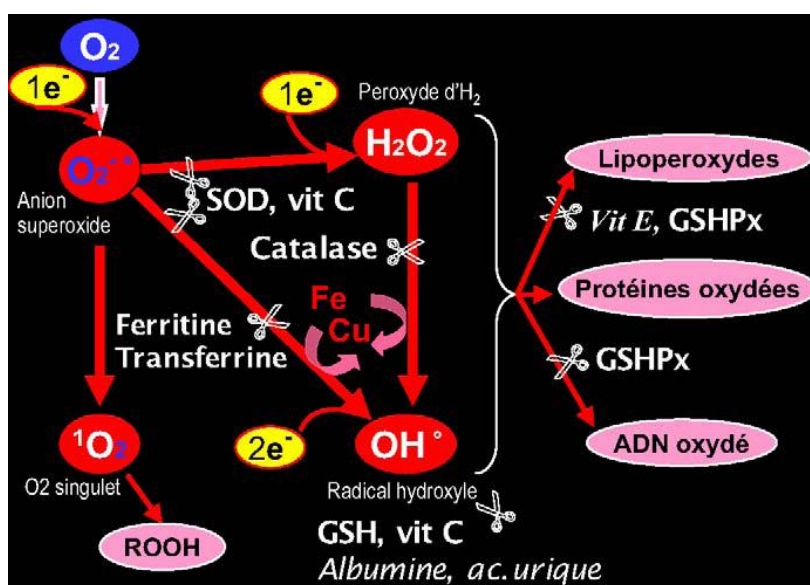


Figure 4 : Production et neutralisation des espèces réactives de l'oxygène [Berger, 2003]

Bien que physiologique, la production de radicaux libres peut être accidentelle et potentiellement délétère, comme par exemple la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale, ou ceux résultant de l'auto-oxydation des catécholamines. Cette production radicalaire est dommageable si elle est prolongée ou incontrôlée, dépassant les capacités de neutralisation de l'organisme. D'autres productions sont anormales, pathologiques, toujours dommageables, et sans objectif physiologique, comme par exemple celles résultant de la fumée de cigarettes, des polluants et de l'ozone [Berger, 2006].

2. Stress oxydatif

La perturbation de l'équilibre endogène entre radicaux libres et antioxydants de courte ou longue durée, provoque des effets délétères dus, soit à une défense antioxydante défailante, soit à un état pro-oxydatif accru, nommé stress oxydant [Biesalski *et al*, 1997].

Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : mutation, carcinogenèse, malformation des foetus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, et immunosuppression [Favier, 2003].

3. Antioxydants

Notre organisme est équipé de tout un système complexe de défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques, localisé dans les compartiments intra- et extracellulaire. Un antioxydant est une substance qui inhibe ou retarde significativement l'oxydation d'un substrat, alors qu'elle présente une concentration très faible dans le milieu où elle intervient [Halliwell et Gutteridge, 1990 ; Sies, 1996].

Les antioxydants agissent de plusieurs manières. Leur mécanisme d'action peut être direct ou indirect, en tant que partie de la structure d'enzymes et/ou cofacteurs d'enzymes antioxydantes, comme dans le cas des éléments traces. Les mécanismes les plus fréquents sont l'interruption de la spirale oxydative (vitamines C et E, NADPH, glutathion), la prévention des dégâts par la mise à disposition d'électrons (céruloplasmine, vitamine C, superoxyde dismutase, GSHPx), et la réparation des molécules d'ADN (Zn, acide folique, niacine) [Berger, 2006].

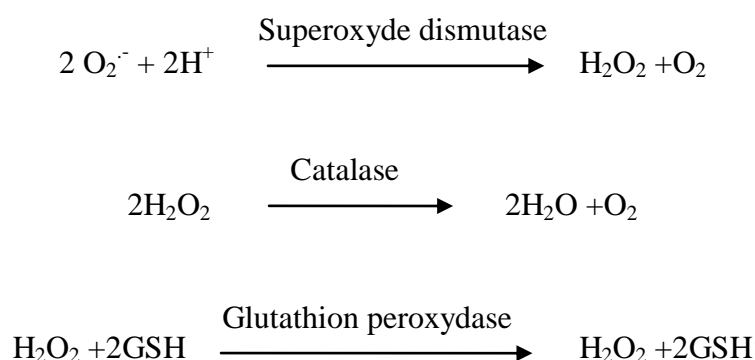
Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en deux catégories : enzymatiques et non enzymatiques.

Tableau 4 : Antioxydants enzymatique et non enzymatique [Flora, 2009]

Antioxydants	Exemples
Caroténoïdes	β -carotène, Lycopène, Lutéine
Enzymes	SOD, Catalase, GPx
Glutathion	Glutathion
Minéraux	Zinc, sélénium, cuivre
Les composés phénoliques	Quercétine, catéchine
Vitamines	α -tocophérol, acide ascorbique

a. Antioxydants enzymatiques

L'un des systèmes de défense antioxydants enzymatiques est constitué de trois enzymes : le superoxyde dismutase SOD, la glutathion peroxydase GSH-Px et la catalase. Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire [Lehucher-Michel et al, 2001].

**Figure 5** : Réactions enzymatiques de piégeage des espèces réactives oxygénées ERO

[Halliwell, 2006]

Il existe de nombreuses autres enzymes antioxydantes comme les peroxyredoxines, l'hème oxygénase, le glutathion transférase, les thiorédoxines réductases ou les thiorédoxines peroxydases. La plupart de ces enzymes, de même que les enzymes de réparation des

dommages oxydants, vont utiliser un donneur d'équivalent réducteur, le NADPH, qui constitue avec le glutathion les plaques tournantes de la défense antioxydante [Favier, 2003].

b. Antioxydants non enzymatiques

Ce groupe d'antioxydants est constitué de plusieurs composés capables de réagir directement ou indirectement avec les ERO. Le mécanisme indirect implique la chélation des métaux de transition ce qui empêche la production du radical hydroxyle, hautement toxique [Kohen et Nyska, 2002].

Certains composés antioxydants comme les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables. La vitamine piégeuse va devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par un autre système. Ainsi, la vitamine E est régénérée par la vitamine C qui est elle-même régénérée par des enzymes, les ascorbates réductases. Ce type d'antioxydant est appelé piégeur « scavenger » pour les Anglo-saxons. De très nombreux composés alimentaires peuvent aussi avoir ce comportement : polyphénols, alcaloïdes Il existe de plus des composés endogènes synthétisés par les cellules et jouant le même rôle ; le plus important est le glutathion réduit qui protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le NO• [Favier, 2003, Flora, 2009].

III. Antimicrobiens

1. Antibiotiques

Il y a deux sources majeures pour la recherche de nouveaux antibiotiques : les produits naturels et les molécules synthétiques. Les produits naturels ont été la majeure source pour la découverte de nombreux médicaments nouveaux, et qui pourraient être développés en tant qu'agents antibactériens [Newman *et al*, 2003].

Depuis la découverte de la pénicilline en 1929, d'autres agents antimicrobiens plus efficaces ont été découverts et mis au point par l'élucidation des cibles médicamenteuses et par une modification des molécules médicamenteuses [Kohanski *et al*, 2010].

Les antibiotiques naturels sont connus pour atteindre la plupart des grandes voies biologiques, mais la majorité d'entre eux transmettent leur effet antibactérien par inhibition de la paroi cellulaire bactérienne et la synthèse des protéines. Seule exception comprend la classe des rifamycines qui inhibent la synthèse de l'ARN [Singh, 2012].

Tableau 5 : Classes d'antibiotiques et leurs cibles [Kohanski *et al*, 2010]

Type de médicament	Médicament	Nature	Espèces cibles	Voies Cibles
Fluoroquinolones				
Inhibiteurs de la synthèse d'ADN	Acide Nalidixique, ciprofloxacine, levofloxacine et gemifloxacine	Synthétique	Les espèces aérobies Gram-positives et Gram-négatives, certains anaérobies à Gram négatif espèces (<i>C. perfringens</i>) et <i>M. tuberculosis</i>	Topoisomérase II (ADN gyrase), la topoisomérase IV
Rifamycines				
Inhibiteurs de la synthèse d'ARN	Rifamycines, rifampicine et rifapentine	Formes naturelles et semi-synthétiques des ansamycines (dérivée de <i>S. mediterranei</i>)	Des espèces Gram-positives et Gram-négatives, et <i>M. tuberculosis</i>	ADN polymérase ARN-dépendante
β-lactamines				
Inhibiteurs de synthèse des parois cellulaires	Pénicillines (pénicilline, l'ampicilline, l'oxacilline), céphalosporines (céfazoline, la céfoxitine ceftriaxone,	Les formes naturelles et semi-synthétiques de noyau carbonyle lactame contenant des molécules azétidinone (à partir de <i>P. notatum</i> , <i>C.</i>	Espèces Gram-positives aérobies et anaérobies et espèces Gram-négatives	Protéines liant la pénicilline

	céfépime) et carbapénèmes (imipénème)	<i>accremonium</i> et <i>S. cattleya</i>)		
Glycopeptides et glycolipoptides				
Inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire	Vancomycine; teicoplanine	Les formes naturelles et semi-synthétiques de sucre aminés liés aux chaînes peptidiques (pour les glycopeptides) ou porteurs de l'acide gras, sucres aminés liés à des chaînes peptidiques (pour glycolipoptides) provenant des actinobactéries	Espèces Gram-positives	Unités de peptidoglycane (dipeptide terminal D-Ala-D-Ala)
Aminoglycosides				
Inhibiteurs de la synthèse des protéines	Gentamicine, tobramycine, streptomycine et kanamycine	Les formes naturelles et semi-synthétiques de sucres aminés	Espèces aérobies Gram-positives et Gram-négatives, et <i>M. tuberculosis</i>	Sous-unité 30S du ribosome
Tetracyclines				
Inhibiteurs de la synthèse des protéines	Tétracycline et doxycycline	Les formes naturelles et semi-synthétiques de quatre cycles polycétides (à partir de <i>S. aureofaciens</i> et <i>S. rimosus</i>)	Espèces aérobies Gram-positives et Gram-négatives	Sous-unité 30S du ribosome
Macrolides				
Inhibiteurs de la synthèse des protéines	Érythromycine et azithromycine	Les formes naturelles et semi-synthétiques de 14 - et 16-chaînons lactones (à partir de <i>S. erythraea</i> et <i>S. ambofaciens</i>)	Espèces aérobies et anaérobies Gram-positives et Gram-négatives	Sous-unité 50S du ribosome
Phénicols				
Inhibiteurs de la synthèse des protéines	Chloramphénicol	Les formes naturelles et semi-synthétiques de l'acide dichloroacétique avec un noyau aromatique et une chaîne aminopropanediol (à partir de <i>S. venezuelae</i>)	Certaines espèces Gram-positives et Gram-négatives, y compris <i>B. fragilis</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>H. influenzae</i> et <i>S. pneumoniae</i>	Sous-unité 50S du ribosome

Avec l'émergence de la résistance bactérienne aux antibiotiques chimiotypes existants découverts dans l'«âge d'or» de la découverte des antibiotiques, il devient extrêmement difficile de découvrir et de développer de nouveaux antibiotiques ayant des profils pharmaceutiques meilleurs par modification chimique des molécules existants. Ces conditions exigent davantage d'investissements pour la découverte de nouveaux chimiotypes [Singh, 2012].

L'impact de la biologie moléculaire sur la découverte de médicaments a été révolutionnaire, et peut-être à lui seul contribué à la croissance de l'industrie pharmaceutique dans les années 1980 et 1990. La biologie moléculaire a révolutionné la capacité de l'identification des cibles de premier plan dans toutes les maladies, y compris des agents antibactériens.

Le processus a permis la découverte d'inhibiteurs des enzymes de synthèse *in vitro* d'un certain nombre de cibles, mais ces inhibiteurs ne pourraient pas être transformés en agents antibactériens, en raison d'un manque de pénétration dans la cellule, ce qui ne pourrait être évité par des modifications chimiques [Payne *et al*, 2007]. Les inhibiteurs de l'ARN-t synthétase [Payne *et al*, 2000], et les carbapénamases [Hammond *et al*, 1999] sont à quelques exceptions près.

Un autre procédé utilisé est la biotransformation, qui est une des méthodes très efficaces, capables de transformer un produit naturel en de nouveaux analogues de produits naturels quelle que soit la complexité structurelle. Les micro-organismes sont capables d'effectuer diverses réactions d'oxydation, qui incluent halogénations, acylations, alkylations, cyclisations, et autres.

L'oxydation par biotransformation de compactine à la pravastatine est l'un des exemples de ce procédé. La pravastatine a été développée comme un agent clinique pour le traitement de l'hypercholestérolémie [Singh, 2012].

2. Antifongiques

Au cours des dernières années, nous avons assisté à un changement dans l'épidémiologie de l'infection fongique invasive. Cela a coïncidé avec une augmentation de la survie d'un nombre de plus en plus important de patients immunodéprimés [Mc Neil *et al*, 2001 ; Pappas *et al*, 2003] et avec le développement de formes plus graves de l'immunosuppression.

Les espèces de *Candida* et *Aspergillus* demeurent la première cause des maladies infectieuses fongiques [Pfaller *et al*, 2006]. *Candida albicans* est impliqué dans environ 50% des patients atteints de candidose [Pappas *et al*, 2003 ; Wisplinghoff *et al*, 2004], mais les infections causées par d'autres espèces, telles que *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* et *Candida lusitaniae*, sont en hausse [Trick *et al*, 2002 ; Hajjeh *et al*, 2004].

En outre, d'autres champignons moins courants comme *Cryptococcus*, *Trichosporon capitatum*, et *Geotrichum* sont une source de préoccupation croissante due à l'augmentation du nombre de cas signalés et les options limitées disponibles pour la thérapie [Castón-Osorio *et al*, 2008].

Au cours des 2 dernières décennies, il y a eu une augmentation du nombre de médicaments antifongiques disponibles pour le traitement des infections fongique invasives (tableau 6). Ils se divisent en trois classes : les azolés, les polyènes et les échinocandines [Klepser, 2011].

Tableau 6 : Classes d'antifongiques et leurs cibles [Khan et Mokaddas, 2007 ; Klepser, 2011]

Classes	Azolés	Polyènes	Echinocandines
Médicaments	Fluconazoles Itraconazoles Voriconazoles Posaconazoles	Amphotéricine B Nystatine	Caspofungine Micafungine Anidulafungine
Voies cibles	Inhibition de l'enzyme 14 α -déméthylase impliqué dans la synthèse de l'ergostérol	Liaison avec l'ergostérol dans la membrane plasmique fongique aboutissant à une augmentation de la perméabilité et la mort cellulaire	Inhibition de 1,3- β -D-glucane synthase, enzyme responsable de la production de 1,3- β -D-glucane, élément essentiel de la paroi cellulaire fongique
Espèces cibles	Fongistatique vis-à-vis des levures et fongicides vis-à-vis des champignons	Fongicide vis-à-vis des levures et champignons	Fongistatique vis-à-vis des champignons et fongicide vis-à-vis de la plupart des levures

Les mycoses invasives sont associées à des taux élevés de mortalité et des coûts des soins de santé. Avec l'émergence des infections fongiques, il est essentiel de fournir des schémas thérapeutiques appropriés.

Les polyènes sont bien connus comme antifongiques à large spectre avec une longue histoire d'utilisation clinique. Leur représentant le plus utilisé en thérapeutique est l'amphotéricine B, présentant une activité antifongique vis-à-vis une grande variété de levures et de moisissures. L'amphotéricine B est associé aussi à une néphrotoxicité sévère induisant à une réduction de sa dose. Pour cela, les formulations lipidiques d'amphotéricine B ont été développées dans les années 1990, et possèdent un meilleur profil de sécurité: amphotéricine B en complexe lipidique, l'amphotéricine B liposomale, et l'amphotéricine B en dispersion colloïdale, de plus, ils sont mieux tolérés, ce qui permet d'augmenter les doses pour être administrés. Ainsi, les polyènes demeurent des agents idéals pour le traitement de nombreuses infections fongiques potentiellement mortelles chez les sujets immunodéprimés [Klepser, 2011].

IV. *Berberis vulgaris*

1. Classification

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Ranunculales

Famille : *Berberidacées*

Genre : *Berberis*

Nom binomial : *Berberis vulgaris*

Noms communs : Epine-vinette, Barberry, European Barberry, Berberis, Ghriss [Saeed Arayne *et al*, 2007 ; Azzi *et al*, 2012].

2. Description botanique

Berberis vulgaris appelé localement Ghriss, est un arbuste pouvant atteindre 2 à 3 mètre de haut. Les feuilles sont alternées et épineux. Les feuilles secondaires sont en fascicules à l'aisselle de ces épines et sont simples, ovales, se rétrécissant à la base en un pétiole court. La tige est ramifiée, lisse et rainurée. Les racines sont caduques et sont de couleur grise ou brune. La racine est généralement au 1/5 pouce d'épaisseur. L'écorce a un goût amer et une odeur légère. Les fleurs sont petites, jaune pâle à la stigmatisation large. Les pétales sont entiers, les étamines irritables, jaillissant violemment contre la stigmatisation quand on les touche. Les fleurs sont disposées en grappes pendantes. Le fruit de *Berberis* (fig. 6) a de longues baies de couleur écarlate [Drofler et Roselt, 1989]. Les baies sont oblongues, légèrement courbés, environ ½ pouces de long et comestible. Les baies deviennent rouges à la maturation. La floraison apparaît entre Mai et Juin, et la récolte des fruits se fait en Automne [Chevallier, 2001 ; Saeed Arayne *et al*, 2007 ; Schauenberg, 2008].



Figure 6 : *Berberis vulgaris* [Saeed Arayne *et al*, 2007]

3. Répartition géographique

La plante est répandue sur les terrains calcaires, et pentes rocailleuses, elle préfère des sols acides mais peut également croître dans les sols neutres et basiques (alcalines). Elle peut pousser dans des zones mi-ombres ou sans ombre, et nécessite un sol sec ou humide [Saeed Arayne *et al*, 2007 ; Schawenberg, 2008].

Elle est commune à la plupart des régions d'Europe Centrale et d'Europe du Sud et dans les régions du Nord-Est des États-Unis. Elle est généralement répartie sur la plus grande partie de l'Europe, l'Afrique du Nord et l'Asie tempérée [Chevallier, 2001 ; Saeed Arayne *et al*, 2007].

En Algérie, *Berberis* se trouve sur les hautes montagnes, au-dessus de 1500 m, à Djurdjura-Babors, Atlas de Blida, Aurès, montagnes du Hodna et Atlas saharien [Quezel et Santa, 1962].

4. Composition chimique

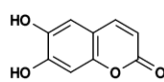
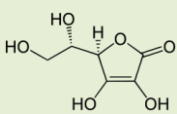
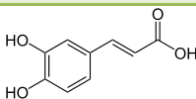
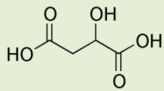
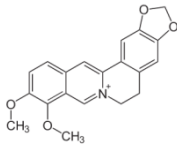
La tige, l'écorce de racine, et les fruits de *Berberis vulgaris* contiennent des alcaloïdes isoquinoléiniques (comme exemple, berberine), qui sont les principaux principes actifs de la plante [Gorval et Grishkovets, 1999]. Les racines sont riches en berberine (1.424%) par rapport aux autres parties de la plante [Kosalec *et al*, 2009].

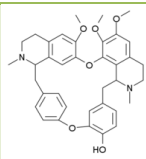
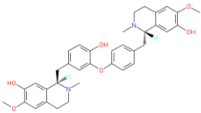
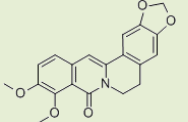
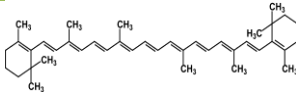
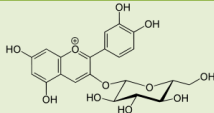
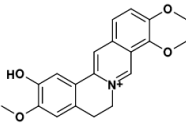
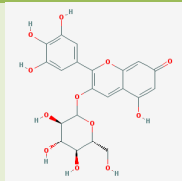
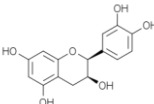
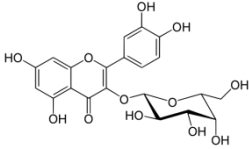
Berberine, est l'alcaloïde qui a reçu le plus de recherche et la plus large renommée comme le composant actif de *Berberis*. C'est un alcaloïde cristallin jaune et amer. Autres constituants sont l'oxyacanthine, et berbamine, un peu de tanin, de cire, de résine, de graisse, de l'albumine, de la gomme et de l'amidon (Tableau 7).

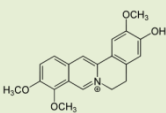
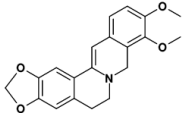
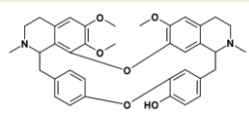
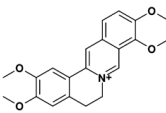
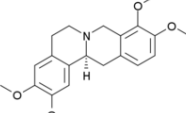
Les feuilles comprennent une fraction de polysaccharide faible mais variée, ce qui donne un α -glucane, un β -xylane, et deux acides galacturoniques contenant le glucoxylane. Les fleurs contiennent du sucre et une huile essentielle tandis que l'acide malique est présent dans les baies [Saeed Arayne *et al*, 2007].

D'autres molécules sont isolées des fruits, dont le lupéol, un terpénoïde, l'acide oléanolique, le stigmastérol, le stigmastérol glucoside [Saied et Begum, 2004], l'acide ascorbique, l'acide malique et les tanins [Hanachi et Golkho, 2009].

Tableau 7 : Composition chimique de *Berberis vulgaris*

Molécules chimiques	Type	Partie de la plante	Structure	Référence
Acanthine	Alcaloïde isoquinoléinique	Racine, écorce, écorce de la racine, écorce de la tige		Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008
Aesculetine	Coumarine	Fruits		Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008
Acide ascorbique	Vitamine	Fruits		Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008 ; Hanachi et Golkho, 2009
acide caféique	Phénylpropanoïde	Fruits		Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008
Acide malique		Fruits		Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008 ; Hanachi et Golkho, 2009
Berberine	Alcaloïde isoquinoléinique	Racine, écorce de la racine, écorce, écorce de la tige, fleurs,		Khamidov <i>et al</i> , 1995 ; Ivanovska et Philipov, 1996 ; Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008 ; Kosalec <i>et</i>

		tige, feuille, fruit		<i>al</i> , 2009
Berbamine	Alcaloïde isoquinoléinique	Ecorce, racine, écorce de la tige		Khamidov <i>et al</i> , 1995 ; Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008 ;
Berbamunine	Alcaloïde	Racines		Yusupov <i>et al</i> , 1990 ; Khamidov <i>et al</i> , 1995
Berlambine	Alcaloïde isoquinoléinique	Racines		Yusupov <i>et al</i> , 1990 ; Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008
B-carotène	Caroténoïde	Fruits		Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008
Chrysanthemine	Anthocyane	Fruits		Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008
Columbamine	Alcaloïde isoquinoléinique	Racine, écorce, écorce de la tige		Ivanovska et Philipov, 1996 ; Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008
Delphinidine-3-O-β-D-glucoside	Flavonoïde	Feuilles		Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008
Epicatéchine	Flavonoïde	Fruits		Mortzaeinezahad et Safavi, 2011
α-glucane	Glucide	Feuilles		Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008
Hyperoside	Flavonol	Feuilles, fruits		Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008
Isocorydine	Alcaloïde	Feuilles		Khamidov <i>et al</i> , 1995
Isotetrandrine (bisbenzylisoquinoline)	Alcaloïde	Racines		Ivanovska et Philipov, 1996

Jatrorrhizine	Alcaloïde isoquinoléinique	Racines		Khamidov <i>et al</i> , 1995 ; Ivanovska et Philipov, 1996 ; Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008
Lambertine	Alcaloïde isoquinoléinique	Racines		Yusupov <i>et al</i> , 1990
Oxyacanthine	Alcaloïde	Racines, feuilles		Yusupov <i>et al</i> , 1990 ; Khamidov <i>et al</i> , 1995 ; Ivanovska et Philipov, 1996
Palmatine	Alcaloïde isoquinoléinique	Racines, écorce, écorce de racine, fruits		Ivanovska et Philipov, 1996 ; Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008
Pectine	Glucide	Fruits		Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008
Tetrahydropalmatine	Alcaloïde	Racines		Ivanovska et Philipov, 1996

5. Activités biologiques

Plusieurs chercheurs ont démontré différents effets pharmacologiques et thérapeutiques de *Berberis vulgaris* et de ses alcaloïdes isoquinoléiniques (en particulier berberine). Les études menées sur la composition chimique de la plante montrent que les constituants les plus importants de cette plante sont les alcaloïdes isoquinoléiniques tels que berberine, berbamine et palmatine, dont, berberine représente un des alcaloïdes naturels les plus étudiés pour ses effets vis-à-vis de plusieurs maladies telque le cancer et le diabète sucré [Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008 ; Wang *et al*, 2012 ; Yin *et al*, 2012].

Tableau 8 : Quelques activités biologiques de *Berberis vulgaris*

Activités biologiques	Partie de la plante	Préparation	Références
Antiinflammatoire	Racines	Alcaloïdes	Ivanovska et Philipov, 1996

Immunomodulatrice	Racine séchée	Alcaloïdes	Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008
Antihistaminique	Fruits	Extrait méthanolique	Khosrokhavar <i>et al</i> , 2010
Activité antagoniste narcotique Sédatif	racine séchée Fruits		Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008
Activité anticholinergique	Fruits	Extrait méthanolique	Khosrokhavar <i>et al</i> , 2010
activité hypotensive	Fruits	Extrait aqueux	Fatehi <i>et al</i> , 2005
Activité antidiabétique	Ecorce de racines	Extrait aqueux Saponosides	Meliani <i>et al</i> , 2011
Activité antimicrobienne	Racines, Feuilles, brindilles	Extrait éthanolique 96%	Kosalec <i>et al</i> , 2009
Antioxydante	Fruits	Extrait hydroéthanolique	Motalleb <i>et al</i> , 2005 ; Hanachi <i>et al</i> , 2006
		Extrait aqueux, éthanolique et méthanolique	Hanachi et Golkho, 2009
	Feuilles, brindilles et racines	Extrait éthanolique 96%	Zovko Končić <i>et al</i> , 2010
Cytotoxique	Fruits	Extrait hydroéthanolique	Hanachi <i>et al</i> , 2006

Les racines de *Berberis vulgaris* ont été utilisées en médecine traditionnelle européenne pour traiter les troubles rhumatismaux et les inflammations. Ceci est confirmé par l'étude d'Ivanovska et Philipov en 1996. Les chercheurs ont testés l'extrait éthanolique à 95 % et trois extraits d'alcaloïdes purifiés à partir de l'extrait éthanolique : Bv1, Bv2 et Bv3. L'extrait éthanolique a montré la meilleure activité dans un modèle d'inflammation chronique chez des souris mâles. En plus, les fractions Bv2, Bv3 et berberine ont supprimé la réaction de type hypersensibilité retardée.

Plusieurs chercheurs se sont intéressés à l'activité antioxydante des fruits [Motalleb *et al*, 2005 ; Hanachi *et al*, 2006 ; Hanachi et Golkho, 2009] et des racines, feuilles et brindilles de *Berberis vulgaris* [Zovko Končić *et al*, 2010].

Motalleb *et al* en 2005, ont utilisé deux techniques : la décoloration de β -carotène et le test DPPH pour déterminer le pouvoir antioxydant des extraits aqueux, éthanolique et méthanolique 80 % des fruits. L'extrait aqueux a montré la meilleure activité dans le piégeage des radicaux libres avec 82.52 % et un EC₅₀ (concentrations effectives pour obtenir 50% de

réduction des radicaux libres) de 0.64 mg/ml, et dans le test de décoloration de β -carotène, l'extrait méthanolique 80 % a montré une activité significative de 60.15 %. Hanachi et Golkho en 2009, ont obtenu une bonne activité antioxydante avec l'extrait éthanolique 27.26 %, suivi de l'extrait méthanolique 16.80 %, et l'extrait aqueux 6.53 % dans la technique TBA utilisant l'acide thiobarbiturique.

L'étude de Hanachi *et al*, 2006 a montré une activité antioxydante de 59.91 % de l'extrait hydrométhanolique des fruits de *Berberis vulgaris* avec la technique de décoloration de β -carotène. Les auteurs ont obtenus un IC_{50} de 106 μ g/ml au test de DPPH.

Zovko Končić *et al* en 2010, ont étudiés l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique 96 % des parties racines, brindilles et feuilles de *Berberis vulgaris*. Les extraits des feuilles ont montrés la meilleure activité antioxydante avec un IC_{50} de 65.09 μ g/ml et l'activité antioxydante totale dans le dosage d'acide B-carotène-linoléique de 89.26 %, suivi des extraits de brindilles et des racines.

Autre activité étudié de *Berberis vulgaris* est son effet antimicrobien. Kosalec *et al*, 2009 ont montré une activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique 96 % des racines vis-à-vis de *Bacillus subtilis* NCTC 8236, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherchia coli* ATCC 10535, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Candida albicans* ATCC 10231 avec des CMI \leq 87.5 mg/ml.

Berberis vulgaris présente aussi une activité antidiabétique remarquable [Hajzadeh *et al*, 2011 ; Meliani *et al*, 2011]. Les extraits aqueux et saponosides des écorces de racines ont montré une amélioration de la glycémie ainsi que les paramètres lipidiques chez des rats Wistar rendus diabétiques par la streptozotocine [Meliani, 2003].

6. Utilisation traditionnelle

Dans l'Egypte ancienne, les baies de *Berberis vulgaris*, macérées avec des graines de fenouil *Foeniculum vulgare*, faisaient baisser la fièvre. Dans l'est des Etats-Unis, les Catawbas utilisent la plante pour soigner les ulcères d'estomac [Chevallier, 2001].

Toutes les parties de la plante peuvent être utilisés, et l'écorce de la racine jaune est la source la plus concentrée en principes actifs. Des extraits obtenus à partir des racines ont été utilisés dans la médecine traditionnelle orientale et bulgare pour traiter les rhumatismes et autres affections inflammatoires chroniques.

C'est une excellente herbe utilisée contre la soif, la nausée, les névralgies périodiques, la fièvre, les vomissements de la grossesse, les ulcères gastriques et duodénaux. Elle est prescrite pour les calculs rénaux, la congestion abdominale et pelvienne et agit comme un stimulant gastro-intestinal. *Berberis* a aussi tendance à dilater les vaisseaux sanguins, ce qui diminue la pression sanguine.

Un thé fait à partir de l'écorce de *Berberis* est prise pendant les mois de printemps comme un purificateur de sang. Une forte décoction est utilisée comme une application sur les plaies [Saeed Arayne *et al*, 2007].

En Algérie, la décoction et l'infusion des racines et feuilles de *Berberis vulgaris* sont utilisées pour traiter le diabète sucré [Meliani *et al*, 2011 ; Azzi *et al*, 2012].

7. Travaux antérieurs sur *Berberis vulgaris*

D'après les études ethnobotaniques réalisées par Allali *et al* et Azzi *et al*, *Berberis vulgaris*, appelé communément Ghriss est utilisé par la population locale de Tlemcen, pour traiter le diabète sucré [Allali *et al*, 2008 ; Azzi *et al*, 2012].

À l'université Abou Bekr Belkaïd – Tlemcen, trois études ont été réalisées sur cette plante, afin de vérifier ses effets antidiabétiques.

Meliani en 2003 a testé l'effet des extraits aqueux et de saponosides sur la glycémie, la cholestérolémie, la triglycéridémie et le poids corporel, chez des rats Wistar normaux et diabétiques. Les résultats montrent une diminution très significative de la glycémie chez les rats diabétiques traités par injection intrapéritonéale des extraits aqueux et saponosides avec des pourcentages de 78.79 % et 76.03 % respectivement, après trois semaines du traitement, et une amélioration des paramètres lipidiques [Meliani, 2003 ; Meliani *et al*, 2011].

Merah et Boukenadel en 2007, ont recherché les effets antidiabétiques des alcaloïdes totaux des écorces de racine de *Berberis vulgaris*, un extrait riche en berberine d'après la littérature [Kosalec *et al*, 2009]. L'activité de l'extrait a été testée chez des rats normaux et diabétiques, soumis à l'hyperglycémie provoquée par voie orale. Les alcaloïdes injectés par voie intrapéritonéale à la dose de 60 mg/kg, ont montrés une activité antihyperglycémiant, où la glycémie a diminué de 71.12 % 48 h après l'administration de l'extrait.

Dans une autre étude, l'extrait des saponosides a été testé *in vitro*, sur des cellules d'hépatocytes isolées du foie des rats Wistar. Les résultats montrent une amélioration de la

captation du glucose chez les hépatocytes à la concentration de 2 g/l de glucose avec les concentrations de 0.2 et 0.3 mg/ml des saponosides [Hamza Chérif et Chenini, 2006].

8. Berberine

Berberine est un alcaloïde quaternaire isoquinoléinique (ou un dérivé 5,6 dihydrodibenzo [a, g] quinolizinium) isolé à partir de nombreux types de plantes médicinales telles que *Hydrastis canadensis*, *Berberis aristata*, *Coptis chinensis*, *Coptis rhizome*, *Coptis japonica*, *Phellodendron amurense*, *Phellodendron chinense* Schneid, *Berberis vulgaris* et *Berberis croatica* Horvat [Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008 ; Kosalec *et al*, 2009].

Ce constituant phytochimique peut être trouvé dans la racine, l'écorce de la tige et les feuilles [Kosalec *et al*, 2009 ; Vuddanda *et al*, 2010].

Les propriétés pharmacologiques diverses présentées par la berberine indiquent que l'alcaloïde a un potentiel certain en tant que médicament dans un large éventail d'applications cliniques. À cet égard, la structure de la berberine (Fig. 7) représente un squelette d'une importance biologique et un composé naturel attrayant pour l'introduction de diverses modifications chimiques dans des positions appropriées, à la recherche plus sélective des indications médicales [Tillhon *et al*, 2012].

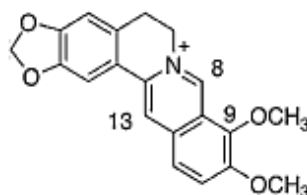


Figure 7 : Structure de berberine [Tillhon *et al*, 2012]

Berberine affiche un large éventail d'effets pharmacologiques, en étant efficace contre la gastro-entérite, les douleurs abdominales et la diarrhée, et ayant des propriétés antimicrobiennes, anti-diabétique et anti-inflammatoire [Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008 ; Kulkarni et Dhir, 2010 ; Vuddanda *et al*, 2010].

Berberine exerce des effets antimicrobiens en étant un substrat NorA capable de s'accumuler dans les cellules bactériennes et de se lier à la fois à l'ADN simple et double brin, ce qui conduit à la mort des bactéries par lésions de l'ADN [Boberek *et al*, 2010]. Il a une faible activité contre les bactéries Gram-négatives [Boberek *et al*, 2010], et une plus forte activité contre les bactéries Gram-positives, y compris *Mycobacterium tuberculosis* et le

SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline), par l'inhibition de la pompe MDR NorA [Samosorn *et al*, 2009 ; Boberek *et al*, 2010]. Il présente également une activité antifongique sur *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida*, et *Cryptococcus* [Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008 ; Vuddanda *et al*, 2010]. Berberine possède aussi une activité anti-inflammatoire en inhibant la production des facteurs de nécrose tumorale- α (TNF- α), l'interleukine-6 (IL-6) et des protéines monocytes chimio-attractif 1 (MCP-1) [Remppis *et al*, 2010].

Un effet bénéfique de la berberine dans le traitement du diabète de type II ont été rapporté [Yin *et al*, 2008 ; Hui *et al*, 2009]. Comme largement décrit chez les rats diabétiques expérimentalement, cet effet s'est avéré être médié par l'amélioration de l'homéostasie du glucose, l'expression accrue à l'insuline, la régénération des cellules bêta du pancréas et une diminution de la peroxydation lipidique [Chen *et al*, 2011 ; Xia *et al*, 2011]. Des résultats prometteurs ont été obtenus après l'administration de berberine pour les patients atteints du syndrome métabolique, où la sensibilité à l'insuline a été améliorée, avec pour conséquence des effets bénéfiques sur la maladie [Yin *et al*, 2008 ; Yang *et al*, 2012].

Berberine a également montré des effets anti-tumoraux et inhibiteurs sur l'hépatome [Tan *et al*, 2006], le cancer de l'œsophage [Iizuka *et al*, 2000], le cancer du côlon [Wu *et al*, 2012], le cancer du sein [Kim *et al*, 2008] et le cancer de la prostate [Meeran *et al*, 2008] par blocage du cycle cellulaire, l'inhibition de la synthèse d'ADN, l'activation des caspases et l'induction de l'apoptose. Il a également été démontré que berberine agit comme un médicament anti-métastatique dans le cancer du poumon chez l'homme par l'intermédiaire de la diminution de la production des urokinases activateur de plasminogène (urokinase-plasminogen activator) et la matrice métalloprotéinase-2 [Peng *et al*, 2006].

Berberine a été également utilisé en combinaison avec d'autres médicaments ou des traitements par radiation. Les traitements combinés avec des agents anticancéreux ou récepteurs d'oestrogènes antagonistes semblent être plus efficaces que les thérapies simples, par exemple, le trioxyde d'arsenic (As₂O₃) et le cisplatine, avec l'ajout de berberine, présentait un effet cytotoxique supérieur rendant les cellules HeLa, SNU-5, le gliome humain et les cellules de neuroblastome plus sensibles par rapport à la monothérapie [Lin *et al*, 2008 ; Youn *et al*, 2008].

Berberine a un potentiel certain en tant que médicament dans un large éventail d'applications cliniques déjà définis. Un nombre croissant d'études appuient la notion que berberine pourrait être un agent prometteur en thérapeutique. Les travaux futurs permettant l'élucidation des mécanismes d'action de berberine aideraient à élaborer des stratégies efficaces avec une utilisation possible en clinique.

Matériels et Méthodes

Cette étude expérimentale est réalisée au sein du laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-Chimie, Synthèse et Activités Biologiques, et le laboratoire Microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement. Elle comporte trois parties :

Partie I : Extraction du matériel végétal à partir des écorces de racines de *Berberis vulgaris*, analyse phytochimique qualitative et dosages des polyphénols totaux et des flavonoïdes ;

partie II : Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits bruts et des alcaloïdes totaux de *Berberis vulgaris* vis-à-vis de souches bactériennes et de levures de référence;

partie III : Evaluation de l'activité antioxydante des extraits hydrométhanolique et alcaloïdes totaux.

I. Etude phytochimique

1. Matériel végétal

Berberis vulgaris (Berberidacée), a été obtenu auprès des herboristes de la région de Maghnia – Tlemcen en Mars 2012.

La partie utilisée dans cette étude est l'écorce des racines du Ghriss qui sont maintenues à l'abri de la lumière et à température ambiante.



Figure 8 : Ecorce des racines de *Berberis vulgaris*

2. Extraction

Les écorces de racines sont broyées finement le jour même de l'extraction. La matière végétale 20 g a été mise en contact avec 200 ml du solvant. Les solvants utilisés sont : acétate d'éthyle, butanol-1, eau/méthanol (30 :70) et eau.

Deux types d'extraction ont été réalisés : l'extraction sous reflux sous agitation pendant 3 h et l'extraction par macération sous agitation pendant 24 h, et ceci dans le but d'observer l'effet de la température sur les principes actifs de la plante.

Les extraits obtenus sont filtrés sur papier filtre, et les différents filtrats sont concentrés à sec par évaporation rotative dans un rotavapeur – Heidolph. Les extraits aqueux sont évaporés dans une étuve à 35 °C. Les résidus obtenus sont conservés à 4°C.

3. Extraction des alcaloïdes totaux

L'extraction des alcaloïdes totaux a été faite selon le protocole de Makkar *et al*, 2007 avec quelques modifications.

40 g de la matière végétale est extraite par 400 ml d'acide acétique à 10 % dans le méthanol. L'extrait est macéré pendant 72 h avec agitation et à l'abri de la lumière. Après filtration, l'extrait est concentré au rotavapeur à $\frac{1}{4}$ de son volume initial, puis précipité par l'addition d'hydroxyde d'ammonium concentré.

Les deux phases obtenues sont extraites par le chloroforme jusqu'à leur épuisement total, et la phase organique est évaporée à sec à 40 °C. Le résidu obtenu des alcaloïdes totaux est conservé au réfrigérateur à +4 °C.

4. Tests phytochimiques

L'étude phytochimique qualitative permet de détecter différentes familles chimiques présentes dans la plante par des réactions de coloration et de précipitation et des observations sous lumière ultra-violette.

L'examen phytochimique est réalisé sur trois extraits : aqueux, méthanolique et étherique, obtenus par extraction de 10 g de la poudre des écorces de racine de *Berberis vulgaris* par 100 ml du solvant sous reflux pendant 1h.

a. Alcaloïdes

10 ml de l'extrait est évaporé à sec. Le résidu obtenu est repris dans 1.5 ml d'acide chlorhydrique 2 % sous agitation au bain marie à chaud. Après refroidissement et filtration. Le filtrat est divisé en 2 volumes égaux : le tube 1 est traité par le réactif de Mayer et le tube 2 est traité par quelques gouttes du réactif de Wagner. La formation d'un précipité blanc et marron respectivement indique la présence des alcaloïdes [Majob, 2003].

b. Substances polyphénoliques

➤ **Flavonoïdes : Réaction à la cyanidine**

1 ml de l'infusion obtenue est ajouté à 1 ml d'alcool chlorhydrique et 1 ml d'alcool iso-amylque puis quelques copeaux de magnésium [N'Guessan *et al*, 2009].

Coloration sur la phase surnageante :

Rose orangé : flavones ;

rose violacé : flavonones ;

rouge : flavonols, flavanonols.

➤ **Anthocyanines (Leucoanthocyanes)**

À 1 ml d'infusion est ajouté 1 ml d'alcool chlorhydrique et 1 ml d'alcool iso-amylque. Le mélange est chauffé pendant 15 min.

Coloration :

Rouge-cerise violacé : leucoanthocyanes ;

brun-rouge : catéchols.

➤ **Tanins**

À 1 ml de l'infusion est ajouté 200 µl de FeCl₃ 1 %. Leur présence est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu-noir [Karumi *et al*, 2004].

c. Coumarines

5 ml de l'extrait est évaporé à sec. Le résidu est dissout dans l'eau chaude 2 ml. Le mélange est partagé dans deux tubes. On ajoute à un des tubes 0.5 ml NH₄OH 25 %, ensuite,

une goutte de chaque tubes est prélevée puis déposée sur un papier filtre et observation sous U.V. à 366 nm [Bruneton, 1999].

Une fluorescence intense est observée pour le tube contenant le NH_4OH .

d. Anthraquinones

À 10 ml de l'extrait est ajouté 5 ml de NH_4OH 10 %, après agitation, leur présence est indiquée par une coloration violette dans la phase ammoniacale [Oloyede, 2005].

e. Stéroïdes et triterpènes : Lieberman – Burchardt

5 ml de l'extrait est évaporé. Le résidu est dissout dans 1 ml d'anhydride acétique et 0.5 ml d'acide sulfurique concentré.

L'apparition à l'interphase d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert indique leurs présences [Edeoga *et al*, 2005].

f. Terpénoïdes : Test de Slakowski

5 ml de l'extrait est ajouté à 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré.

La formation d'un anneau marron-rouge à l'interphase indique la présence des terpénoïdes [Khan *et al*, 2011].

g. Saponosides

10 ml de l'extrait est agité pendant 15 secondes puis laissé au repos pendant 15 min.

Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides [N'Guessan *et al*, 2009].

h. Composés réducteurs

1 ml de la solution est chauffé dans un bain marie, puis 200 μl de réactif de Fehling est ajouté au résidu. Un test positif est obtenu par la présence d'un précipité rouge brique [Cai *et al*, 2011].

i. Mucilages

1 ml de l'extrait est ajouté à 5 ml d'éthanol absolu. L'apparition d'un précipité floconneux indique la présence des mucilages.

j. Glycosides cardiaques : Test Keller- Killani

5 ml de l'extrait est mélangé à 2 ml d'acide acétique glacial contenant une goutte de FeCl_3 , puis, l'addition de 1 ml d'acide chlorhydrique concentré [Khan *et al*, 2011].

La formation d'un anneau marron, violet ou vert à l'interphase indique leur présence.

5. Dosage des polyphénols totaux

Le réactif utilisé est le réactif de Folin-Ciocalteu, c'est un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$).

Les composés phénoliques totaux sont quantifiés de la manière suivante : 0.1 ml de l'extrait hydrométhanolique sous reflux ou acide gallique est mélangé avec 2 ml de la solution de carbonate de sodium à 2%. Après agitation et incubation pendant 5 minutes, 100 μl du réactif Folin-Ciocalteu 1 N est ajouté. Le mélange obtenu est incubé à la température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 minutes.

L'absorbance est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 700 nm contre une solution de méthanol utilisé comme blanc [Vermerius et Nicholson, 2006].

Une courbe étalon est réalisé en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à différentes concentrations.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de la matière végétale sèche mg GAE / g.

6. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est réalisé par colorimétrie selon le protocole de Zhishen *et al*, 1999.

500 μl de l'extrait hydrométhanolique sous reflux ou de catéchine est mélangé avec 2 ml d'eau distillée, puis 150 μl d'une solution de nitrite de sodium NaNO_2 15 % est ajouté.

Après 6 minutes d'incubation à température ambiante, 150 μl de chlorure d'aluminium AlCl_3 10 % est ajouté. Et, à 6 minutes, 2 ml d'hydroxyde de sodium 4 % est ajouté. Le volume total est complété à 5 ml d'eau distillée.

Après agitation et incubation pendant 15 minutes, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 510 nm contre un blanc.

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme de la matière végétale sèche mg CEQ / g.

7. Chromatographie sur couches minces CCM

L'analyse sur couches minces est réalisée sur une plaque en verre de gel de silice (5×10 cm).

Le système de solvant utilisé pour les alcaloïdes totaux est : chloroforme/méthanol (9/1).

L'échantillon des alcaloïdes totaux 15 mg est préparé dans 0.5 ml de chloroforme puis déposé en petit spot sur la plaque.

L'observation du chromatogramme est effectuée en lumière visible et sous U.V. à 366 nm.

Ensuite, pour chaque constituant, le rapport frontal est calculé selon la formule suivante :

Rapport frontal $RF = \text{Distance parcourue par le constituant} / \text{Distance parcourue par l'éluant}$.

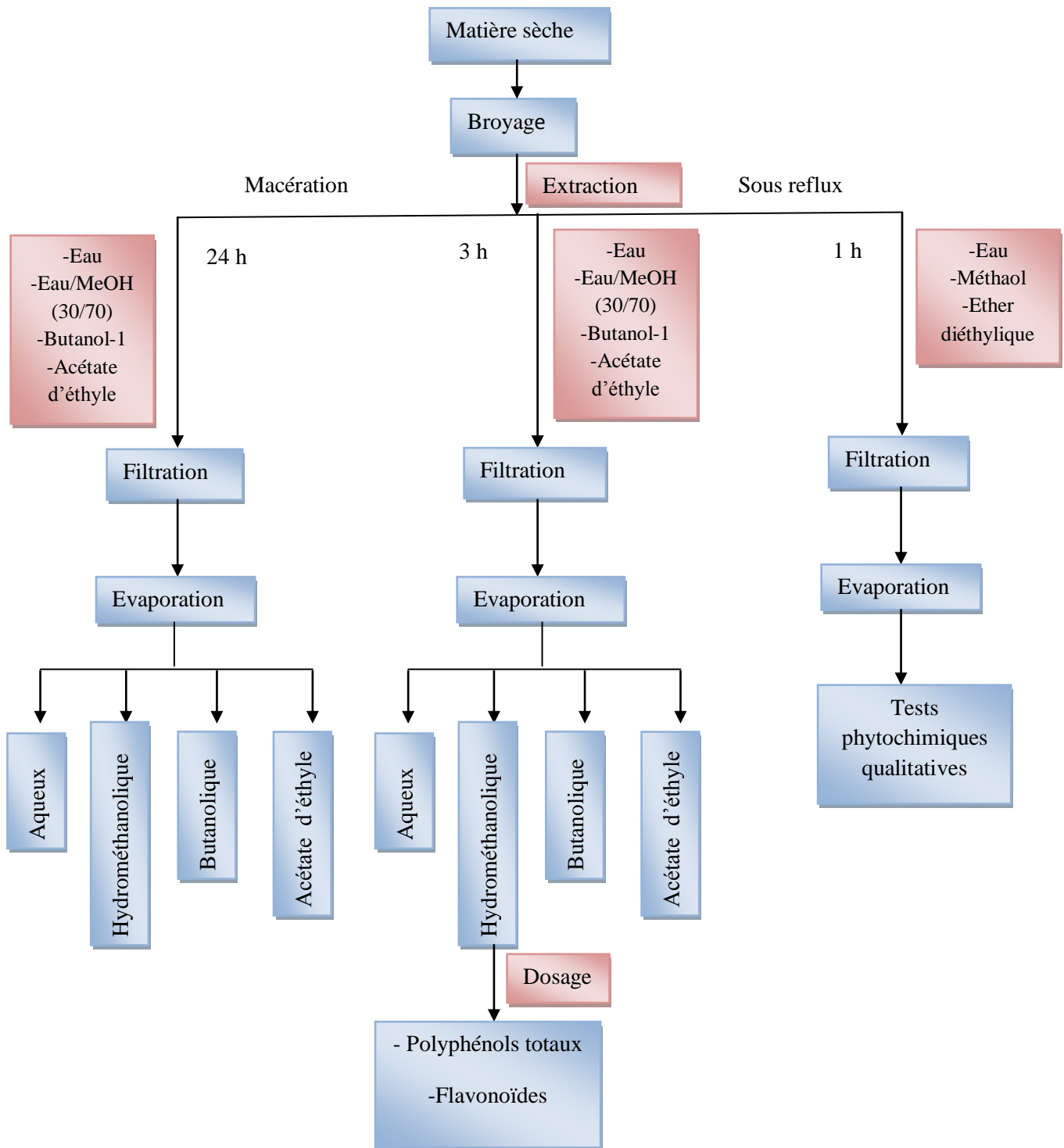


Figure 9 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental

II. Activité biologique

La richesse de *Berberis vulgaris* en différents métabolites secondaires peut représenter une source inestimable pour la recherche de nouvelles molécules bioactives. Pour cela, nous nous sommes intéressés à évaluer son activité biologique :

- Activité antibactérienne et antifongique des extraits bruts et des alcaloïdes totaux ;
- activité antioxydante de l'extrait hydrométhanolique sous reflux et des alcaloïdes totaux.

1. Activité antibactérienne

a. Souches utilisées

Les souches bactériennes testées dans notre étude ont été fournies par le laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-Chimie, Synthèse et Activité Biologique :

Tableau 9 : Souches utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne

Bactéries à Gram Positif	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876
Bactéries à Gram Négatif	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25912
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603
	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606
	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	

L'activité antibactérienne de *Berberis vulgaris* a été évaluée par deux techniques :

- 📄 Technique de diffusion sur gélose (méthode de disques) ;
- 📄 technique de microdilution en milieu liquide (concentration minimale inhibitrice ou CMI).

b. Technique de diffusion sur gélose

La méthode de disques permet de déterminer la susceptibilité des bactéries aux agents antibactériens. Cette technique est réalisée selon les recommandations de Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI M02-A10 [CLSI, 2009].

L'inoculum est préparé à partir d'une culture jeune de 18 à 24 h sur milieu gélosé non sélectif. 3 à 5 colonies bien distinctes sont suspendues dans l'eau physiologique 0.85 %, ensuite, la suspension est ajustée au standard 0.5 McFarland avec un spectrophotomètre à 625 nm qui correspond à une densité optique de 0.08 – 0.1. Donc, la suspension bactérienne contient approximativement $1 \text{ à } 2 \times 10^8$ UFC/ml.

Des disques en papier filtre Wattman n° 4 de 6 mm de diamètre sont stérilisés par autoclavage, puis imprégnés par 10 µl des extraits à tester (solubilisés dans le DMSO pur). La gentamycine a été utilisée comme antibiotique de référence.

Le milieu de culture recommandé est la gélose Mueller Hinton à pH 7.2 à 7.4.

L'ensemencement se fait par écouvillonnage de l'inoculum sur la gélose grâce à des stries serrées tout en tournant la boîte à 60° à trois reprises. Ensuite, les disques sont déposés dans les boîtes sur la gélose préalablement ensemencée.

Après 15 min de l'application des disques, les boîtes Pétri sont incubées à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 18 à 24 h.

La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition uniformément circulaire (mm).

c. Méthode de microdilution sur milieu liquide

Dans cette technique, des microplaques à fond rond (96 puits) sont utilisées pour déterminer la concentration minimale inhibitrice, qui est la plus faible concentration de l'agent antimicrobien qui inhibe la croissance des microorganismes.

Dans chaque ligne de la microplaque, est déposé 100 µl du bouillon Mueller Hinton. Ensuite, 100 µl de l'extrait à tester est introduite dans le 1^{er} puits. Après avoir bien mélangé le contenu du 1^{er} puits, 100 µl est prélevé, puis déposé dans le 2^{ème} puits, et ainsi de suite jusqu'au 10^{ème} puits où 100 µl restantes est éliminé. Par conséquent, nous obtenons une dilution ½ entre chaque puits. Les deux derniers puits représentent des témoins négatifs : le puits n°11 contient le milieu de culture et l'inoculum et le puits n°12 contient uniquement le bouillon Mueller Hinton.

Enfin, 100 µl de l'inoculum (5×10^5 UFC/ml) est ajouté dans chaque puits. Les microplaques sont scellées et incubées à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 16 à 20h.

Les extraits aqueux et hydrométhanoliques sous reflux et macérés, sont solubilisés dans l'eau distillée stérile, et les autres extraits sont solubilisés dans le DMSO dilué au 1/8^{ème}.

2. Activité antifongique

Les souches utilisées sont des levures de *Candida albicans* de référence fournies par le laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-Chimie, Synthèse et Activité Biologique :

Candida albicans ATCC 10231 ;

Candida albicans ATCC 26790 ;

Candida albicans IP 444.

L'activité antifongique des différents extraits a été évaluée par deux méthodes :

- Technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton supplémentée ;
- technique de détermination de la concentration minimale inhibitrice.

a. Technique de diffusion sur gélose

Dans cette méthode, le milieu de culture utilisée est la gélose Mueller Hinton supplémentée de 2 % de glucose et 0.5 µg/ml de bleu de méthylène à un pH de 7.2 à 7.4, ce qui permet de produire des zones d'inhibition visibles.

L'inoculum est préparé par suspension de 5 colonies distinctes d'une culture jeune de 24 h dans 5 ml d'eau physiologique stérile (0.85%). L'inoculum est ajusté au standard 0.5 McFarland par un spectrophotomètre à 530 nm soit une densité optique de 0.12 à 0.15 pour avoir $1 \text{ à } 5 \times 10^6$ cellules/ml. Après 15 minutes de la préparation de la suspension de levures, la surface de la gélose de Mueller Hinton supplémentée estensemencé par écouvillonnage 3

fois avec une rotation de la boîte de Pétri de 60° pour assurer une bonne distribution de l'inoculum.

Des disques stériles en papier filtre (6 mm) sont imprégnés par les extraits à tester (20 µl/disques) et sont déposés sur la gélose.

L'antifongique de référence utilisé est l'amphotéricine B (0.2 mg/disque). Après 15 min de l'application des disques, les boîtes sont incubées à 35 ± 2°C pendant 20 à 24 h [NCCLS, 2004].

La lecture des résultats se fait par la mesure des zones d'inhibition (mm).

b. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

C'est une méthode de microdilution sur milieu liquide utilisant des microplaques à fond rond (96 puits) pour déterminer les CMI des agents antifongiques.

100 µl du bouillon Sabouraud est transféré dans chaque puits, ensuite 100 µl de l'extrait est déposé dans le premier puits, après avoir bien mélangé le contenu du puits, 100 µl est prélevé pour être ajouté au puits suivant et ainsi de suite jusqu'au 10^{ème} puits. Enfin, 100 µl de l'inoculum (1 à 5 × 10⁴ cellules/ml) est déposé dans chaque puits. Les deux derniers puits représentent des témoins négatifs : le puits n°11 contient le milieu de culture et l'inoculum et le puits n°12 contient uniquement le bouillon Sabouraud.

Les microplaques sont ensuite, scellées et placées dans l'étuve à 35 ± 2°C pendant 24 h.

3. Activité antioxydante

a. Réduction du fer – FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power

Le pouvoir réducteur d'une molécule est relatif à sa capacité de transfert des électrons et peut servir comme indicateur significatif de son activité antioxydante.

Dans cette technique, la couleur jaune de la solution change au vert et bleu selon le pouvoir réducteur de l'échantillon testé. Et, une absorbance élevée à 700 nm indique un pouvoir réducteur élevé [Zovko Končić *et al*, 2010].

La méthode FRAP est réalisée selon le protocole de Yen et Chen, 1995.

Les extraits hydrométhanolique sous reflux et alcaloïdes totaux (0.025 – 1 mg) sont dissout dans 1 ml d'eau distillée et mélangés avec 2.5 ml de tampon phosphate 2 M (pH 6.6)

et 2.5 ml de ferricyanure de potassium 1 %. Le mélange est incubé à 50° C pendant 20 min. Après incubation, 2.5 ml d'acide trichloroacétique 10 % est ajouté pour stopper la réaction. Ensuite, les solutions sont centrifugées pendant 10 min. 2.5 ml du surnageant est ajouté à 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de la solution de chlorure de fer 0.1 %. L'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre à 700 nm.

L'acide ascorbique a été utilisé comme témoin positif avec les mêmes concentrations et dans les mêmes conditions expérimentales.

b. Piégeage du radical libre DPPH

C'est une méthode largement utilisée dans l'étude de l'activité antioxydante. Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables.

La présence de ces radicaux DPPH donne lieu à une coloration violette foncée de la solution, qui absorbe aux environs de 517 nm. La réduction des radicaux DPPH par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution.

L'évaluation de la capacité antioxydante est réalisée comme suit : à 1950 µl d'une solution méthanolique de DPPH à 6.34×10^{-5} M, est ajouté 50 µl des extraits hydrométhanolique et alcaloïdes totaux à différentes concentrations. Le contrôle négatif est préparé, en parallèle, en mélangeant 50 µl de méthanol avec 1950 µl de la solution méthanolique de DPPH.

Après incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 30 min, l'absorbance est mesurée à 515 nm [Atoui *et al*, 2005].

Le pourcentage d'inhibition PI est calculé selon la formule suivante :

$$PI \% = A_C - A_E / A_C \times 100$$

Avec : A_C : absorbance du contrôle ;

A_E : absorbance de l'extrait.

L'activité antiradicalaire RSA est calculée selon l'équation suivante :

$$RSA = 1 - [(A_{\text{extrait}} / A_{\text{contrôle}})] \times 100 \text{ [Zovko Končić } et al, 2010].$$

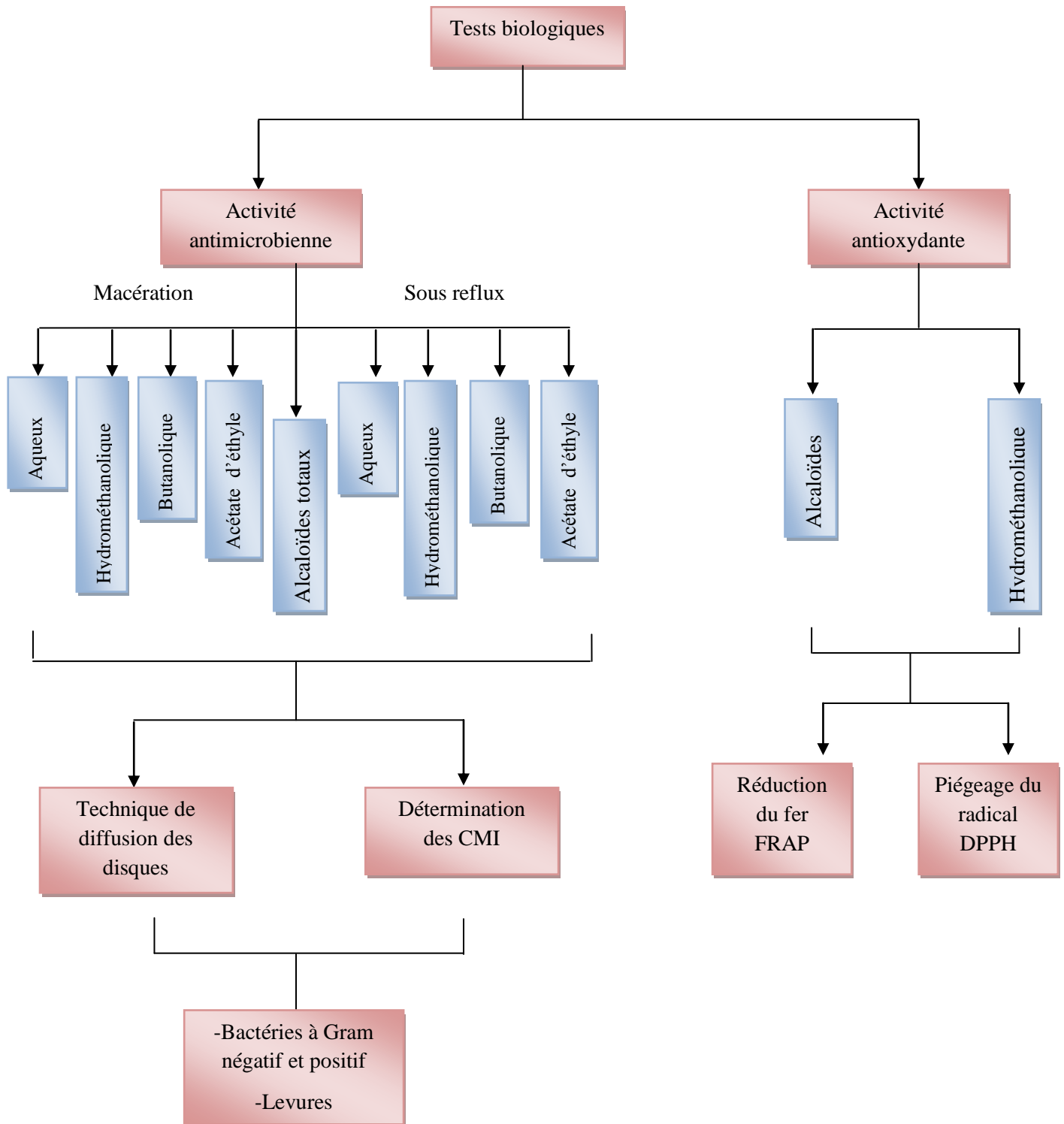


Figure 10 : Schéma récapitulatif des tests biologiques

Résultats et Interprétation

I. Etude phytochimique

1. Extraction

Deux types d'extraction des écorces de racine de *Berberis vulgaris* ont été réalisés : l'extraction par macération pendant 24 h et l'extraction sous reflux pendant 3 h.

Les solvants utilisés sont : eau distillée, eau / méthanol (30 : 70), butanol-1, et acétate d'éthyle. Les rendements obtenus sont présentés dans les figures 11 et 12.

Les résultats obtenus montrent que le rendement est meilleur pour les extraits bruts obtenus par extraction sous reflux.

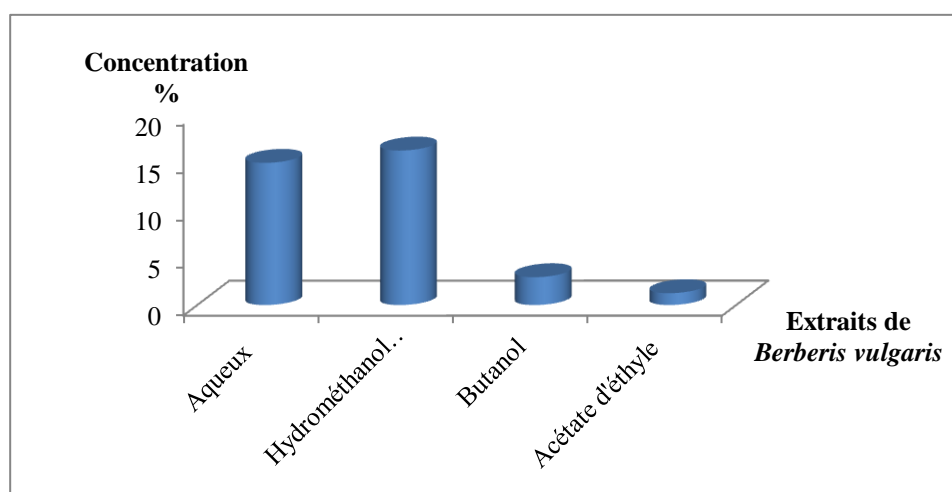


Figure 11 : Rendements des extraits sous reflux de *Berberis vulgaris*

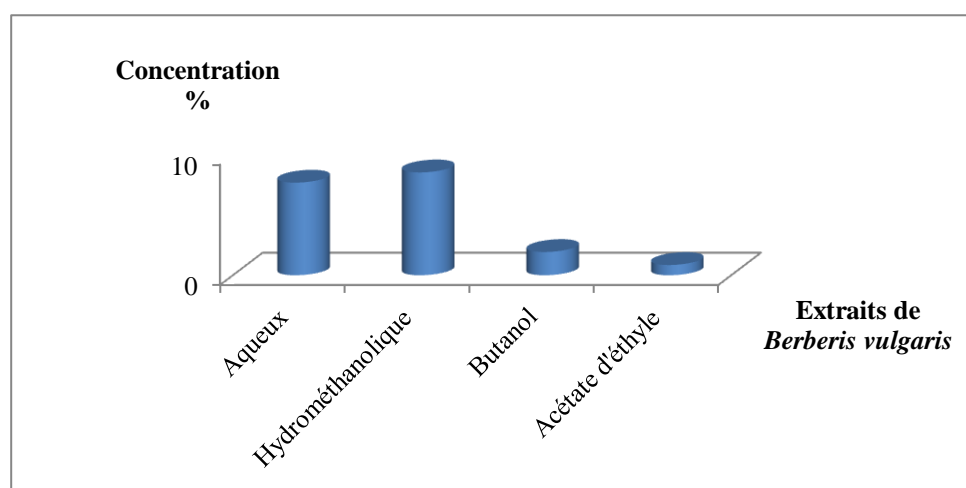


Figure 12 : Rendements des extraits macérés de *Berberis vulgaris*

Le rendement pour l'extraction sous reflux est meilleur avec l'extrait hydrométhanolique, ensuite l'extrait aqueux. Tandis que les extraits butanolique et acétate d'éthyle ont présentés des rendements plus faibles.

2. Tests phytochimiques

Les tests de caractérisation réalisés sur les trois extraits aqueux, méthanolique et étherique, ont donné les résultats reportés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Résultats de l'examen phytochimique

Familles chimiques		Extraits		
		Aqueux	Méthanolique	Etherique
Alcaloïdes	Mayer	+++	+++	-
	Wagner	+++	+++	-
Substances polyphénoliques	Flavonoïdes	-	-	-
	Anthocyanines	-	-	-
	Tanins	+++	++	-
Coumarines		+	+	-
Anthraquinones		-	-	-
Stérols et triterpènes		+	+++	+++
Terpénoïdes		+	-	-
Saponosides		++	-	-
Composés réducteurs		+++	+++	-
Mucilages		++	+	-
Glycosides cardiaques		-	-	-

(+++) : Fortement présent ; (++) : Moyennement présent ; (+) : Faiblement présent ; (-) : test négatif

Les essais phytochimiques effectués sur les extraits des écorces de racines de *Berberis vulgaris* ont révélé la présence des coumarines, des terpénoïdes, de saponosides et de

mucilages. Les composés les plus abondants sont les alcaloïdes, les tanins, les stérols et les triterpènes et les composés réducteurs.

Les tests de recherche des flavonoïdes, des anthocyanines, des anthraquinones et des glycosides cardiaques ont été négatifs sur nos extraits.

3. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

Les résultats obtenus pour le dosage des polyphénols et des flavonoïdes sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg GAE/g), et mg équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg CEQ/g) respectivement.

L'extrait hydrométhanolique obtenu par extraction sous reflux, a montré une concentration de 10.48 mg GAE/g en polyphénols totaux et une teneur plus faible en flavonoïdes 2.05 mg CEQ/g, ceci nous laisse à penser que les polyphénols sont représentés surtout par la famille des tanins qui a donné un test positif pour l'examen phytochimique.

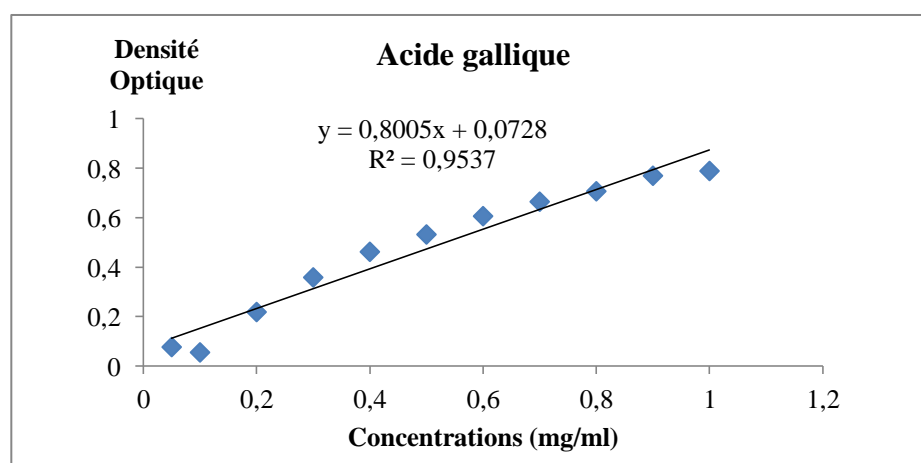


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

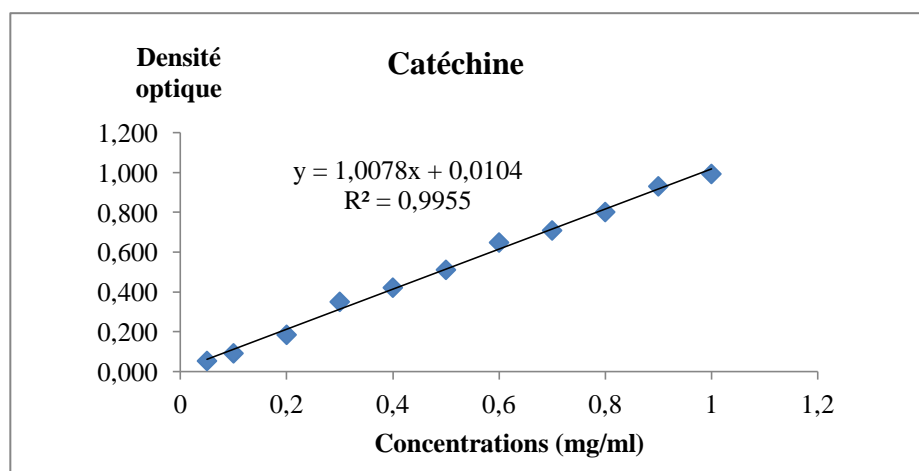


Figure 14 : Courbe d'étallonnage de la catéchine

4. Alcaloïdes totaux et CCM

L'extraction des alcaloïdes totaux à partir des écorces de racines de *Berberis vulgaris* permet d'obtenir un rendement de 6.7 %, ce qui montre la richesse de la plante en alcaloïdes.

L'extrait est sous forme de cristaux de couleur marron.

L'analyse chromatographique des alcaloïdes totaux a été réalisée avec le système chloroforme / méthanol (9/1) (v/v) et révèle la présence de 6 tâches dont trois tâches fluorescentes : jaune, vert et bleu (tableau 11, figure 15).

Tableau 11 : Analyse chromatographique des alcaloïdes totaux de *Berberis vulgaris*

Aspect physique de l'extrait	Rendement %	CCM			
		Eluant	Proportion	Nombre de tâche	RF
Cristallisé Marron	6.7	CHCl ₃ /CH ₃ OH	9 : 1	6	0.25
					0.38
					0.44
					0.68
					0.76
					0.94

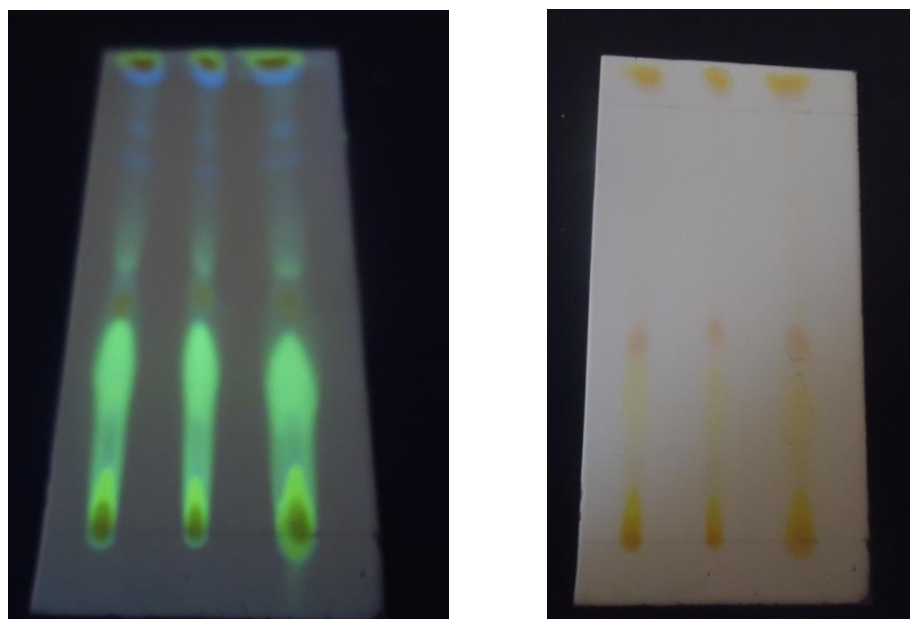


Figure 15 : Photos des plaques CCM prises avant et après révélation à la lumière UV à 366 nm

II. Activité biologique

1. Activité antibactérienne

a. Evaluation de l'activité des extraits de *Berberis vulgaris* par la méthode de diffusion des disques

Les résultats des tests préliminaires de l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits bruts et des alcaloïdes totaux de *Berberis vulgaris* sont présentés dans le tableau 4.

Les résultats montrent une activité antibactérienne variable entre les différents extraits vis-à-vis des souches bactériennes.

Les extraits aqueux et hydrométhanolique obtenu par macération montre une activité antibactérienne meilleur par rapport aux autres extraits vis-à-vis de *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Citrobacter freundii* ATCC 8090 et *Enterobacter cloacae* ATCC 13047.

Les extraits butanolique et acétate d'éthyle sous reflux présentent une activité moyenne sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (diamètres d'inhibition 17 et 12 mm respectivement), et les alcaloïdes totaux qui étaient actifs sur *Escherichia coli* ATCC 25912 et *Bacillus cereus* ATCC 10876 (diamètres d'inhibition 11.5 et 15 mm respectivement).

L'activité antibactérienne a été testée pour des extraits obtenus par deux méthodes d'extraction sous reflux et macération, où l'effet de la température est évalué pour vérifier son influence sur l'activité. De ce fait, les meilleurs résultats ont été obtenus pour les extraits aqueux et hydrométhanolique macérés. Ce qui peut suggérer que les substances bioactives antibactériennes sont thermolabiles.

Tableau 12 : Zones d'inhibition obtenues pour les extraits de *Berberis vulgaris*

Souches Extraits		Zones d'inhibition (mm)											
		Ab	STy	Pa	Ec	Ef	Sa	Bc	Kp	Cf	Pmi	Lm	Enc
Extraits sous reflux	Aqueux 2 mg/disque	6	10	6	10	10	10	13.5	7	9	7	6	7
	Hydro- méthanolique 2 mg/disque	8	9	7	11	7	6	15	7	8	6	6	6
	Butanolique 2 mg/disque	7	7	7	10	6	17	10	6	9	6	6	6
	Acétate d'éthyle 1 mg/disque	6	6	6	6	6	12	6	6	7	7	6	6
Extraits macérés	Aqueux 2 mg/disque	6	12	7	6	15	6	10	6	15	8	6	18
	Hydro- méthanolique 2 mg/disque	6	19.5	8	7	20	6	12.5	6	16.5	6	6	21
	Butanolique 1 mg/disque	6	7	9	7.5	7	6	11	6	6	6	6	6
	Acétate d'éthyle 0.92 mg/disque	8	6	6	10.5	8	6	6	6	6	6	6	6
Alcaloïdes totaux 2 mg/disque		6	10	6	11.5	6	6	15	6	6	6	6	6
Gentamycine 10 µg/disque		14	26.5	25	23	13	33	22	15	32	25	12	23

(-) : 0-10 mm aucune activité, (+) : 11-16 mm moyenne activité, (++) : 17-25 mm bonne activité

Ab : *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 ; Sty : *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 ; Pa : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ; Ec : *Escherchia coli* ATCC 25912 ; Ef : *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 ; Sa : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ; Bc : *Bacillus cereus* ATCC 10876 ; Kp : *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 ; Cf : *Citrobacter freundii* ATCC 8090 ; Lm : *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ; Enc : *Enterobacter cloacae* ATCC 13047

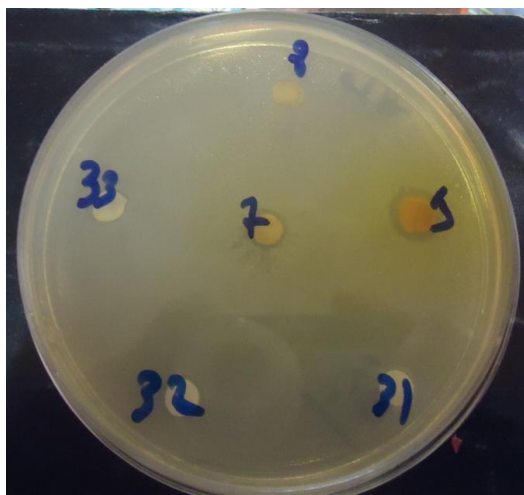


Figure 16 : Zones d'inhibition des extraits butanolique (7) macéré et alcaloïdes (9) vis-à-vis *Enterobacter cloacae* ATCC 13047

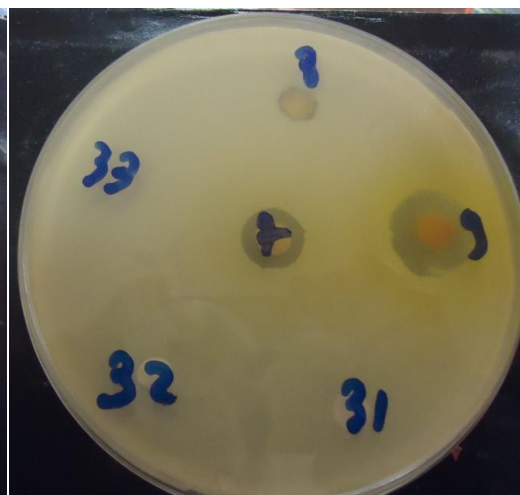


Figure 17 : Zones d'inhibition des extraits butanolique macéré (7) et alcaloïdes (9) vis-à-vis de *Bacillus cereus* ATCC 10876

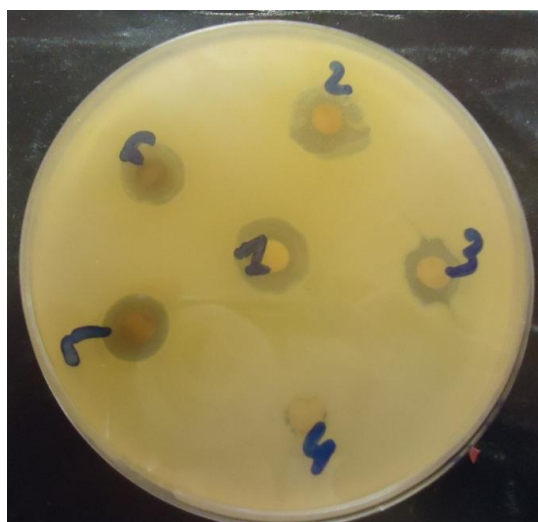


Figure 18 : Zones d'inhibition des extraits aqueux et hydrométhanoliques macéré et sous reflux (1, 2, 5 et 6) et l'extrait butanolique sous-reflux (3) vis-à-vis de *Bacillus cereus* ATCC 10876

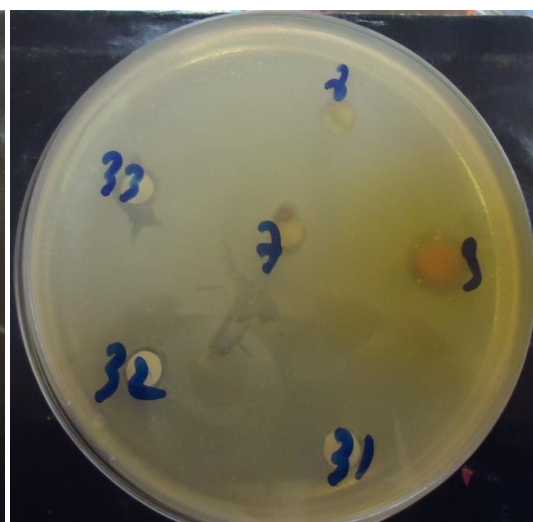


Figure 19 : Zones d'inhibition de l'extrait des alcaloïdes (9) vis-à-vis de *Salmonella typhimurium* ATCC 13311

b. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

D’après les résultats obtenus pour la technique des disques, nous nous sommes intéressés à déterminer la concentration minimale inhibitrice des différents extraits actifs sur les sept souches bactériennes (tableau 13).

Les CMI obtenus pour les extraits aqueux et hydrométhanolique sous reflux sont comparables à ceux des extraits aqueux et hydrométhanolique macéré. Ce qui n’était pas le cas pour la technique précédente.

L’extrait butanolique sous reflux a présenté une CMI moyenne 2.5 mg/ml et les extraits butanolique et acétate d’éthyle ont montrés des CMI plus élevés 20 mg/ml. Cependant, l’extrait des alcaloïdes totaux a montré une CMI moyenne de 5 – 10 mg/ml vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25912 et *Salmonella typhimurium* ATCC 13311.

La souche bactérienne la plus sensible aux extraits de *Berberis vulgaris* est *Bacillus cereus* ATCC 10876 où la CMI la plus faible est obtenu pour les extraits hydrométhanoliques sous reflux et macéré (0.312 mg/ml).

L’extrait acétate d’éthyle sous-reflux semble être inactif à l’intervalle des concentrations utilisées.

Tableau 13 : Concentrations minimales inhibitrices CMI mg/ml des extraits de *Berberis vulgaris* vis-à-vis des souches bactériennes

	Extraits sous reflux				Extraits macérés				Alcaloïdes
	Aqueux	Hydro-méthanolique	Butanolique	Acétate d'éthyle	Aqueux	Hydro-méthanolique	Butanolique	Acétate d'éthyle	
Sa	5	≥ 20	2.5	≥ 20	5	≥ 20	20	20	10
Ef	2.5-5	2.5	≥ 20	≥ 20	1.25	2.5	≥ 20	≥ 20	≥ 20
Cf	5	5	≥ 20	≥ 20	5	2.5	≥ 20	≥ 20	≥ 20
Ec	≥ 20	≥ 20	≥ 20	≥ 20	≥ 20	≥ 20	≥ 20	≥ 20	10

Enc	≥ 20	5	≥ 20	≥ 20	1.25	0.625	≥ 20	≥ 20	≥ 20
Bc	0.625	0.312	2.5	≥ 20	1.25	0.312	2.5	≥ 20	1.25
Sty	2.5	1.25	≥ 20	≥ 20	2.5	5	≥ 20	≥ 20	5

Sa : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ; Ef : *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 ; Cf : *Citrobacter freundii* ATCC 8090 ; Ec : *Escherchia coli* ATCC 25912 ; Enc : *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 ; Bc : *Bacillus cereus* ATCC 10876 ; Sty : *Salmonella typhimurium* ATCC 13311.

2. Activité antifongique

a. Méthode de diffusion des disques

L'activité antifongique des différents extraits de l'écorce des racines de *Berberis vulgaris* a été évaluée vis-à-vis de 3 souches de levures *Candida albicans* de référence, dont *Candida albicans* ATCC 10231 est une souche multirésistante (tableau 14).

Les résultats obtenus pour *Candida albicans* ATCC 26790 montrent une activité significative pour les extraits aqueux, hydrométhanolique sous reflux et les extraits aqueux, hydrométhanolique et butanolique macérés, dont l'extrait butanolique macéré a montré la meilleure activité (diamètre d'inhibition 25 mm). L'extrait butanolique, acétate d'éthyle sous reflux et acétate d'éthyle macérés ont présenté un effet peu significatif contre la levure.

Concernant *Candida albicans* 444IP, l'extrait hydrométhanolique sous reflux et les extraits aqueux et hydrométhanolique macéré ont présentés une très bonne activité (diamètres d'inhibition 18.5, 20.5, et 25 mm respectivement), suivi des extraits aqueux et butanolique sous reflux et butanolique macéré. Tandis que les extraits acétate d'éthyle sous reflux et macéré n'ont montré aucun effet sur la souche.

Candida albicans ATCC 10231 est la souche la moins sensible par rapport aux deux autres levures. Les extraits actifs sont les extraits aqueux et hydrométhanolique sous reflux et aqueux, hydrométhanolique et butanolique macérés. Aucune activité n'est observée pour les extraits butanolique et acétate d'éthyle sous reflux et acétate d'éthyle macéré.

L'extrait des alcaloïdes totaux a présenté une activité plus significative que les extraits bruts vis-à-vis des trois souches de levure avec des zones d'inhibition de 19 à 29 mm de diamètre.

Les extraits de *Berberis vulgaris* et plus spécifiquement les alcaloïdes présentent une activité antifongique remarquable vis-à-vis des levures de *Candida albicans*. Cependant,

l'amphotéricine B (diamètres d'inhibition entre 30 et 32 mm) est l'antifongique le plus actif avec une concentration plus faible 0.2 mg/disque.

Tableau 14 : Zones d'inhibition obtenues pour les extraits de *Berberis vulgaris*

Souches Extraits		Zones d'inhibition (mm)		
		<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	<i>Candida albicans</i> 444IP	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
Extraits sous reflux	Aqueux 2 mg/disque	20	14	15
	Hydro-méthanolique 2 mg/disque	20	18.5	15
	Butanolique 2 mg/disque	12.5	13	9
	Acétate d'éthyle 1 mg/disque	13	8	6
Extraits macérés	Aqueux 2 mg/disque	18.5	20.5	15
	Hydro-méthanolique 2 mg/disque	19	25	14.5
	Butanolique 1 mg/disque	25	16	17
	Acétate d'éthyle 0.92 mg/disque	11	8	6
Alcaloïdes totaux 2 mg/disque		29	28	19
Amphotéricine B 0.2 mg/disque		30	30	32

(-) : 0-10 mm aucune activité, (+) : 11-16 mm moyenne activité, (++) : 17-25 mm bonne activité



Figure 20 : Zones d'inhibition des extraits aqueux, hydrométhanolique, sous reflux et macérés (1, 2, 5, 6) et butanolique et acétate d'éthyle sous reflux (3 et 4) vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 26790



Figure 21 : Zones d'inhibition des extraits butanolique macéré (7) et alcaloïdes (9) vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 26790

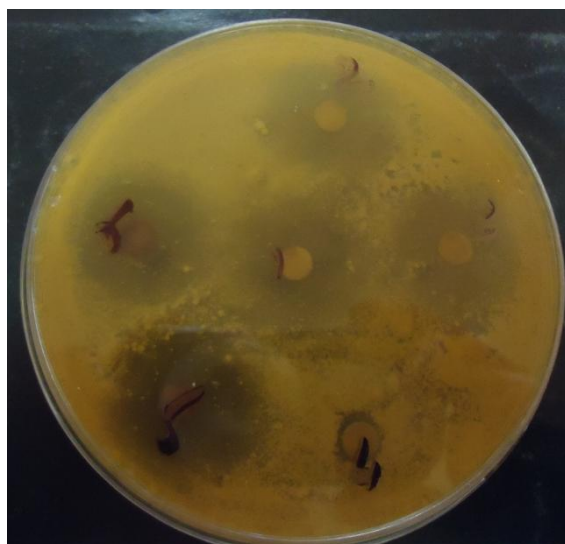


Figure 22 : Zones d'inhibition des extraits aqueux, hydrométhanolique, sous reflux et macérés (1, 2, 5, 6) et butanolique sous reflux (3) vis-à-vis de *Candida albicans* 444 IP



Figure 23 : Zones d'inhibition des extraits butanolique macéré (7) et alcaloïdes (9) vis-à-vis de *Candida albicans* 444 IP



Figure 24 : Zones d'inhibition des extraits aqueux, hydrométhanolique, sous reflux et macérés (1, 2, 5, 6) et butanolique sous-reflux (3) vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231

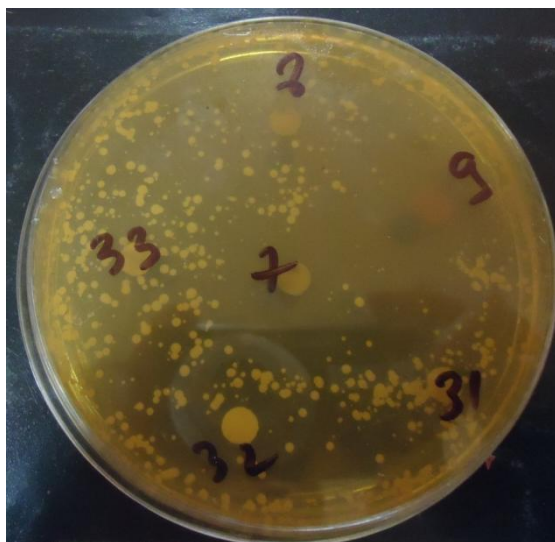


Figure 25 : Zones d'inhibition des extraits butanolique macéré (7) et alcaloïdes (9) vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231

b. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Les résultats obtenus précédemment montrent que les extraits de *Berberis vulgaris* possèdent une activité antifongique très intéressante. Pour cela, nous nous sommes intéressés à déterminer leur CMI sur microplaques en milieu liquide (tableau 15).

Les résultats obtenus pour *Candida albicans* ATCC 26790, montrent des CMI remarquable pour les extraits hydrométhanolique sous reflux et aqueux et hydrométhanolique macérés de l'ordre de 0.625 mg/ml, suivi de l'extrait aqueux sous reflux et les alcaloïdes avec une CMI de 1.25 mg/ml.

Pour *Candida albicans* 444IP, l'extrait aqueux macéré présente la plus faible CMI 0.213 mg/ml, et les extraits hydrométhanoliques sous reflux et macéré ont montré une CMI de l'ordre de 0.625 mg/ml, puis l'extrait aqueux sous reflux et les alcaloïdes avec une CMI de 1.25 mg/ml.

Candida albicans ATCC 10231 s'est montré résistante par rapport aux deux autres levures, la CMI la plus faible obtenu pour cette souche est de 1.25 mg/ml pour les extraits hydrométhanoliques sous reflux et aqueux et hydrométhanolique macérés. Les alcaloïdes

totaux ont montré une CMI plus élevée 10 mg/ml par rapport à celle obtenue pour les deux autres souches.

Les extraits d'acétate d'éthyle sous reflux et macéré, n'ont dévoilé aucune CMI. Sauf, pour *Candida albicans* ATCC 10231, où la CMI est de 10 mg/ml pour l'extrait acétate d'éthyle macéré.

D'après ces résultats, les extraits de *Berberis vulgaris* exercent une activité antifongique meilleure que l'activité antibactérienne. De plus, l'extrait le plus actif est les alcaloïdes totaux et les extraits hydrométhanolique et aqueux macérés et sous reflux.

Tableau 15 : Concentrations minimales inhibitrices CMI mg/ml des extraits de *Berberis vulgaris* vis-à-vis des levures

	Extraits sous reflux				Extraits macérés				Alcaloïdes
	Aqueux	Hydro-méthanolique	Butanolique	Acétate d'éthyle	Aqueux	Hydro-méthanolique	Butanolique	Acétate d'éthyle	
<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	1.25	0.625	20	≥ 20	0.625	0.625	2.5	≥ 20	1.25
<i>Candida albicans</i> 444IP	1.25	0.625	5	≥ 20	0.312	0.625	2.5	≥ 20	1.25
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2.5	1.25	20	≥ 20	1.25	1.25	20	10	10

3. Activité antioxydante

a. Réduction du fer FRAP

D'après les graphes de la figure 7, l'extrait hydrométhanolique a présenté le plus d'activité pour réduire le fer par rapport à l'extrait des alcaloïdes totaux qui a présenté une faible activité, avec des valeurs de densité optiques, qui ne dépassent pas 0.2.

Nous remarquons aussi, que l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle avec l'augmentation de la concentration de l'extrait.

L'acide ascorbique, l'antioxydant de référence, a présenté une activité plus élevée par rapport aux extraits, avec les mêmes concentrations utilisées.

Les résultats obtenus dans cette méthode, montrent que les extraits de l'écorce des racines de *Berberis vulgaris* possèdent une activité antioxydante intéressante. Nous pouvons classer la réduction du fer des échantillons comme suit : acide ascorbique, extrait hydrométhanolique, alcaloïdes totaux.

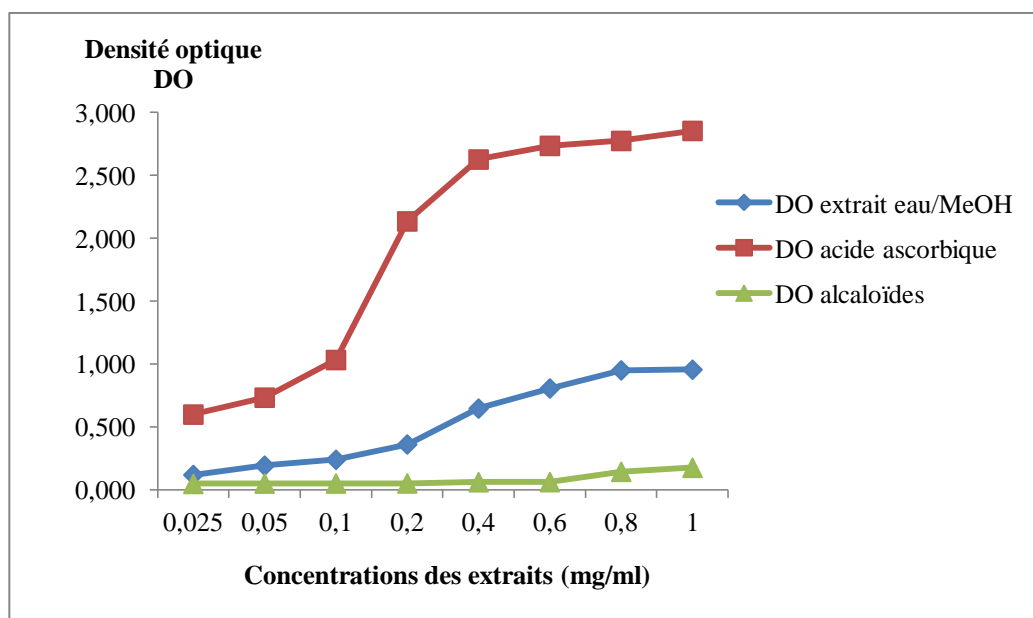


Figure 26 : Pouvoir réducteur des extraits hydrométhanolique et alcaloïdes totaux de *Berberis vulgaris* testés par la méthode FRAP

b. Piégeage du radical libre DPPH

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits (Figure 27 et 28).

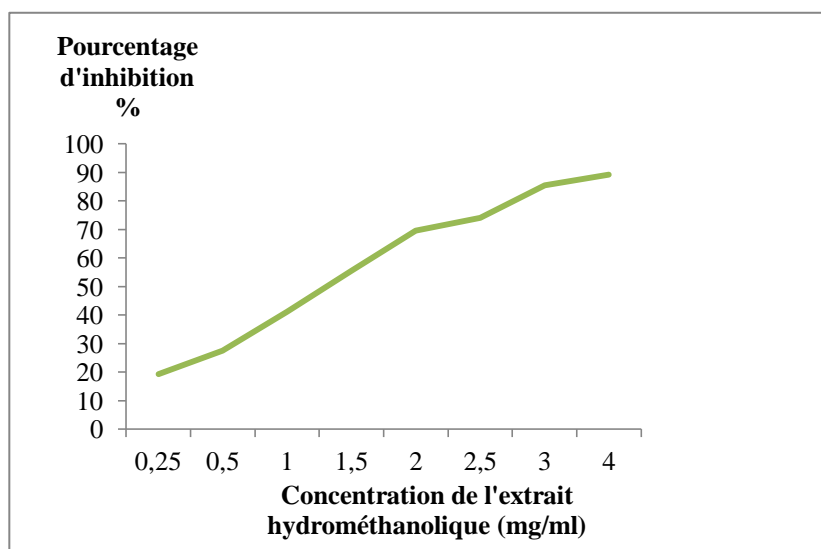


Figure 27 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydrométhanolique

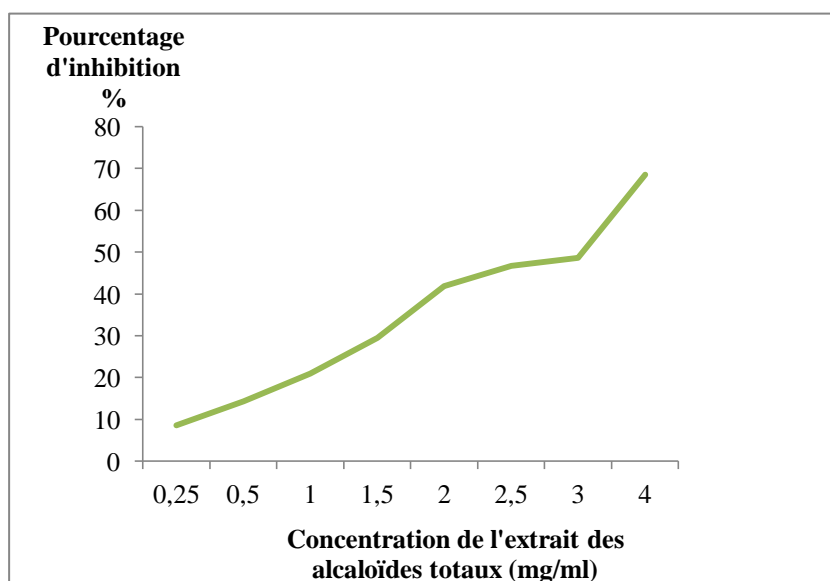


Figure 28 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait des alcaloïdes totaux

L'extrait hydrométhanolique montre des pourcentages d'inhibition élevés avec de faibles concentrations. À la différence de l'extrait des alcaloïdes totaux qui présentent des pourcentages d'inhibition inférieure.

Une concentration de 4 mg/ml de l'extrait hydrométhanolique produit un pourcentage d'inhibition de 89.96 %, et à cette même concentration, les alcaloïdes totaux produisent un pourcentage d'inhibition égale à 68.59 %.

Ensuite, nous avons déterminés pour les deux extraits, la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical libre DPPH ou IC₅₀.

À partir des équations des régressions linéaires des graphes représentés dans les figures 29 et 30, nous avons calculé les IC₅₀ des extraits de *Berberis vulgaris*. Les valeurs des IC₅₀ sont représentées dans le tableau 16.

Tableau 16 : Valeurs des IC₅₀ des extraits de *Berberis vulgaris*

Extrait	Alcaloïdes totaux	Acide ascorbique
Extrait hydrométhanolique	2.80	0.126
IC ₅₀ exprimée en mg/ml	1.40	

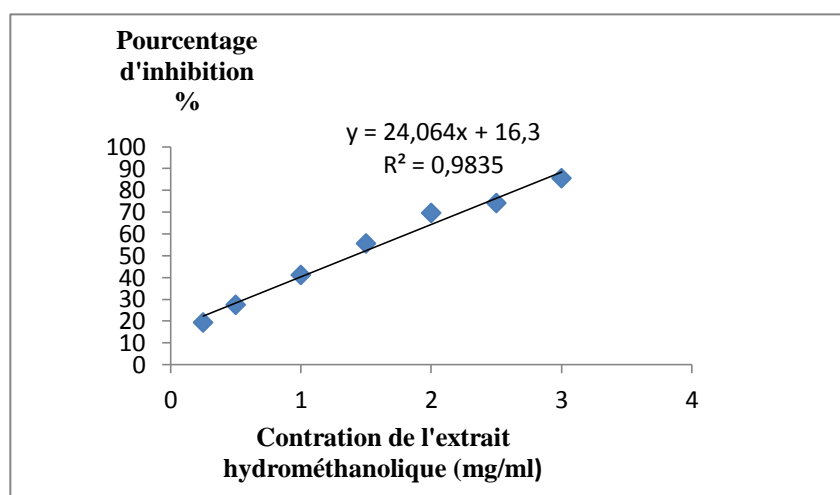


Figure 29 : Représentations des régressions linéaires des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydrométhanolique

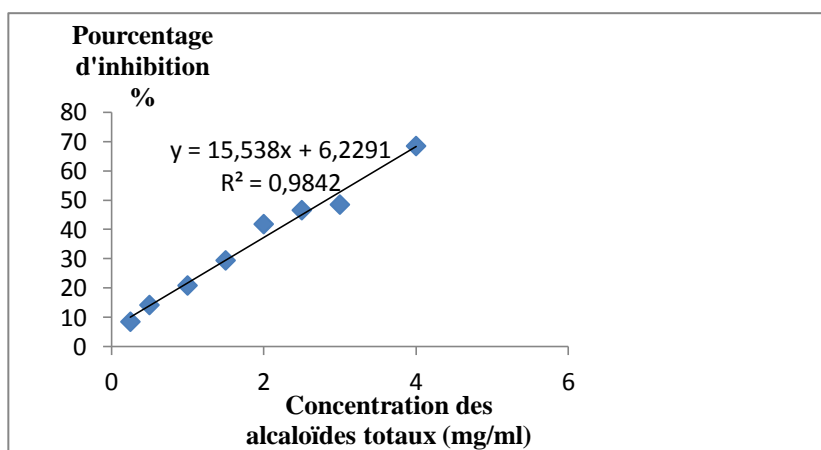


Figure 30 : Représentations des régressions linéaires des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait des alcaloïdes totaux

D'après les valeurs obtenues, l'extrait hydrométhanolique présente un IC_{50} inférieur à celui des alcaloïdes totaux, et donc une activité meilleure.

L' IC_{50} obtenu pour l'acide ascorbique, utilisé comme molécule de référence, est bien plus inférieur à ceux des extraits, est donc, l'acide ascorbique possède une activité antioxydante très élevée.

D'après la figure 33, l'acide ascorbique présente une activité antiradicalaire plus élevée par rapport aux deux extraits. Suivi de l'extrait hydrométhanolique avec une RSA de 89.3 % à la concentration de 4 mg/ml (Figure 31). Les alcaloïdes totaux présentent une activité antiradicalaire plus faible 68.6 % à la même concentration (Figure 32). Ceci indique que, l'extrait hydrométhanolique possède une activité antioxydante plus élevée par rapport aux alcaloïdes totaux. Ceci, pourrait être expliqué par la présence des polyphénols totaux et flavonoïdes quantifiés dans l'extrait hydrométhanolique, et qui pourraient être impliqués dans le pouvoir antioxydant.

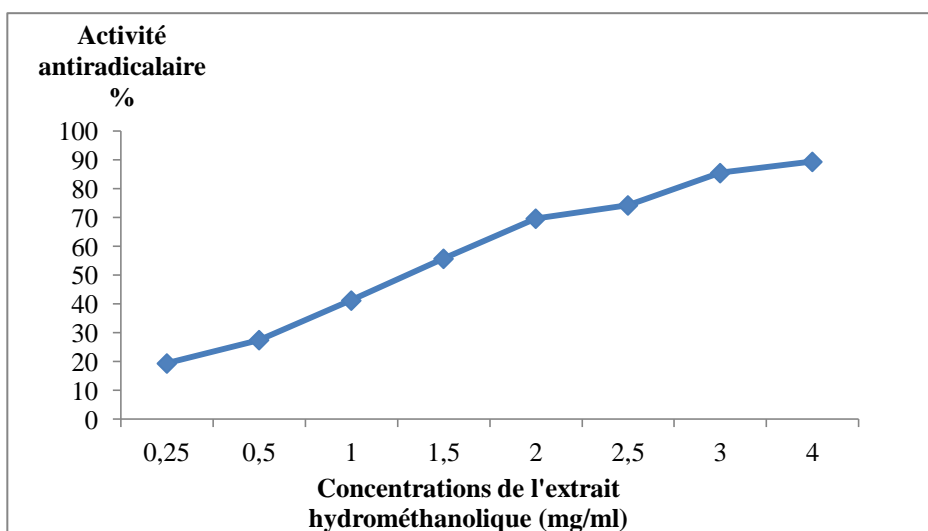


Figure 31 : Activité antiradicalaire de l'extrait hydrométhanolique

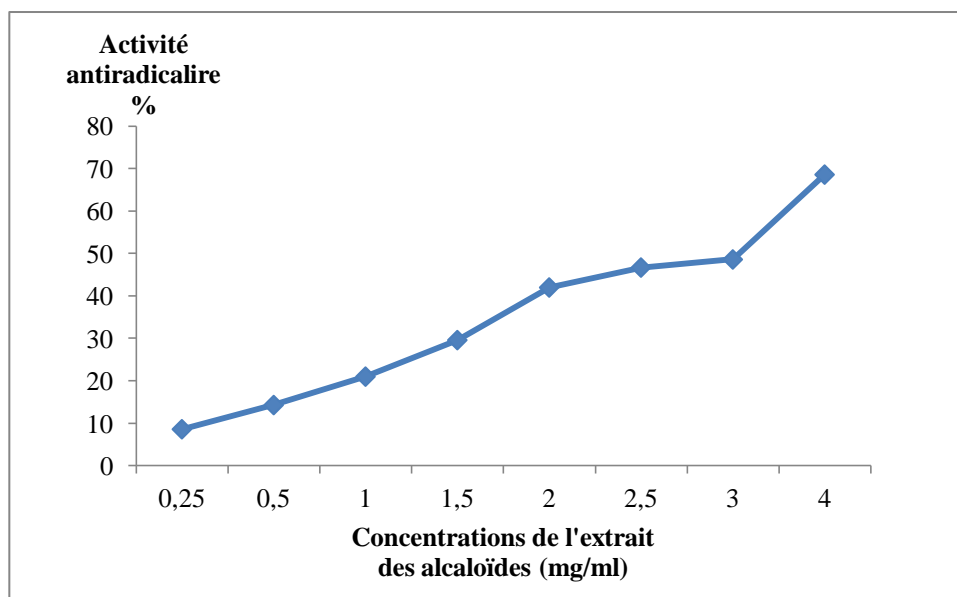


Figure 32 : Activité antiradicalaire de l'extrait des alcaloïdes totaux

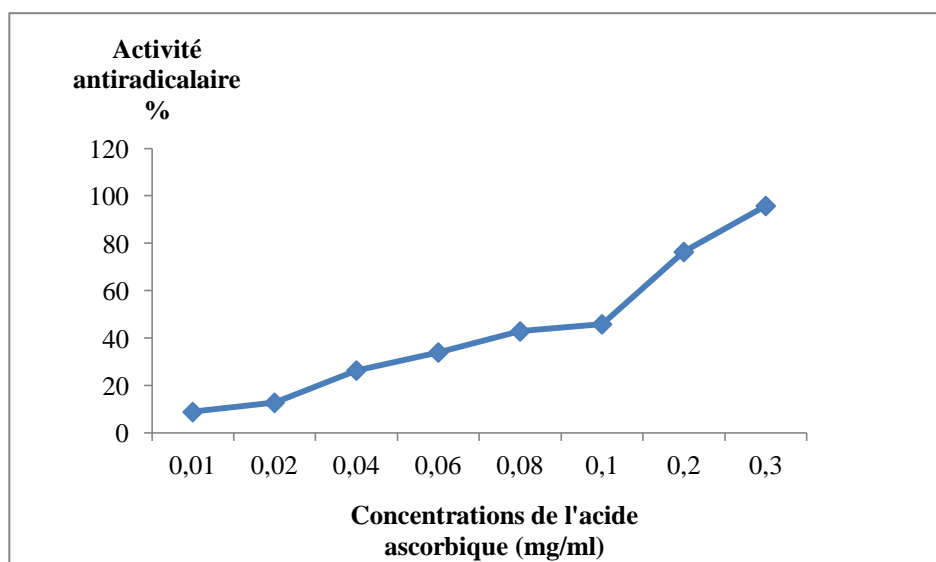


Figure 33 : Activité antiradicalaire de l'acide ascorbique

Discussion

L'évaluation des plantes médicinales pour leurs activités biologiques a augmenté considérablement en Algérie. Ceci montre que les molécules isolées à partir des plantes médicinales sont certainement intéressantes pour être utilisées comme thérapie alternative ou comme modèle pour la synthèse de nouvelles substances [Houghton, 2000].

Le travail présent, évalue les activités biologiques de *Berberis vulgaris*, appelé communément Ghriss, et utilisé traditionnellement par la population de Tlemcen – Algérie, pour traiter certaines affections dont le diabète sucré [Azzi *et al*, 2012].

Afin d'évaluer les effets biologiques de *Berberis vulgaris*, nous avons procédé à des extractions des écorces de racine de la plante. L'extraction peut affecter la quantité et la composition en métabolites secondaires d'un extrait, de plus plusieurs facteurs peuvent influencer l'extraction : le mode et le temps d'extraction, la température, la nature du solvant et sa concentration ainsi que la polarité qui permet de solubiliser les composés de polarité similaire au solvant [Green, 2004 ; Ncube *et al*, 2008].

Nous avons opté pour deux types d'extractions : sous reflux pendant 3 h et la macération pendant 24 h pour comparer les effets de la température. Les solvants utilisés sont de polarité croissante : acétate d'éthyle, butanol-1, eau/méthanol (30 : 70) et eau. Cette différence de polarité permet d'extraire plusieurs métabolites secondaires de la plante [Green, 2004].

L'examen phytochimique réalisé sur les écorces de racines de *Berberis vulgaris* a révélé la présence des alcaloïdes, tanins, les composés réducteurs, les stérols et triterpènes en quantités importantes, et les saponosides, les coumarines, les terpénoïdes et les mucilages en quantités moins importante. Cependant, nous observons l'absence des flavonoïdes, des anthocyanines, des anthraquinones et des glycosides cardiaques dans les extraits.

Ces résultats sont proches de ceux obtenus par Meliani et ses collaborateurs, qui ont détecté la présence des tanins, des alcaloïdes, des saponosides, des stérols et des anthraquinones dans les écorces de racines de *Berberis vulgaris* [Meliani *et al*, 2011].

Les alcaloïdes identifiés par certains chercheurs sont représentés par la famille des isoquinolines : acanthine, bargustanine, berbamine, berberrubine, berlambine, columbamine, jatrorrhizine, lambertine, magnoflorine, palmatine et berberine [Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008].

Selon Kosalec et ses collaborateurs en 2009, la quantité de berberine est élevée dans l'extrait de racines de *Berberis vulgaris* par rapport aux feuilles et brindilles. Son taux est de 0.805 et 1.424 % dans les racines de *Berberis vulgaris* des régions de Skrad et Crni Lug respectivement.

Après la préparation des extraits bruts, une extraction des alcaloïdes totaux a été réalisée pour évaluer leur activité biologique. Leurs chromatogrammes montre la présence de 6 spots, dont trois tâches fluorescentes, l'un des spots est de fluorescence jaune avec un Rf de 0.25, cette tâche pourrait représenter berberine, un alcaloïde très abondant qui présente une fluorescence jaune d'après la littérature [Makkar *et al*, 2007].

L'étude quantitative de l'extrait hydrométhanolique de *Berberis vulgaris* a pour objectif de déterminer la teneur en polyphénols totaux qui est de l'ordre de 10.48 mg GAE/g et des flavonoïdes 2.05 mg CEQ/g. Ces valeurs sont proches de ceux obtenues par Zovko Končić et collaborateurs, qui ont obtenus des concentrations de 7.29 mg GAE/g et 10.34 mg GAE/g en polyphénols totaux des régions de Skrad et Crni Lug – Croatie [Zovko Končić *et al*, 2010].

Ces teneurs restent bien inférieures à la quantité en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique 80 % des fruits de *Berberis vulgaris* avec une teneur de 280 mg GAE/g [Motalleb *et al*, 2005].

Nous remarquons aussi que la concentration des flavonoïdes est plus faible que celle des polyphénols totaux, ceci nous permet de penser que les tanins sont la famille la plus représentatif des polyphénols totaux.

D'après les résultats obtenus de l'examen phytochimique qualitatif et quantitatif, *Berberis vulgaris* est riche en alcaloïdes représenté par berberine, qui est connu pour ces différentes activités : antidiabétiques, antiinflammatoire, antitumorale et antimicrobienne [Ivanovska et Philipov, 1996 ; Tan *et al*, 2006 ; Kosalec *et al*, 2009 ; Yin *et al*, 2012].

De plus, *Berberis vulgaris* renferme une concentration moyenne en polyphénols totaux et flavonoïdes, qui intéressent les chercheurs pour leur pouvoir antioxydant [Hennebelle *et al*, 2004].

Nous nous sommes, par conséquent intéressés aux effets antioxydants de l'extrait hydrométhanolique et l'extrait des alcaloïdes totaux de *Berberis vulgaris*.

L'activité antioxydante a été évaluée par la technique de réduction du fer FRAP, qui représente un indicateur significatif du pouvoir antioxydant des plantes. Les résultats montrent que la capacité réductrice de l'extrait hydrométhanolique est plus élevée que les alcaloïdes totaux avec des densités optiques de 0.955 et 0.176 respectivement à la concentration de 1 mg/ml.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Zovko Končić et ses collaborateurs, montrant une augmentation linéaire du pouvoir réducteur en fonction de la concentration de l'extrait éthanolique 96 % avec un SRP de 0.082 mg^{-1} et 0.048 mg^{-1} de l'extrait éthanolique des racines de *Berberis vulgaris* des régions de Croatie : Crni Lug et Skrad respectivement.

La capacité des extraits à donner un hydrogène a été vérifiée en utilisant un radical libre DPPH : la quantité de l'extrait nécessaire pour diminuer 50 % la concentration initial du DPPH est un paramètre largement utilisé pour la mesure de l'activité antioxydante. Un IC_{50} faible indique un grand pouvoir antioxydant. Un autre paramètre est étudié qui est le pouvoir antiradicalaire [Brand-Williams *et al*, 1995]. Selon les résultats obtenus, l'extrait hydrométhanolique possède un IC_{50} plus faible que celui des alcaloïdes totaux. De ce fait, l'extrait hydrométhanolique présente une activité antioxydante et sa capacité à piéger le radical libre DPPH est élevée que la capacité des alcaloïdes totaux.

Une étude a été réalisé par Zovko Končić et ses collaborateurs sur l'activité antioxydante des extraits éthanoliques des racines, brindilles et feuilles de *Berberis vulgaris* des régions Skrad et Crni Lug et *Berberis croatica* des régions de Kiza et Meduvrhi en Croatie.

Les auteurs ont obtenus des résultats différents pour le piégeage du radical libre DPPH et les valeurs d' IC_{50} varient entre $1895 \mu\text{g/ml}$ pour l'extrait éthanolique des racines de *Berberis vulgaris* de Skrad et $65 \mu\text{g/ml}$ pour l'extrait des feuilles de *Berberis vulgaris* de Crni Lug.

De plus, les extraits de *Berberis vulgaris* étaient moins actifs que les extraits correspondants de *Berberis croatica*. Dans tous les cas, les extraits des racines étaient les moins actifs, suivis par les extraits de brindilles et des feuilles [Zovko Končić *et al*, 2010].

L'action réductrice de l'extrait hydrométhanolique peut être expliquée par la présence des polyphénols totaux. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Zovko Končić et ses collaborateurs, qui ont montrés une forte corrélation entre le contenu des polyphénols totaux

et flavonols des extraits éthanoliques de *Berberis vulgaris* et l'activité antioxydante. Une autre étude n'a montré aucune corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en polyphénols totaux de l'extrait des fruits de *Berberis vulgaris* [Motalleb *et al*, 2005].

Les plantes médicinales représentent une source naturelle de nouvelles molécules bioactives. La recherche de nouveaux médicaments contre les microorganismes multirésistants à augmenter l'intérêt des scientifiques pour isoler et identifier les substances naturelles antimicrobiennes.

Dans ce travail, nous avons recherché les effets antimicrobiens des extraits bruts et des alcaloïdes totaux de l'écorce des racines de *Berberis vulgaris*.

Les différents extraits ont été testés *in vitro*, par la méthode de diffusion des disques contre plusieurs souches de bactéries et de levures de référence. Les concentrations minimales inhibitrices ont été déterminées pour les souches sensibles aux extraits.

L'extrait hydrométhanolique macéré est le plus actif vis-à-vis des souches bactériennes (CMI entre 0.312 et 2.5 mg/ml). De même, l'extrait aqueux macéré a présenté une bonne activité antibactérienne (CMI entre 1.25 et 5 mg/ml). Kosalec et ses collaborateurs, ont étudiés l'activité antibactérienne des extraits éthanoliques des racines, tiges, et brindilles de *Berberis vulgaris* de deux régions (Skrad et Crni Lug). D'après leurs résultats, l'extrait des racines présente une activité antibactérienne significative contre les bactéries à Gram positif : *Bacillus subtilis* NCTC 8236 (CMI 43.8 mg/ml) et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (CMI 43.8 et 21.9 mg/ml)

Ces résultats sont similaires pour l'extrait éthanolique des racines de *Berberis croatica* des régions de Meduvrhi et Kiza contre *Bacillus subtilis* NCTC 8236 (CMI 87.5 et 43.8 mg/ml) et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (CMI 25 mg/ml), ainsi que *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (CMI 25 mg/ml) [Kosalec *et al*, 2009].

Concernant l'activité antifongique, les différents extraits ont montrés une activité significative contre les trois souches de *Candida albicans* et plus spécifiquement *Candida albicans* ATCC 26790.

L'extrait le plus actif est les alcaloïdes totaux. De même, les extraits bruts aqueux et hydrométhanolique ont eux aussi présentés un bon effet antifongique (CMI 0.312-1.25 mg/ml).

Selon Kosalec et ses collaborateurs, les extraits de *Berberis vulgaris* et *Berberis croatica* n'ont montrés aucune zone d'inhibition contre la levure *Candida albicans* ATCC 10231, même si leur CMI a été déterminé (CMI entre 12.5 et 25 mg/ml) pour les extraits éthanoliques des racines des deux plantes.

Kosalec et ses collaborateurs, suggèrent que berberine, un alcaloïde présent dans *Berberis vulgaris* et *Berberis croatica* est responsable de l'effet antifongique [Kosalec *et al*, 2009]. Ceci est confirmé par l'étude d'Iauk et ses collaborateurs en 2007 qui montrent que la berberine chlorure possède une bonne activité antifongique vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida Krusei* ATCC 6258 et *Candida parapsilosis* ATCC 22019 avec des CMI inférieurs à 128 µg/ml. Ces auteurs indiquent que berberine présente un très bon effet en comparaison avec berbamine et hydrastine, des alcaloïdes présents dans l'extrait des racines de *Berberis aetnensis* [Iauk *et al*, 2007].

D'autres auteurs ont montrés que la combinaison de l'amphotéricine B et la berberine peut réduire approximativement de 75 % la dose de l'amphotéricine B dans le traitement des candidoses chez les souris, impliquant certainement la synergie entre berberine et l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* [Han et Lee, 2005].

L'étude de l'activité bactéricide de berberine montre qu'elle inhibe l'ADN, la synthèse des protéines et l'activité de l'arylamine-*N*-acétyltransférase [Wu *et al*, 2005].

Dans notre étude, nous remarquons que l'activité antimicrobienne est variable, elle dépend de plusieurs paramètres dont le mode d'extraction : sous reflux et macération, dont la dernière a donné de bons résultats.

Le choix du solvant est aussi un facteur très important, puisque les composés chimiques sont extraits selon leur degré de polarité.

Les résultats montrent que les extraits aqueux et hydrométhanoliques sont les plus actifs, ceci est confirmé par l'utilisation le plus souvent du méthanol, éthanol et eau pour les investigations des activités antimicrobiennes [Salie *et al*, 1996 ; Bisignino *et al*, 1999 ; Lourens *et al*, 2004 ; Parekh *et al*, 2005 ; Rojas *et al*, 2006].

L'activité peut dépendre aussi de la souche de microorganisme utilisée ainsi que la partie de la plante étudiée. L'activité antimicrobienne peut être attribuée à une seule famille

ou la combinaison de plusieurs familles chimiques détectées lors de l'étude phytochimique de *Berberis vulgaris*.

Conclusion Générale

Le présent travail a pour objectif, l'étude phytochimique des écorces de racines de *Berberis vulgaris*, ainsi que l'évaluation de ces activités biologiques : antioxydantes, antibactériennes et antifongiques.

Dans un premier temps, l'analyse phytochimique qualitative a mis en évidence la présence des alcaloïdes, des tanins, des stérols et des triterpènes et des composés réducteurs en quantités importantes. Cependant, il y a moins de coumarines, de terpénoïdes, de saponosides et de mucilages dans les extraits.

Les rendements obtenus pour les extraits sous reflux sont supérieurs à ceux obtenus pour les extraits bruts macérés. L'extrait hydrométhanolique a montré le meilleur rendement, tandis que les extraits butanolique et acétate d'éthyle ont présentés des rendements plus faibles.

L'analyse chromatographique des alcaloïdes totaux par chromatographie sur couches minces nous révèle la présence de six taches avec trois taches fluorescentes, dont l'une des taches de fluorescence jaune pourrait représenter la berberine, un alcaloïde isoquinoléinique très répandue dans cette plante.

L'analyse quantitative de l'extrait hydrométhanolique sous reflux, est représentée par le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes révélant une concentration de 10.48 mg GAE/g en polyphénols totaux et 2.05 mg CEQ/g en flavonoïdes.

L'activité antioxydante des écorces de racines de *Berberis vulgaris* a été évaluée par deux techniques : réduction du fer FRAP et le piégeage du radical libre DPPH.

L'extrait hydrométhanolique a montré une activité antioxydante meilleure que les alcaloïdes totaux, avec un IC_{50} de 1.40 mg/ml et une activité antiradicalaire de 89.3 % à la concentration de 4 mg/ml.

La présence non négligeable des polyphénols totaux et flavonoïdes dans l'extrait hydrométhanolique peut suggérer la présence de l'activité antioxydante de la plante.

L'activité antimicrobienne des différents extraits bruts et des alcaloïdes totaux a été évaluée vis-à-vis des souches de bactéries et de levures de références, par la méthode de diffusion sur gélose, et la détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI.

Dans l'activité antibactérienne, l'extrait hydrométhanolique macéré s'est révélé le plus actif vis-à-vis des souches *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Enterococcus faecalis*

ATCC 49452, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, suivi de l'extrait aqueux macéré. Les extraits butanoliques et acétate d'éthyle sont avérés les extraits les moins actifs.

Les extraits de *Berberis vulgaris* ont montré une activité antifongique significative par rapport à l'activité antibactérienne.

Les extraits aqueux et hydrométhanoliques sous reflux et macérés ont présentés une activité antifongique meilleure que les extraits bruts butanoliques et acétate d'éthyle.

Les alcaloïdes totaux présentent une activité antifongique significative vis-à-vis des trois souches de *Candida albicans*. La berberine pourrait être responsable de cette activité.

Les extraits aqueux et hydrométhanolique ont montré la meilleure activité antimicrobienne par rapport aux autres extraits bruts, ceci pourrait indiquer que les molécules bioactives responsables de l'activité sont des composés polaires.

Les extraits obtenus par macération exercent un meilleur effet antimicrobien vis-à-vis des souches testées par rapport aux extraits obtenus par extraction sous reflux. Ceci, nous permet de déduire que la température pourrait influencer l'activité biologique de la plante.

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche des substances et sources naturelles biologiquement actives. Des études complémentaires, précises et approfondies restent nécessaires pour pouvoir confirmer les résultats mis en évidence.

Nos résultats préliminaires montrent que les différents extraits des écorces de racines de *Berberis vulgaris* testés, témoignent des activités antimicrobiennes et antioxydantes *in vitro*.

D'autres études approfondies sont nécessaires et se résument dans les points suivants :

- L'isolement et l'identification des principes actifs responsables des activités antioxydantes et antimicrobiennes par des techniques chromatographiques et spectrales.
- En raison du rôle prépondérant des alcaloïdes de *berberis vulgaris*, il serait intéressant de les isoler et de les caractériser.

- Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne *in vitro* sur des cultures cellulaires de cellules isolées de l'organisme étudié pour confirmer les résultats obtenus.
- Une étude *in vivo* des molécules bioactives isolées serait souhaitable pour déterminer les tissus et organes cibles, et rechercher leurs mécanismes d'action au niveau tissulaire et moléculaire. Ce qui permettrait alors de mettre en évidence le principe actif des extraits de *Berberis vulgaris* et/ou une éventuelle synergie entre les différents composés chimiques.
- Evaluation d'autres activités biologiques, dont l'activité antidiabétique, antitumorale ... et autres.

Références bibliographiques

1. Allali H, Benmehdi H, Dib MA, Tabti B, Ghalem S, Benabadji N. Phytotherapy of Diabetes in West Algeria. *Asi J Chem.* 2008 ; 20 (4) : 2701 – 2710.
2. Arif T, Bhosale J D, Kumar N, Mandal T K, Bendre R S, Lavekar S, Dabur R. Natural products-antifungal agents derived from plants. *J Asian Nat Prod Res.* 2009 ; 11, 7 : 626 – 638.
3. Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. Tea and herbal infusions : Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.* 2005 ; 89 : 27–36.
4. Azzi R et Boumellah O. Contribution à l'étude des effets antidiabétiques des saponosides et des glycosides extraits de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) sur des rats Wistar rendus diabétiques par la streptozotocine et la recherche de ses effets antifongiques sur *Fusarium oxysporum* [Mémoire de DES en Biochimie]. Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaïd Département de Biologie Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de l'Univers et de la Terre ; 2002.
5. Azzi R, Djaziri R, Lahfa F, Sekkal FZ, Benmehdi H, Belkacem N. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. *J Med Plants Res.* 2012 ; 6 (10) : 2041 – 2050.
6. Bahar M, Deng Y, Fletcher JN, Kinghorn AD. Plant-Derived Natural Products in Drug Discovery and Development: An Overview. In : Ikan R. Selected topics in the chemistry of natural products. Singapour : World Scientific Publishing ; 2008. p. 17 – 21.
7. Belkacem N, Djaziri R, El Hacı IA, Lahfa F, Boucherit K. Antihyperglycaemic effect of hydroalcoholic extract from *Punica granatum* L. peels in normal and streptozotocin-induced diabetic rats and its potent α -amylase inhibitory. *Der Pharma Chem.* 2010 ; 2 (6) : 416 – 428.
8. Benariba N, Djaziri R, Zerriouh BH, Boucherit K, Louchami K, Sener A, Malaisse WJ. Antihyperglycemic effect of *Citrullus colocynthis* seed aqueous extracts in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metab Func Res Diab.* 2009 ; 2 : 71 – 76.

9. Benariba N, Djaziri R, Bellakhdar W, Belkacem N, Kadiata M, Malaisse WJ, Sener A. Phytochemical screening and free radical scavenging activity of *Citrullus colocynhtis* seeds extracts. Asian Pac J Trop Biomed. 2012 ; 1 – 5.
10. Beretz A, Cazenave JP. Old and new natural products as the source of modern antithrombotic drugs. Planta Med. 1991 ; 57 (7) : S68 – 72.
11. Berger MM. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. Nutr clin méta. 2006 ; 20 : 48 – 53.
12. Berger MM. Oligoéléments : quoi de neuf ? Swiss Med Forum. 2003; 31 : 720 – 6.
13. Biesalski HK, Böhles H, Esterbauer H, Fürst P, Gey F, Hundsdörfer G, *et al.* Antioxidant vitamins in prevention. Consensus statement. Clin Nutr. 1997 ; 16 : 151 – 5.
14. Bindseil KU, Jakupovic J, Wolf D, *et al.* Pure compound libraries; a new perspective for natural product based drug discovery. Drug Discov. Today. 2001 ; 6 : 840 – 847.
15. Bisignino G, Sanogo R, Marino A, Aquino R, D'angelo V, Germano MP, De Pasquale R, Pizza C. Antimicrobial activities of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents. Lett Appl Microbiol. 1999 ; 30 : 105 – 108.
16. Boberek JM, Stach J, Good L. Genetic evidence for inhibition of bacterial division protein FtsZ by berberine. PLoS One. 2010 ; 5 : e 13745.
17. Borchardt JK. The beginnings of drug therapy: Ancient mesopotamian medicine. Drug News Perspect. 2002 ; 15 : 187 – 192.
18. Bors W, Michel C, Stettmaier K. Antioxidant effects of flavonoids. Biofactors. 1997 ; 6 : 399 – 402.
19. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT Food Sci Technol. 1995 ; 28 : 25 – 30.
20. Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^e éd. France : Tech & Doc – Lavoisier ; 1999.
21. Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery. J Nat Prod. 2004 ; 67 : 2141 – 2153.

22. Cai LY, Shi FX, Gao X. Preliminary phytochemical analysis of *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr. *J Med Plants Res.* 2011 ; 5 (17) : 4059 – 4064.
23. Castón-Osorio JJ, Rivero A, Torre-Cisneros J. Epidemiology of invasive fungal infection. *Int J Antimicrob Agents.* 2008 ; 32 Suppl 2 : S103 – 109.
24. Chang HM et But PPH. *Pharmacology and applications of Chinese Materia Medica.* Singapore : World Scientific Publishing ; 1986.
25. Chen Y, Wang Y, Zhang J, Sun C, Lopez A. Berberine improves glucose homeostasis in streptozotocin-induced diabetic rats in association with multiple factors of insulin resistance. *ISRN Endocrinol.* 2011 ; 519371.
26. Chevallier A. *Encyclopedia of Medicinal Plants.* 2^{ème} éd. Londres : Larousse ; 2001.
27. Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard.* CLSI document M02-A10. 10^{ème} édi. Wayne, PA : Clinical and Laboratory Standards Institute ; 2009.
28. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999 ; 12 (4) 564 – 582.
29. Demain AL et Zhang L. Natural products and drug discovery. In : Zhang L et Demain AL, éditeurs. *Natural Products ; Drug Discovery and Therapeutic Medicine.* New Jersey : Humana Press ; 2005. p. 4 – 11.
30. Dev S. Ancient-modern concordance in Ayurvedic plants : Some examples. *Environ Health Persp.* 1999 ; 107 : 783 – 789.
31. Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, *et al.* Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* 1999 ; 65 (4) : 337 – 53.
32. Drofler HP et Roselt G. *The Dictionary of Healing Plants.* New York : Blandford Press ; 1989.
33. Eddouks M, Ouahidi ML, Farid O, Moufid A, Khalidi A, Lemhadri A. L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothér.* 2007 ; 5 : 194 – 203.
34. Edeoga HO, Okwu DE, Mbaebie BO. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *Afric J Biotech.* 2005 ; 4 : 685 – 688.

35. Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutr Res.* 2004 ; 24 : 851 – 74.
36. Fatehi M, Saleh TM, Fatehi-Hassanabad Z, Farrokhfal K, Jafarzadeh M, Davodi S. A pharmacological study on *Berberis vulgaris* fruit extract. *J Ethnophar.* 2005 ; 102 : 46 – 52.
37. Favier A. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique.* 2003 ; 108 – 115.
38. Flora SJS. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxi Med Cel Long.* 2009 ; 2 : (4) 191 – 206.
39. Frioui A. Contribution à l'étude phytochimique et l'activité antimicrobienne de *Pituranthos scoparius* [Mémoire de Master Biochimie Appliquée]. Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaïd Département de Biologie Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de l'Univers et de la Terre ; 2012.
40. Ghedira K. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothér.* 2005 ; 4 : 162 – 169.
41. Gorval LM et Grishkovets VI. State Nikitskii Botanical Garden, Yalta, Ukraine. *Chem. Nat. Compd. Consultants Bureau, (Eng).* 1999 ; 35(2): 223 – 224.
42. Green RJ. Antioxidant Activity of Peanut Plant Tissues. [Masters Thesis]. USA : North Carolina State University ; 2004.
43. Guignard JL. Biochimie végétale. Paris, France : Masson ; 1996.
44. Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, *et al.* Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol.* 2004 ; 42 : 1519 – 27.
45. Hajzadeh MAR, Rajaei Z, Shafiee S, Alavinejhad A, Samarghandian S, Ahmadi M. Effect of Barberry fruit (*Berberis vulgaris*) on serum glucose and lipids in streptozotocin diabetic rats. *Pharmacol.* 2011 ; 1: 809 – 817.

46. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine, Ed 4. Oxford : Clarendon Press ; 2006.
47. Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys. 1990 ; 280 : 1 – 8.
48. Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiology. 2006 ; 141 : 312 – 322.
49. Hammond GG, Huber JL, Greenlee ML *et al.* Inhibition of IMP-1 metallo-L-lactamase and sensitization of IMP-1-producing bacteria by thioester derivatives. FEMS Microbiol Lett. 1999 ; 179 : 289 – 296.
50. Hamza Chérif I et Chenini FZ. Contribution à l'étude de l'effet antidiabétique de l'extrait de saponosides de *Berberis vulgaris* sur des hépatocytes isolés de rats Wistar [Mémoire DES, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de l'Univers et de la Terre]. Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaïd ; 2006.
51. Han Y et Lee JH. Berberine synergy with amphotericin B against disseminated candidiasis in mice. Biol Pharm Bull. 2005 ; 28: 541 – 544.
52. Hanachi P et Golkho SH. Using HPLC to Determination the Composition and Antioxidant Activity of *Berberis Vulgaris*. Eur J Sci Res. 2009 ; 29 (1) : 47 – 54.
53. Hanachi P, Kua SH, Asmah R, Motalleb G, Fauziah O. Cytotoxic effect of *Berberis vulgaris* fruit extract on the proliferation of human liver cancer line (HepG2) and its antioxidant properties. Int. J. Cancer Res. 2006 ; 2 : 1 – 9.
54. Hanson JR. Natural Products : The secondary metabolites. Royaume-Uni : Royal Society of Chemistry; 2003.
55. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol Therap. 2002 ; 96 : 67 - 202.
56. Hennebelle T, Sarpaz S, Bailleul F. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Phytothér. 2004 ; 1 : 3 – 6.
57. Houghton PJ. Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. Phytother Res. 2000 ; 14 (6) : 419 – 423.

58. Huang KC. The pharmacology of Chinese herbs. Boca Raton, FL: CRC Press ; 1999.
59. Hui H, Tang G, Liang V, Go W. Hypoglycemic herbs and their action mechanisms. Chin Med. 2009 ; 4 : 11.
60. Iauk L, Costanzo R, Caccamo F *et al.* Activity of *Berberis aetnensis* root extracts on *Candida* strains. Fitoter. 2007 ; 78 : 159 – 161.
61. Iizuka N, Miyamoto K, Okita K, Tangoku A, Hayashi H, Yosino S, *et al.* Inhibitory effect of *Coptidis Rhizoma* and berberine on the proliferation of human esophageal cancer cell lines. Cancer Lett. 2000 ; 148 : 19 – 25.
62. Imanshahidi M et Hosseinzadeh H. Pharmacological and Therapeutic Effects of *Berberis vulgaris* and its Active Constituent, Berberine. Phytother. Res. 2008 ; 22 : 999 – 1012.
63. Ivanovska N et Philipov S. Study on the anti-inflammatory action of *Berberis vulgaris* root extract, alkaloid fractions and pure alkaloids. Int J Immunopharmac. 1996 ; 18 (10) : 553 – 561.
64. Iwu MM et Jacqueline CW, éditeurs. Ethnomedicine and Drug Discovery. 1st ed. United Kingdom : Advances in Phytomedicine Series ; 2002.
65. Jones WP, Chin YW, Kinghorn AD. The role of pharmacognosy in modern medicine and pharmacy. Curr Drug Targets. 2006 ; 7: 247 – 264.
66. Kapoor LD. CRC handbook of ayurvedic medicinal plants. Boca Raton, FL : CRC Press ; 1990.
67. Karumi Y, Onyeyili PA, Ogugb uaja VO. Identification of active principales of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. J Med Scien. 2004 ; 4 : 179 – 182.
68. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Crit Rev Toxicol. 1993; 23 (1) : 21 – 48.
69. Khamidov I, Telezhenetskaya MV, Karimov A. Investigations of the alkaloids of *Berberis vulgaris*. Chem Nat Comp. 1995 ; 31 (3) : 503 – 504.
70. Khan AM, Qureshi RA, Ullah F, Gilani SA, Nosheen A, Sahreen S, *et al.* Phytochemical analysis of selected medicinal plants of Margalla Hills and surroundings. J Med Plants Res. 2011 ; 5 (25) : 6017 – 6023.

71. Khan ZU, Mokaddas EM. Advances in Therapy of Invasive Mycoses. *Kuw Med J.* 2007 ; 39 (2) : 98 – 106.
72. Khosrokhavar R, Ahmadiani A, Shamsa F. Antihistaminic and Anticholinergic Activity of Methanolic Extract of Barberry Fruit (*Berberis vulgaris*) in the Guinea-Pig Ileum. *J Med Plants.* 2010 ; 9 (35) : 99 – 105.
73. Kim JB, Lee KM, Ko E, Han W, Lee JE, Shin I, *et al.* Berberine inhibits growth of the breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Planta Med.* 2008 ; 74 : 39 – 42.
74. Kinghorn AD, Balandrin MF, éditeurs. Human medicinal agents from plants, ACS Symposium Series. No. 534, Washington, DC : American Chemical Society Books ; 1993.
75. Kinghorn AD. Pharmacognosy in the 21st century. *J Pharm Pharmacol.* 2001 ; 53 : 135 – 148.
76. Klepser M. The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. *J Crit Care.* 2011 ; 26 (225) : 225 – 10.
77. Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2005 ; 4 : 206 – 220.
78. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria : *Microbiol.* 2010 ; 8 : 423 – 435.
79. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicolo Pathol.* 2002 ; 30 : 620 – 650.
80. Kosalec I, Gregurek B, Kremer D, Zovko M, Sanković K, Karlović K. Croatian barberry (*Berberis croatica* Horvat): a new source of berberine – analysis and antimicrobial activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2009 ; 25 : 145 – 150.
81. Kulkarni SK, Dhir A. Berberine : a plant alkaloid with therapeutic potential for central nervous system disorders. *Phytother Res.* 2010; 24 : 317 – 24.
82. Lehucher-Michel MP, Lesgards JF, Delubac O *et al.* Stress oxydant et pathologies humaines. *Press Med.* 2001 ; 30 : 1076 – 1081.

83. Lin CC, Yang JS, Chen JT, Fan S, Yu FS, Yang JL, *et al.* Berberine induces apoptosis in human HSC-3 oral cancer cells via simultaneous activation of the death receptor-mediated and mitochondrial pathway. *Anticancer Res.* 2007 ; 27 : 3371 – 8.
84. Lourens ACU, Reddy D, Baser KHC, Viljoen AM, Van Vuuren SF. *In vitro* biological activity and essential oil composition of four indigenous South African *Helichrysum* species. *J Ethnopharmacol.* 2004 ; 9 : 253 – 258.
85. Macheix J-J, Fleuriet A, Jay-Allemand C. Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Suisse : Lausanne ; Presses polytechniques et universitaires Romandes ; 2005.
86. Majob F, Kamalinejab M, Ghaderi N, Vahidipour HR. Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranian J Pharma Res.* 2003 ; 77 – 82.
87. Makkar H, Siddhuraju P, Becker K. Plant secondary metabolites. New Jersey : Humana Press ; 2007.
88. Mc Neil MM, Nash SL, Hajjeh RA, Phelan MA, Conn LA, Plikaytis BD, *et al.* Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980 – 1997. *Clin Infect Dis.* 2001 ; 33 : 641 – 7.
89. Meeran SM, Katiyar S, Katiyar SK. Berberine-induced apoptosis in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species generation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008 ; 229 : 33 – 43.
90. Meliani N, Dib MEA, Allali H, Tabti B. Hypoglycaemic effect of *Berberis vulgaris* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Asi Pac J Trop Biomed.* 2011 ; 468 – 471.
91. Meliani N. Etude de l'activité hypoglycémiante de *Berberis vulgaris* [Mémoire de Magister]. Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaïd Département de Chimie Faculté des Sciences ; 2003.
92. Merah L et Boukenadel Y. Contribution à la recherche des effets antidiabétiques des alcaloïdes extraits d'écorce de *Berberis vulgaris* L (Ghriss) sur des rats Wistar rendus diabétiques par la streptozotocine [Mémoire DES, Biochimie]. Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaïd Département de Biologie Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de l'Univers et de la Terre ; 2007.

93. Modolo LV, Reichert AI, Dixon RA. Introduction to the Different Classes of Biosynthetic Enzymes. In : Osbourn AE et Lanzotti V, éditeurs. Plant-derived Natural Products ; Synthesis, Function, and Application. London New York : Springer ; 2009. p. 143 – 150.
94. Montoro P, Braca A, Pizza C, *et al.* Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. Food Chem. 2005 ; 92 : 349 – 55.
95. Mortazaeinezhad F et Safavi K. Investigation of epicatechin in barberry fruits. International Conference on Life Science and Technology. Singapour ; 2011. p. 156 – 158.
96. Motalleb G, Hanachi P, Kua SH, Fauziah, O, Asmah R. Evaluation of phenolic content and total antioxidant activity in *Berberis vulgaris* fruit extract. J Biol Sci. 2005 ; 5 : 648 – 653.
97. N'Guessan K, Kadja B, Zirihi G, Traoré D, Aké-Assi L. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). Sci Nat. 2009 ; 6 (1) : 1 – 15.
98. National Committee for Clinical and Laboratory Standards Institute NCCLS. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline. NCCLS document M44-A. Wayne, PA ; 2004.
99. Ncube NS, Afolayan AJ, Okoh AI. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin : current methods and future trends. Afri J Biotech. 2008; 7 (12) : 1797 – 1806.
100. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981 – 2002. J Nat Prod. 2003; 66 : 1022 – 37.
101. O'Kennedy R, Thoms R D, éditeurs. Coumarins : biology, applications and mode of action. New York, NY : John Wiley & Sons, Inc ; 1997.
102. Oloyede OI. Chemical profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*. Pak J Nutr. 2005 ; 4 : 379 – 381.
103. Ong KC, Khoo HE. Biological effects of myricetin. Gen Pharmacol. 1997 ; 29 (2) : 121 – 6.

104. Ong KC, Khoo HE. Links Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sci.* 2000 ; 67 (14) : 1695 – 705.
105. Osbourn AE et Lanzotti V, éditeurs. *Plant-derived Natural Products ; Synthesis, Function, and Application.* London New York : Springer ; 2009.
106. Pan L, Carcache EJ de Blanco et Kinghorn AD. *Plant-Derived Natural Products as Leads for Drug Discovery.* In : Osbourn AE et Lanzotti V, éditeurs. *Plant-derived Natural Products ; Synthesis, Function, and Application.* London New York : Springer ; 2009. p. 547 – 551.
107. Pandey KB et Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2009 ; 2 (5) : 270 – 278.
108. Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, *et al.* A prospective observational study of candidemia : epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis.* 2003 ; 37 : 634 – 43.
109. Parekh J, Jadeja D, Chanda S. Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity. *Turk J Biol.* 2005 ; 29 : 203 – 210.
110. Paterson I, Anderson EA. The renaissance of natural products as drug candidates. *Science.* 2005 ; 310 : 451 – 453.
111. Payne DJ, Gwynn MN *et al.* Drugs for bad bugs : confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2007 ; 6 : 29 – 40.
112. Payne DJ, Wallis NG, Gentry DR *et al.* The impact of genomics on novel antibacterial targets. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2000 ; 3 : 177 – 190.
113. Peng PL, Hsieh YS, Wang CJ, Hsu JL, Chou FP. Inhibitory effect of berberine on the invasion of human lung cancer cells via decreased productions of urokinase-plasminogen activator and matrix metalloproteinase-2. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006 ; 214 : 8 – 15.
114. Petersen F et Amstutz R, éditeurs. *Natural Compounds as Drugs vol. 1 ; Progress in Drug Research.* Vol. 65. Suisse : Birkhäuser ; 2008.

115. Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin Infect Dis*. 2006; 43 (Suppl 1) : S3 – S14.
116. Quezel P et Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. T 1. Paris : Centre national de la recherche scientifique ; 1962.
117. Remppis A, Bea F, Greten HJ, Buttler A, Wang H, Zhou Q, *et al.* *Rhizoma coptidis* inhibits LPS-induced MCP-1/CCL2 production in murine macrophages via an AP-1 and NFkappaB-dependent pathway. *Mediators Inflamm*. 2010 ; 2010 : 194896.
118. Rios JL. Ethnomedicinal Plants: Progress and the Future of Drug Development. In : Rai M, Acharya D, Ríos JL. *Ethnomedicinal Plants Revitalization of Traditional Knowledge of Herbs*. Etats-Unis : Science Publishers ; 2011. p. 1 – 10.
119. Rojas JJ, Ochoa VJ, Ocampo SA, Monoz JF. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine : a possible alternative in treatment of nonnosocomial infections. *BMC Complement. Alternat Med*. 2006. 6 : 2.
120. Saeed Arayne M, Sultana N, Bahadur SS. The Berberis story : *Berberis vulgaris* in therapeutics. *Pak J Pharm Sci*. 2007 ; 20 (1) : 83 - 92.
121. Saied S et begum S. Phytochemical studies of *Berberis vulgaris* L. *Chemistry of Natural compounds*. 2004 ; 40 : 137-140.
122. Salie F, Eagles PFK, Lens HMJ. Preliminary antimicrobial screening of four South African *Asteraceae* species. *J Ethnopharmacol*. 1996 ; 52 (1) : 27 – 33.
123. Samosorn S, Tanwirat B, Muhamad N, Casadei G, Tomkiewicz D, Lewis K, *et al.* Antibacterial activity of berberine-NorA pump inhibitor hybrids with a methylene ether linking group. *Bioorg Med Chem*. 2009 ; 17 : 3866 – 72.
124. Schauenberg P, Paris F. *Guide des plantes médicinales. Analyse, description et utilisation de 400 plantes*. 2e ed. Ed Delachaux et Niestlé ; 2005.
125. Shih CM, Lin H, Liang YC, *et al.* Concentration-dependent differential effects of quercetin on rat aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*. 2004 ; 496 (1 – 3) : 41 – 8.

126. Sies H, éditeur. Antioxidant in disease mechanisms and therapy, Adv Pharm. New York : Academic Press ; 1996.
127. Sies H. Strategies of antioxidant defence. Eur. J. Biochem. 1993 ; 215 : 213 – 219.
128. Singh SB. Natural Products in the 21st Century. In : Dougherty TJ, Pucci MJ, éditeurs. Antibiotic Discovery and Development. New York : Springer ; 2012. p. 821 – 841.
129. Springob K et Kutchan TM. Introduction to the Different Classes of Natural Products. In : Osbourn AE et Lanzotti V, éditeurs. Plant-derived Natural Products ; Synthesis, Function, and Application. London New York : Springer ; 2009. p. 4 – 17.
130. Tan YL, Goh D, Ong ES. Investigation of differentially expressed proteins due to the inhibitory effects of berberine in human liver cancer cell line HepG2. Mol Biosyst. 2006 ; 2 : 250 – 8.
131. Tillhon M, Guamán Ortiz LM, Lombardi P, Scovassi AI. Berberine : New perspectives for old remedies. Biochem Pharmacol. 2012 ; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.07.018>.
132. Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, *et al.* Secular trend of hospital acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989 – 1999. Clin Infect Dis. 2002 ; 35 : 627 – 30.
133. Vermerris W, Nicholson R. Isolation and Identification of Phenolic Compounds, Phenolic Compound Biochemistry. Dordrecht : Springer ; 2006.
134. Vuddanda PR, Chakraborty S, Singh S. Berberine : a potential phytochemical with multispectrum therapeutic activities. Expert Opin Invest Drugs. 2010 ; 19 : 1297 – 307.
135. Wang L, Liu L, Shi Y, Cao H, Chaturvedi R, Calcutt MW, *et al.* Berberine induces caspase-independent cell death in colon tumor cells through activation of apoptosis-inducing factor. PLoS One 2012; 7 (5) : e36418.
136. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, *et al.* Nosocomial bloodstream infections in US hospitals : analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis. 2004 ; 39 : 309 – 17.

137. Wu K, Yang Q, Mu Y, Zhou L, Liu Y, Zhou Q, *et al.* Berberine inhibits the proliferation of colon cancer cells by inactivating Wnt/beta-catenin signaling. *Int J Oncol.* 2012 ; 41:292–8, doi:10.3892/ijo.2012.1423.
138. Wu X, Li Q, Xin H, Yu A, Zhong M. Effects of berberine on the blood concentration of cyclosporin A in renal transplanted recipients : clinical and pharmacokinetic study. *Eur J Clin Pharmacol.* 2005 ; 61 : 567 – 572.
139. Xia X, Yan J, Shen Y, Tang K, Yin J, Zhang Y, *et al.* Berberine improves glucose metabolism in diabetic rats by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *PLoS One.* 2011 ; 6 : e16556.
140. Yang J, Yin J, Gao H, Xu L, Wang Y, Xu L, *et al.* Berberine improves insulin sensitivity by inhibiting fat store and adjusting adipokines profile in human preadipocytes and metabolic syndrome patients. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012 ; 363845.
141. Yen GC et Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem.* 1995 ; 43 : 27 – 37. In : Zovko Cončić M, Kremer D, Karlović K, Kosalec I. Evaluation of antioxidant activities and phenolic content of *Berberis vulgaris* L. and *Berberis croatica* Horvat. *Food Chem Toxicol.* 2010 ; 48 : 2176 – 2180.
142. Yin J, Xing H, Ye J. Efficacy of berberine in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metab.* 2008 ; 57 : 712 – 7.
143. Yin J, Ye J, Ji W. Effects and mechanisms of berberine in diabetes treatment. *Acta Phar Sinica B.* 2012 ; 2 (4) : 327 – 334.
144. Yin J, Zhang H, Ye J. Traditional chinese medicine in treatment of metabolic syndrome. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2008 ; 8 : 99 – 111.
145. Yoshikawa M, Shimoda H, Uemura T *et al.* Alcohol absorption inhibitors from Bay leaf (*Laurus nobilis*) : Structure-Requirements of Sesquiterpenes for the activity. *Bioorg Med Chem.* 2000 ; 8 : 2071 – 2077.
146. Youdim KA, McDonald J, Kalt W, *et al.* Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults (small star, filled). *J Nutr Biochem.* 2002 ; 13 (5) : 282 – 8.

147. Youn MJ, So HS, Cho HJ, Kim HJ, Kim Y, Lee JH, *et al.* Berberine, a natural product, combined with cisplatin enhanced apoptosis through a mitochondria/ caspase-mediated pathway in HeLa cells. *Biol Pharm Bull.* 2008 ; 31 : 789 – 95.
148. Yusupov MM, Karimov A, Lutfullin KL. Alkaloids of *Berberis vulgaris*. XII. *Chem Nat Comp.* 1990 ; 26 (1) : 105 – 106.
149. Zhang L et Demain AL, éditeurs. *Natural Products ; Drug Discovery and Therapeutic Medicine.* New Jersey : Humana Press ; 2005.
150. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 1999 ; 64 : 555 – 559. In : Ardestani A, Yazdanparast R. Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on *in vitro* protein glycooxidation. *Food Chem Toxicol.* 2007 ; 45 : 2402 – 2411.
151. Ziegler J, Facchini PJ. Alkaloid Biosynthesis : Metabolism and Trafficking. *Annu Rev Plant Biol.* 2008 ; 59 : 735 – 769.
152. Zovko Cončić M, Kremer D, Karlović K, Kosalec I. Evaluation of antioxidant activities and phenolic content of *Berberis vulgaris* L. and *Berberis croatica* Horvat. *Food Chem Toxicol.* 2010 ; 48 : 2176 – 2180.

Annexes

Annexe 1 : Réactifs et réactions de caractérisation des tests phytochimiques

- Réactif de Wagner : Dans 75 ml d'eau distillée dissoudre 2g d'iodure de potassium KI et 1.27g diiode I₂, le volume obtenu est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée.

- Réactif de Mayer : Dissoudre 1.358 g de chlorure de mercure HgCl₂ dans 60 ml d'eau distillée puis 5g d'iodure de potassium KI dans 10 ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100 ml.

- Alcool chlorhydrique : Mélange à volumes égaux d'alcool à 95° et d'acide chlorhydrique concentré.

- Liqueur de Fehling :
 - ✓ Fehling A : dissoudre 3.5 g de sulfate de cuivre pentahydraté CuSO₄.5H₂O dans 50 ml d'eau distillée.
 - ✓ Fehling B : dissoudre 6.5 g d'ammoniaque NH₄OH, 17.3 g de tartrate de sodium et de potassium dans 35 ml d'eau distillé puis compléter le volume à 50 ml.

Les composés réducteurs donnent avec le réactif de Fehling un précipité rouge brique.

Annexe 2 : Milieux de culture

Bouillon Nutritif (BN, Fluka, BioChemika)

Formule en g/l

Extrait de viande	3,0
Peptone	5,0
Chlorure de sodium	5,0
Eau Distillée	qsp 1L

pH= 7,2 ($\pm 0,2$) à 37°C

Suspendre 13g de la poudre dans un litre d'eau distillée, ensuite stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

Gélose Nutritive (GN, Fluka, BioChemika)

Formule en g/l

Extrait de viande de boeuf	1,0
Extrait de levure	2,0
Peptone	5,0
Chlorure de sodium	5,0
Agar	15,0
Eau Distillée	qsp 1L

pH = 7,2 ($\pm 0,2$) à 37°C

Suspendre 28 g de la poudre dans un litre d'eau distillée ensuite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

 Gélose Mueller Hinton (Fluka BioChemika)

Formule en g/l

Infusion de viande de boeuf	4,0
Hydrolysate de caseine	17,5
Amidon	1,5
Agar	15,0
Eau Distillée	qsp 1L

pH= 7,4 ($\pm 0,2$) à 37°C.

Suspendre 38g de la poudre dans un litre d'eau distillée ensuite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.


 Bouillon Mueller Hinton (Fluka BioChemika)

Formule en g/l

Hydrolysate de caéine	17,5
Infusion de viande de bœuf	2,0
Amidon	1,5
Eau Distillée	qsp 1L

pH= 7,4 ($\pm 0,2$) à 37°C.

Suspendre 23 g de la poudre dans un litre d'eau distillée, ensuite stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

 Bouillon Sabouraud

Formule en g/l

Peptone pepsique	10
Glucose	20
Eau Distillée	qsp 1L

pH= 5,8 ($\pm 0,2$) à 37°C.

Suspendre 30 g de la poudre dans un litre d'eau distillée, chauffer si c'est nécessaire pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

 Gélose Sabouraud

Formule en g/l

Peptone pepsique	10
Glucose	20
Agar	15
Eau Distillée	qsp 1L

pH=5,8 ($\pm 0,2$) à 37°C.

Suspendre 45 g de la poudre dans un litre d'eau distillée ensuite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

Annexe 3 : Rendements obtenus avec les différents solvants

Tableau 17 : Rendements obtenus pour les extraits bruts sous reflux de *Berberis vulgaris*

Extraits	Sous reflux			
	Aqueux	Hydrométhanolique	Butanolique	Acétate d'éthyle
Rendements	7.69	8.54	1.93	0.85
%				

Tableau 18 : Rendements obtenus pour les extraits bruts macérés de *Berberis vulgaris*

Extraits	Macérés			
	Aqueux	Hydrométhanolique	Butanolique	Acétate d'éthyle
Rendements	14.91	16.2	2.92	1.24
%				

Annexe 4 : Résultats de l'activité antioxydante

Tableau 19 : Densités optiques obtenues pour l'extrait hydrométhanolique de *Berberis vulgaris* testé par la méthode FRAP

Concentrations de l'extrait mg/ml	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Densités optiques	0,121	0,242	0,248	0,339	0,532	0,755	0,955	1,037
	0,128	0,191	0,228	0,392	0,585	0,799	1,06	0,959
	0,107	0,145	0,241	0,352	0,822	0,865	0,835	0,87
Moyenne	0,119	0,193	0,239	0,361	0,646	0,806	0,95	0,955

Tableau 20 : Densités optiques obtenues pour les alcaloïdes totaux de *Berberis vulgaris* testés par la méthode FRAP

Concentrations de l'extrait mg/ml	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Densités optiques	0,0327	0,0788	0,1065	0,1067	0,0531	0,0724	0,1953	0,065
	0,0636	0,0634	0,0332	0,0455	0,0685	0,0868	0,1061	0,461
	0,046	0,0086	0,0127	0,0017	0,0609	0,0266	0,1298	0,0012
Moyenne	0,047	0,050	0,051	0,051	0,061	0,062	0,144	0,176

Tableau 21 : Densités optiques obtenues pour l'acide ascorbique testé par la méthode FRAP

Concentrations de l'extrait mg/ml	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Densités optiques	0,5793	0,7202	1,0496	2,0451	2,5786	2,5989	2,849	2,934
	0,6152	0,75	0,9868	2,1169	2,5358	2,8608	2,6957	2,8233
	0,6014	0,7287	1,0611	2,2409	2,7651	2,7454	2,7781	2,8042
Moyenne	0,599	0,733	1,033	2,134	2,627	2,735	2,774	2,854

Tableau 22 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydrométhanolique

Concentrations de l'extrait mg/ml	0.25	0.05	1	1.5	2	2.5	3	4
Densités optiques	0,487	0,437	0,354	0,3	0,185	0,127	0,085	0,064
	0,501	0,451	0,358	0,28	0,186	0,151	0,088	0,071
	0,501	0,45	0,374	0,24	0,19	0,199	0,096	0,063
Moyenne	0,496	0,446	0,362	0,273	0,187	0,159	0,090	0,066
Pourcentages d'inhibition %	19,34	27,47	41,13	55,6	69,59	74,14	85,52	89,26

Tableau 23 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations des alcaloïdes totaux

Concentrations de l'extrait mg/ml	0.25	0.05	1	1.5	2	2.5	3	4
Densités optiques	0,093	0,086	0,075	0,076	0,061	0,04	0,046	0,0116
	0,098	0,093	0,096	0,071	0,063	0,086	0,051	0,023
			0,079		0,059	0,043	0,064	0,064
Moyenne	0,096	0,090	0,083	0,074	0,061	0,056	0,054	0,033
Pourcentages d'inhibition %	8,57	14,28	20,95	29,52	41,9	46,66	48,57	68,57

Tableau 24 : Activité antiradicalaire de l'extrait hydrométhanolique de *Berberis vulgaris*

Concentrations de l'extrait mg/ml	0.25	0.05	1	1.5	2	2.5	3	4
Activité antiradicalaire %	19,4	27,5	41,2	55,7	69,6	74,2	85,4	89,3

Tableau 25 : Activité antiradicalaire des alcaloïdes totaux de *Berberis vulgaris*

Concentrations de l'extrait mg/ml	0.25	0.05	1	1.5	2	2.5	3	4
Activité antiradicalaire %	8,6	14,3	21	29,6	42	46,7	48,6	68,6

الملخص

المواد الطبيعية المستخلصة من النباتات لها مصالح متعددة لاستغلالها في التكنولوجيا الحيوية باستعمالها في المواد الغذائية، مستحضرات التجميل و المستحضرات الصيدلانية. تتضمن هذه المواد نسبة كبيرة من المركبات الثانوية التي يتضح استعمالها في العديد من المجالات ومنها العلاج. في هذا السياق، نقوم بالتحقيق بالتأثيرات البيولوجية للغريس *Berberis vulgaris*، وهو نبات يستخدم في العالم، وفي الجزائر، ويتم استخدامه في منطقة تلمسان خاصة لعلاج داء السكري. الفحص الكيميائي النباتي النوعي الذي أجري على لحاء جذر الغريس أظهرت وجود القلويدات، العفص، الستيرول، التربينات الثلاثية و السكريات المختزلة بكميات كبيرة، كما كشفت وجود الكومارين، التربينويد، الصابونين و المواد المخاطية بكمية أقل. و يتبع الكشف عن هذه المجموعات الكيميائية استخلاص لحاء جذر الغريس مع مذيبات متزايدة الأقطاب واستخراج القلويدات الكلية. تم تحليل مستخلص القلويدات بطيقة ريفية كروماتوغرافية، وكشف عن وجود ستة مركبات. كما تم التحليل الكمي للبوليفينول و الفلافونويد لمستخلص الهيدروميثانول، مما يدل على محتوى 48.10 ملغ معادل حمض الغاليك/غ من البوليفينول و 2.05 ملغ معادل الكاتشين/غ من الفلافونويد. و من أجل دراسة النشاطات البيولوجية، تم اختبار المستخلصات الخامة و القلويدات على مجموع من السلالات المرجعية للبكتيريا و الخميرة. و ذلك باستخدام تقنية الانتشار على الأغار و تحديد تركيزات الحد الأدنى المثبطة. قدم المستخلص الهيدروميثانولي أفضل نشاط مضاد للبكتيريا بأقطار تثبيط 12.5 حتى 21 مم لبعض السلالات. و أظهرت مستخلصات الغريس و تحديدا القلويدات الكلية نشاط مضاد قوي على الخميرة بأقطار تثبيط 19 إلى 29 مم. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص الهيدروميثانولي و القلويدات الكلية للغريس بطريقتين: إرجاع الحديد و تثبيط الجذر الحر. أظهرت النتائج نشاط عالي للمستخلص الهيدروميثانولي مقارنة بالقلويدات الكلية. مع 1.40 ملغ/مل و نشاط جذري مضاد ب 89.3 % عند التركيز 4 ملغ/مل. النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة توضح ثراء الغريس بالمواد الكيميائية التي قد تمثل مصدرا جديدا من الجزيئات البيولوجية النشطة المحتملة في العلاج.

الكلمات المفتاحية: *Berberis vulgaris*، المستخلصات الخامة القلويدات الكلية. النشاط المثبط للبكتيريا، النشاط المثبط للفطريات، النشاط المضاد للأكسدة.

Résumé

Les substances naturelles issues des végétaux présentent des intérêts multiples mis à profit dans la biotechnologie tant dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique. Parmi ces composés on retrouve une grande partie des métabolites secondaires qui se sont illustrés dans beaucoup de domaines et même en thérapie. Dans ce contexte, nous avons recherché les effets biologiques de *berberis vulgaris*, une plante utilisée dans le monde, en Algérie, et elle est particulièrement utilisée dans la région de Tlemcen pour traiter le diabète sucré.

L'examen phytochimique qualitatif réalisé sur les écorces de racines de *Berberis vulgaris* a montré la présence des alcaloïdes, des tanins, des stérols, des triterpènes et des composés réducteurs en quantité importante, il a en outre révélé des quantités plus faibles de coumarines, de terpénoïdes, de saponosides et de mucilages.

La détection de ces familles chimiques est suivie de l'extraction des écorces de racines de *Berberis vulgaris* par des solvants de polarité croissante et une extraction des alcaloïdes totaux. L'extrait des alcaloïdes a été analysé par chromatographie sur couche mince, révélant la présence de 6 tâches. Une analyse quantitative des polyphénols et des flavonoïdes de l'extrait hydrométhanolique sous reflux est réalisée, montrant une teneur de 10.48 mg GAE/g en polyphénols totaux et 2.05 mg CEQ/g en flavonoïdes.

Afin de pouvoir exploiter une éventuelle activité thérapeutique, des extraits bruts sous reflux et macérés, ainsi que l'extrait des alcaloïdes totaux ont été testés pour leur pouvoir antimicrobien vis-à-vis de souches de bactéries et de levures de référence, en utilisant la technique de diffusion sur gélose et la détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI. L'extrait hydrométhanolique macéré a présenté la meilleure activité antibactérienne avec des diamètres d'inhibition de 12.5 à 21 mm pour certaines souches. Les extraits de *Berberis vulgaris* et plus spécifiquement les alcaloïdes totaux, ont montré une forte activité antifongique vis-à-vis des levures de *Candida albicans* avec des zones d'inhibition de 19 à 29 mm.

L'activité antioxydante des extraits hydrométhanolique sous reflux et alcaloïdes totaux a été évaluée par deux méthodes : la réduction du fer et le piégeage du radical libre DPPH. Les résultats obtenus ont montré une activité élevée de l'extrait hydrométhanolique par rapport aux alcaloïdes totaux, avec un IC_{50} de 1.40 mg/ml et une activité antiradicalaire de 89.3 % à la concentration de 4 mg/ml.

Les résultats obtenus dans cette étude, montre la richesse de *Berberis vulgaris* en substances chimiques et qui pourraient représenter une nouvelle source potentielle de molécules bioactives en thérapeutique.

Mots-clés : *Berberis vulgaris*, extraits bruts, alcaloïdes totaux, activité antimicrobienne, activité antioxydante.

Abstract

Natural substances from plants have multiple interests exploited in the biotechnology industries both in food, cosmetic and pharmaceutical. These compounds include a large proportion of secondary metabolites which are illustrated in many areas and even in therapy. In this context, we investigated the biological effects of *Berberis vulgaris*, a plant used in the world, in Algeria, and it is particularly used in the Tlemcen region to treat diabetes mellitus.

The qualitative phytochemical examination performed on the root bark of *Berberis vulgaris* showed the presence of alkaloids, tannins, sterols, triterpenes and reducing compounds in large quantities, it also revealed lower amounts of coumarins, terpenoids, saponins and mucilage.

The detection of these chemical classes is followed by extraction of root bark of *Berberis vulgaris* using solvents with increasing polarity and extraction of total alkaloids. The alkaloid extract was analyzed by thin layer chromatography, revealing the presence of six tasks. A quantitative analysis of polyphenols and flavonoids is performed on hydromethanol extract under reflux, showing a content of 10.48 mg GAE / g of total polyphenols and 2.05 mg CEQ / g of flavonoids.

In order to exploit a possible therapeutic activity, crude under reflux and macerated extracts and total alkaloids were tested for their antimicrobial potency on different reference strains of bacteria and yeasts, using the agar diffusion technique and the determination of minimum inhibitory concentration MIC. The hydromethanolic macerated extract had the best antibacterial activity with inhibition diameters from 12.5 to 21 mm for some strains. Extracts of *Berberis vulgaris* and more specifically the total alkaloids showed a strong antifungal activity on *Candida albicans* yeasts with zones of inhibition of 19 to 29 mm.

The antioxidant activity of hydromethanolic extracts under reflux and total alkaloids was evaluated by two methods: reducing power and DPPH free radical scavenging. The results showed a high activity of methanolic extract than the total alkaloids, with an IC_{50} of 1.40 mg / ml and antiradical activity of 89.3% at a concentration of 4 mg / ml.

The results obtained in this study show the richness of *Berberis vulgaris* with chemical substances and may represent a new potential source of bioactive compounds in therapy.

Keywords: *Berberis vulgaris*, crude extracts, total alkaloids, antimicrobial activity, antioxidant activity.