

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة عمّار تليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
En vue de l'obtention du diplôme Master LMD

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Option : Biochimie des produits naturels

Présenté par

BELMECHERI Nassima Hiba

THEME

**Activité antimicrobienne des extraits phénoliques de trois plantes
médicinales de l'Atlas Algérien**

Membres de jury :

Président	Mr YOUSFI Mohamed	Professeur
Examineur	Melle AMEUR Djamila	MAA
Encadreur	Mr BOUBRIMA Youcef	MAA
Co-encadreur	Mr BERRAMDANE Taib	MAA

Année Universitaire 2016/2017

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

À ma cher Maman « Hadja Aicha » qui m'a toujours soutenue et aidée tout le long de ce travail et tous les sacrifices fournis pour m'avoir éduqué dignement et assurer mon éducation dans le droit chemin et les meilleures conditions. « Rabi yechafihia »

À ma chère famille « Belmecheri »

À ma centenaire grand-mère Hadja Zohra que DIEU la préserve.

À ma petite famille Khiera, frères, sœurs et petits enfants

À mes tantes et oncles en tête Hadja Fatna.

À mon futur mari et sa famille

À mes chères amies Salima, Saida et Hadda

À la mémoire de mon grand-père, père, mes oncles, et ma chère amie Manal Ouali « Allah yerhamhoum »

À tous ceux qui ont cru en moi

Remerciement

Louange au tout puissant Miséricordieux de m'avoir donné la force, la volonté, la patience de reprendre mes études et accomplir cet œuvre avec courage. Après onze années d'interruption avec l'université avec l'aide du docteur Boubrima Youcef.

J'adresse mes sincères remerciements à Mr. Boubrima Youcef de sa disponibilité, de son assistance, de ses conseils et à la confiance qu'il m'a accordé et pour son soutien tout au long de la réalisation de ce travail, et aussi de m'avoir encadré, dirigé et orienté vers le bon chemin de ce travail avec une grande rigueur scientifique, encore une fois je lui suis très reconnaissante et le remercie tout en le priant d'accepter l'expression de ma sincère gratitude.

Je tiens à remercier monsieur Berremdane Tayeb d'avoir accepté de diriger ce travail et de m'avoir toujours soutenue et avoir été présent, de m'avoir toujours orienté vers le bon chemin tout le long de ce travail.

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude au Professeur Yousfi Mohamed, directeur du laboratoire des sciences fondamentales pour l'aide matérielle (produits et consommable), pour ses conseils et encouragement m'ont permis de surmonter les difficultés rencontrées au cours de la réalisation de mon œuvre.

Je remercie les membres du jury : Pr. Yousfi Mohamed, et Melle. Amer Djamilia d'avoir bien voulu accepter d'examiner et de juger ce travail.

J'exprime mes plus vifs remerciements au recteur de l'université de Laghouat Pr. Ben Bartal Djamel et à Monsieur le chef de département de biologie Dr Chaïbi R, pour nous avoir aidé et facilité tout ce qui est administratif.

Mes remerciements les plus sincères au responsable des laboratoires du Département de Biologie : Mr. Hadjoudja Mustapha, ainsi qu'aux ingénieurs de laboratoires.

Mes remerciements vont aussi aux : Melle. Amer Djamilia, Mr. Berremdane Tayeb, Mr. Harath M, Jokhedom K, et Mr. Gozi pour leurs précieux conseils.

Mes remerciements vont aussi aux : Pr. Saidat B. et Dr. Gozi, H. pour leurs aides et aussi leurs conseils.

Mes profonds remerciements s'adressent à nos enseignants de l'année théorique de Master 02 : M^{me} El-houiti Fatiha, M^{me} Benarouss Khadidja et Mr. Sifi.

Mes remerciements à Mr. Khaled Hamel., Chef Service du laboratoire centre de transfusion sanguine « CIS » de l'hôpital Benadjila Ahmida Laghouat et M^{me} Renane, pour leur aide précieuse.

Je tiens à remercier aussi ma Mère et ma joie de vivre Belmecheri Hadja Aïcha pour son aide et disponibilité et soutiens.

Ma reconnaissance la plus profonde à tous ceux qui de près ou de loin m'ont aidée et encouragée au cours de la réalisation de ce travail.

Abstract

In the framework of the valorization of medicinal plants of the Algerian flora, we were interested in the study of three plants of the Algerian atlas namely *Arthrophyllum scoparium*, *Equisetum arvense* and *Cistus villosus*. The aim is to evaluate the antimicrobial activity of our extracts which has been estimated in terms of the diameter of the inhibition zone of around the disks soaked with extracts with respect to the seven (07) pathogenic microorganisms (three strains). to Gram + (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Micrococcus luteus*) and three to Gram - (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*) plus a yeast (*Candida albicans*) on a solid agar medium Mueller-Hinton Agar. The extracts of our plants were obtained by maceration in different solvents using sonication: hexane (100%), acetone (100%, 7v / 3v), methanol (100%, 8v / 2v) and water. The total content of phenolics and flavonoids was determined by spectrophotometric method. From the results obtained, all of our extracts reacted positively to at least one of the microbial strains tested with the exception of *Escherichia coli*; the extracts of the solvents Acetone (7v / 3v) and Methanol (100%) gave remarkable results and with the majority of the strains. It is noted that antibiotic susceptibility testing has been performed for comparison purposes. In conclusion, it can be said that the extracts tested are endowed with an appreciable antibacterial activity with zones of inhibition up to 22.30 ± 0.5 mm, which can be considered as potential antimicrobial agents.

Key words: medicinal plant, *Arthrophyllum scoparium*, *Equisetum arvense*, *Cistus villosus*, poly phenolic extracts, flavonoids, antibacterial activity.

Résumé

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales de la flore algérienne, nous nous sommes intéressés à l'étude de trois plantes de l'atlas algérien à savoir *Arthrophyllum scoparium*, *Equisetum arvense* et *Cistus villosus*. Le but recherché est d'évaluer l'activité antimicrobienne dans nos extraits qui a été estimée en terme de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques imbibés d'extraits vis-à-vis des sept (07) germes pathogènes (trois souches à Gram + (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Micrococcus luteus*) et trois à Gram - (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*) plus une levure (*Candida albicans*) sur un milieu gélosé solide Mueller-Hinton Agar. Les extraits de nos plantes ont été obtenus par macération dans différents solvants en utilisant la sonication : hexane (100%), acétone (100% ; 7v/3v), méthanol (100% ; 8v/2v) et l'eau. La teneur totale en composés phénoliques et flavonoïdes a été déterminée par méthode spectrophotométrique.

D'après les résultats obtenus, l'ensemble de nos extraits ont réagi tous de manière positive sur au moins une des souches microbiennes testées à l'exception de *Escherichia coli* ; les extraits des solvants Acétone (7v/3v) et Méthanol (100%) ont donné des résultats remarquables et avec la majorité des souches. Il est à noter que des tests de sensibilité aux antibiotiques ont été réalisés pour des raisons de comparaison. En conclusion, nous pouvons dire que les extraits testés sont doués d'une activité antibactérienne appréciable avec des zones d'inhibition pouvant atteindre les $22,30 \pm 0,5$ mm, d'où pouvant être considéré comme des agents antimicrobiens potentiels.

Mots-clés : plante médicinale, *Arthrophyllum scoparium*, *Equisetum arvense*, *Cistus villosus*, extraits poly phénoliques, flavonoïdes, activité antibactérienne.

ملخص

في إطار تثمين النباتات الطبية الجزائرية، أهتمنا بدراسة ثلاثة أنواع نباتية من الأطلس الجزائر وهينب الخيل، الرمث والقصة *Arthrophyllum scoparium*, *Cistus villosus*, *Equisetum arvense*

والهدف من ذلك هو تقييم النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلصات الأنواع السابقة الذكر والتي تم تقديرها من حيث قطر هالة تثبيط حول الأقراص غارقة بهذه المستخلصات أما هذه البكتيريا المسببة للأمراض السبعة فهي ثلاث سلالات. (المكورات العنقودية الذهبية، العصبية سيربوسو ميكروكوكوسلو تيبوس) وثلاثة إلى غرام - (الإشريكية القولونية، كليبسيلا الرئوية و بسيدوموناسايروجينوسا) بالإضافة إلى الخميرة (المبيضات البيض) على وسط أجار الصلبة (MH). تم الحصول على مستخلصات من النباتات عن طريق ترنيخها في المذيبات المختلفة باستخدام جهاز الرنين الصوتي: الهكسان (100٪)، الأستون (100٪، 7 / 3V)، الميثانول (100٪، 8 / 2V) والماء. تم تحديد المحتوى الكلي للفينوليكيو الفلافونويد بالطريقة الطيفية.

ومن النتائج التي تم الحصول عليها، فقد تفاعلت المستخلصات إيجابيا على الأقل واحدة من السلالات البكتيرية باستثناء إشريشيا القولونية؛ أعطت مقتطفات من المذيبات الأستون (7v / 3v) وكان مستخلص الميثانول (100٪) بنتائج ملحوظة ومع معظم السلالات. وتجدر الإشارة إلى أن اختبار الحساسية للمضادات الحيوية قد أجري لأغراض المقارنة.

وكننتيجة عامة يمكن القول أن العينات النباتية المجربة على نشاط مضاد للجراثيم ملموس بشكل واضح بهالة تثبيط تصل إلى 22.30 ± 0.5 مم، وبناءا عليها يمكن اعتبارها أحد المصادر كمضادات للميكروبات.

الكلمات المفتاحية: النبات الطبية، المستخلصات الفينولية، الفلافونويدات، النشاط المضاد للبكتيريا

Arthrophyllum scoparium , *Equisetum arvense*, *Cistus villosus*

Liste des figures

Figure 1 : Effets biologiques de la sante de pléiotropie des polyphénols de plantes alimentaires [29]	21
Figure 2.: Photos des plantes en poudre (originale).....	36
Figure 3: Photo de l'appareil de Sonication	37
Figure 4 : Diagramme illustrant le protocole de l'extraction	38
Figure 5 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	40
Figure 6. Courbe d'étalonnage de Quercétine (mg/ml) pour le dosage des flavonoïdes.	41
Figure 7: Diagramme illustrant les différents étapes du protocole expérimental de l'activité antibactérienne.....	44
Figure 8 : histogrammes des rendements (%) des différents extraits bruts pour chaque plante	49
Figure 9 : La teneur en polyphénols pour chaque plante	51
Figure 10 : La teneur en flavonoïdes pour chaque plante	51
Figure 11 : Les zones d'inhibition sur la souche CA (a-b-c-d)	56
Figure 12 : Schéma de la paroi d'une bactérie Gram négatif / Gram Positif.....	75

Liste des tableaux

Tableau 1: Les composés actifs issues des divers solvants utilisés pour l'extraction [2]	22
Tableau 2 : Classe majeure de composés antimicrobiens des plantes et mécanisme d'action [3].	28
Tableau 3 : Origines des souches utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne.....	42
Tableau 4 : Les antibiotiques utilisés	45
Tableau 5 : Les rendements et concentration d'extraits bruts par rapport aux différents solvants	48
Tableau 6 : Activité antimicrobienne des antibiotiques et de l'antifongique standards exprimée par le diamètre d'inhibition en millimètre.....	52
Tableau 7: Activité antimicrobienne de différents extraits de la plante <i>Cis</i>	54
Tableau 8: Activité antimicrobienne de différents extraits de la plante « <i>Equisetum arvense</i> »	55
Tableau 9: Activité antimicrobienne différentes extraits de la plante « <i>Haloxylon scoparium</i> en phase de dormance »	55
Tableau 10 : Activité antimicrobienne différentes extraits de la plante « <i>Haloxylon scoparium</i> en phase de floraison »	55
Tableau 11 : Aspects et Couleurs des Extraits de nos plantes	69
Tableau 12 : Description et pouvoir pathogène des souches testées.....	70
Tableau 13: Les étapes de la méthode de sonication	72

Liste des abréviations :

Abréviation	Signification
DK	Denb ElKeil
RD	Remth en dormance
RF	Remth en Floraison
CIS	Cistus villosus
Sa	<i>Staphylococcus aureus</i>
Kp	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MI	<i>Micrococcus lotus</i>
Bc	<i>Bacillus cereus</i>
Pa	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>
Ec	<i>Escherichia coli</i>
Ca	<i>Candida Albicans</i>
ATB	Antibiotiques
ATCC	American type culture collection
DMSO	Diméthylsulfoxyde
T	Température
C°	Degré selcus
MH	Muller Hinton
BN	Bouillon nutritif
MNHN	Muséum National d'Histoire Naturelle.
LAPRONA	Laboratoire des Produits Naturels
GAE	Équivalent Acide Gallique
QE	Équivalent Quercétine
MCV	Maladies Cardio-Vasculaires

Table de matières

<i>Dédicaces</i>	2
<i>Remerciement</i>	3
Abstract	4
Listes des figures	5
Listes des tableaux	6
Listes des abréviations :	7
Introduction :	12
I. Plantes et métabolites :	16
I.1. Généralité sur les plantes médicinales	16
I.1.1. Définitions	16
a Plantes médicinales	16
b Plantes aromatiques	16
I.1.2 Historique	16
I.1.3 Études caractéristiques des plantes étudiées :	17
I.1.3.1 Equisetum Arvense	17
a/ Description :	17
b/ Propriétés thérapeutiques :	17
I.1.3.2 Haloxylon scoparium	18
a/ Description :	18
b/ Propriétés thérapeutiques :	18
c/ Systématique	Erreur ! Signet non défini.
I.1.3.3 Cistus villosus	19
a/ Description :	19
b/ Propriétés thérapeutiques :	19
I.2 Les métabolites secondaires	19
I.2.1 Métabolites secondaires des plantes	19
I.2.1.1 Les polyphénols	20
I.2.1.2 Choix des solvants	22
II. Bio-activités des métabolites :	24
II.1. Effets Biologiques	24

II.1.1	Activité antioxydante	24
II.1.2	Activité Anti-cancer	24
II.1.3	Activité Anti-ulcère	25
II.1.4	Activité Antidiabétique	25
II.1.5	Activité Anti-inflammatoire.....	26
II.1.6	Cibles multifonctionnelles.....	26
II.1.7	Activité antimicrobienne.....	27
II.1.7.1	Généralités.....	27
II.1.7.2	Activité antimicrobienne des extraits des plantes.....	27
II.1.7.3	Les antibiotiques	28
a/	Mécanismes d'actions antimicrobiennes des antibiotiques	29
II.1	Description des bactéries étudiées.....	30
a/	<i>Escherichia coli</i>	30
b/	<i>Staphylococcus aureus</i>	30
c/	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
d/	<i>Bacillus cereus</i>	31
e/	<i>Micrococcus luteus</i>	31
f/	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	32
g/	<i>Candida albicans</i>	32
III.	Matériels et méthodes.....	35
III.1	Matériel	35
III.1.1	Matériel végétal.....	35
III.1.2.	Matériel chimiques.....	35
III.2	Méthodes.....	35
III.2.1	Récolte des échantillons :	35
III.2.2	Séchage et conservation	35
III.2.3	Broyage et préparation des échantillons.....	35
III.2.4	Méthode d'extraction.....	36
III.2.5	Calcul de rendement.....	37
III.2.6	Dosage des composés phénoliques	39
III.2.6.1.	Dosage des phénols totaux	39
a/	Principe de la méthode.....	39
b/	Protocole expérimentale.....	39

III.2.6.2. Dosage des flavonoïdes.....	40
a/ Principe de la méthode.....	40
b/ Protocole expérimentale.....	40
III.2.7 Activité Antibactérienne :.....	41
III.2.7.1. Germes cibles	41
III.2.7.2 Protocole expérimental de l'activité antimicrobienne :	43
III.2.7.3 Lecture	43
III.2.7.4 L'antibiogramme	45
VI. Résultats et discussion.....	47
VI.1 Rendement et concentration.....	47
VI.2 Dosage de polyphénols et Flavonoïdes	49
VI.3 L'activité antibactérienne.....	52
VI.3.1 Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques.....	52
VI.3.1 Activité antimicrobienne des différents extraits des plantes.....	53
Conclusion :.....	59
Références Bibliographiques :.....	61
Annexes.....	68



Introduction général

Introduction :

De tous les temps, les plantes ont occupé une place prépondérante dans la vie de l'homme. Toutes les civilisations connues ont utilisé les plantes soit sauvages soit cultivées pour se nourrir, se défendre, se vêtir ou se soigner. Ces utilisations se sont diversifiées au fil des temps pour s'adapter aux besoins. Les plantes sont employées parfois de façon sélective grâce à la tradition. Au fil des siècles, une première distinction a pu être faite entre plantes comestibles et toxiques. Les connaissances empiriques accumulées ont permis aux différentes civilisations de prendre les plantes comme source essentielle de médicaments. Jusqu'au début du 20^{ème} siècle, presque tous les médicaments étaient à base de plantes.

À ce jour, la recherche de nouvelles substances biologiquement actives des plantes reste une zone d'investigation potentielle. Dans ce domaine, l'Algérie possède une richesse floristique considérable c.à.d. un potentiel de plantes médicinales qui comporte des milliers d'espèces présentant des intérêts divers tel que les composés poly-phénoliques. Ces derniers présentent plusieurs effets biologiques y compris les actions antioxydantes, antibactériennes, antivirales, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques et vasodilatatrices [1,2].

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales de la flore algérienne, nous nous sommes intéressés à l'étude de trois plantes de l'atlas algérien à savoir *Arthrophytum scoparium*, *Equisetum arvense* et *Cistus villosus* qui sont parmi des plantes utilisées dans la médecine traditionnelle.

Le but recherché est d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits brutes de ces plantes vis-à-vis de souches bactériennes (à Gram⁺ et à Gram⁻) et fongiques et d'essayer de corrélérer cette activité avec le type de solvant utilisé au cours de l'extraction.

Il est à signaler qu'il existe de nombreuses méthodes impliquées dans l'extraction et la quantification des constituants végétaux et chacune de ces méthodes à ses propres avantages et inconvénients. Il est à signaler, aussi, que les polyphénols présentent des mécanismes différents contre les microorganismes passant par la désorganisation de la membrane plasmique, la formation des complexes avec la paroi, l'inhibition des enzymes, l'interaction avec l'ADN etc [3]

Actuellement, la recherche scientifique a confirmé que les extraits de plantes sont dotés d'inhibiteurs antibactérien et antifongique très efficaces [4 ,5]. Cependant ils peuvent, potentiellement, constituer

une alternative très efficace et valable, surtout que la résistance des bactéries aux antibiotiques, depuis plusieurs années, s'est révélé un important problème [6,7].

Notre mémoire est subdivisé en deux grandes parties : une partie théorique qui englobe deux chapitres et rassemble des données théoriques sur les plantes médicinales et leurs substances bioactives ainsi que les souches microbiennes testées. La partie pratique est partagée en deux chapitres : matériel et méthodes et résultats et discussion. Enfin, le mémoire se termine par une conclusion et une liste de références bibliographiques.



Partie 1 : Synthèse bibliographique



Chapitre I
Plantes et métabolites

I. Plantes et métabolites :

I.1. Généralités sur les plantes médicinales

I.1.1. Définitions

a Plantes médicinales

Selon la pharmacopée française (1965), une plante médicinale est utilisée entière ou sous forme d'une partie de plante et qui possède des propriétés médicamenteuses. Ces plantes peuvent aussi avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques [8].

b Plantes aromatiques

Les plantes aromatiques appartiennent à la fois au domaine des plantes médicinales et des matières premières industrielles d'origine végétale, et constituent des sources de substances naturelles complexes, destinées à apporter des caractères organoleptiques particulier aux aliments [9].

I.1.2 Historique

L'histoire des plantes médicinales est très ancienne, elle est liée à celle de l'homme [8]. Depuis la plus haute antiquité, les hommes se sont soignés avec les plantes qu'ils avaient à leur disposition [11], ce qui leurs a permis d'enrichir ses connaissances des plantes, et même de se spécialiser dans le traitement par les herbes [10].

Moins de 400 ans avant J-C : Hippocrate, le très célèbre médecin grec considéré comme le père de la médecine occidentale actuelle, laisse une somme considérable de données dans le *Corpus Hippocratum* qui traite environ 250 « simple » [8].

Au cours du 1 siècle : Dioscoride référence 609 drogues végétales dans son ouvrage « De materia medica », qui est devenu depuis quelques années « Pharmacognosie » [8,23]

Plus tard, en 1635, Louis XIII crée à Paris le célèbre jardin royal des plantes médicinales riches de plus de 2300 espèces végétales [8].

C'est au 18emesiècle que les plantes acquièrent leurs identités telles qu'on les connaît aujourd'hui, à savoir un double nom indiquant le genre et l'espèce [8,10].

Depuis quelques décennies, l'ère du bien-être, la recherche d'une vie saine, le retour aux choses essentielles, à la nature, fait renaître un enthousiasme certain pour les plantes [11].

Le travail des chimistes du XIXème siècle va permettre une identification plus précise des agents actifs des plantes et une meilleure définition de leurs vertus [8].

I.1.3 Études caractéristiques des plantes étudiées :

Les plantes sont des êtres pluricellulaires à la base de la chaîne alimentaire. Elles forment l'une des subdivisions (ou règne) des eucaryotes. Elles sont l'objet d'étude de la botanique.

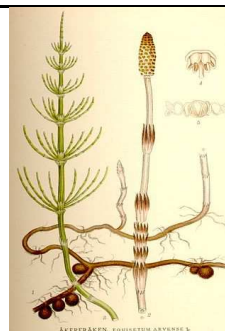
I.1.3.1 *Equisetum Arvense*

Nom vernaculaire:

« Prêle de vent ; Denb El-khiel ذنب; الخيل

Autre nom : **queue-de-cheval**

Famille : Equisetaceae



<https://fr.wikipedia.org>

a/ **Description :**

Plante rhizomateuse aphyllé à tiges fertiles vers blanchâtre, couvertes de gaines dentées (15 à 30 dents allongées). Les fleurs sont également absentes : la reproduction est assurée par des spores contenues dans les sporanges groupés sous les écailles en écusson et constituant un épi terminal presque cylindrique (ou en cône très allongé). Les tiges sporifères, sans chlorophylle, disparaissent une fois leur fonction accomplie [10].

b/ **Propriétés thérapeutiques :**

Anti-inflammatoire (arthrose...), astringente, cicatrisante, détersive, diurétique (oligurie, albuminurie, calculs, cystite, urétrite...), hémostatique, minéralisant.

Principes actifs : silice et acide silique (en grande quantité), silicates, flavonoïdes, glucosides, acide phénoliques, stérols, tanins, sels minéraux, alcaloïdes (nicotine...), etc. [10].

NB : la plante renferme des substances toxiques (alcaloïdes, glucosides). La durée de traitement ne doit pas dépasser quelques semaines [10].

Les principaux principes actifs connus sont : soufre, fer, manganèse, sels de potassium, acides gras, calcium, phosphore, sels minéraux, tanins, glucosides flavonoïdes, saponine, traces d'alcaloïdes, silice.

I.1.3.2 *Haloxylon scoparium*

Nom(s) vernaculaire(s):

Nom français : Bunge, Saligne à balai

Nom arabe : Remt, Rimth, Remth; الرمث « [14]

En période de dormance A

En période de floraison B



<http://www.sahara-nature.com>

a/ **Description :**

Haloxylon scoparium Pomel. Chénopodiacées = *Arthrophytum scoparium* (Pomel), est un petit buisson dense et sombre, est très fréquent sur les regs à sols gypseux.

Ses fleurs, dépourvues de pétales, sont discrètes mais à la fin de l'automne, quand l'humidité est suffisante, l'extrémité de ses rameaux se couvre de fruits entourés d'une couronne d'ailes membraneuses brillantes et vivement colorées de rose ou de rouge. Tiges grêles dressées, très rameuses. Rameaux secondaires rapidement érigés, verts foncés noircissant sur le sec. Entre nœuds allongés (0,8-3 cm pour les inférieurs). Il est distribué en sud-est de l'Espagne, Afrique du Nord et en partie dans la région Irano-Turaniéenne ; en Iran, Turquie, et la Syrie,

b/ **Propriétés thérapeutiques:**

Haloxylon scoparium renferme des polyphénols, des saponosides et plus particulièrement des alcaloïdes, ainsi des dihydroisocoumarines. *Haloxylon scoparium* de l'Algérie contient la cargénine, et la *N*-méthylisosalsoline comme alcaloïdes majoritaires type tétrahydroisoquinoline et l'isosalsoline, solidine, isosalsolidine, déhydrosalsolidine, tryptamine et la *N*-méthyltryptamine comme alcaloïdes minoritaires. Les feuilles contiennent des flavonols triglycosides. Les parties aériennes sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter les désordres et les problèmes de l'œil et la vision, les problèmes de digestion, les dermatoses, les piqûres des scorpions.

«*Remth*» peut provoquer des empoisonnements au cours de ses emplois thérapeutiques. En décoction avec du tabac il permet de préparer une teinture qui soigne la gale des troupeaux. Les extraits aqueux ont un pouvoir anticancéreux, anti-spasme et larvicide [12].

I.1.3.3 *Cistus villosus*

Nom(s) vernaculaire(s) : Kassa ; Mellih « القصة »

Nom botanique : *Cistus villosus*

Famille : Cistaceae



<http://www.tela-botanica.org>

a/ **Description :**

Originaires du pourtour méditerranéen, ils poussent dans des sols secs, rocaillieux, calcaires et ensoleillés. Ce sont des plantes pyrophytes, ayant la particularité de se régénérer facilement et même de se multiplier après les incendies. Les feuilles sont vertes, grisâtres souvent foncées, parfois velues, quelquefois gluantes. Les fleurs en forme de coupe, parfois fripées sont composées de cinq pétales de couleur blanche, rose à violette. Plante remarquablement aromatique surtout par temps chaud. Les cistes redoutent la conjugaison des températures froides et d'une forte humidité. Feuillage gris duveteux à bords ondulés. Fleurs rose lumineux teinté mauve.

Nous pouvons classer les espèces de cistes en deux catégories : ceux qui ont des fleurs roses à violettes (parfois rouges), ceux qui ont des fleurs blanches. Le pistil et les étamines sont en revanche jaune-orangé.

b/ **Propriétés thérapeutiques :**

Les extraits aqueux et méthanoïques ont un fort pouvoir oxydant et un effet inhibiteur de l' α -amylase et l' α -glucosidase [13,14]. Toutes les espèces de *Cistus* sont fréquemment utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs activités antimicrobiennes [15], anti-tumorales [16], antivirales [17] et anti-inflammatoires [14, 18, 19,20].

I.2 Les métabolites secondaires

I.2.1 Métabolites secondaires des plantes

Tous les êtres vivants ont un métabolisme primaire qui fournit les molécules de base (acides nucléiques, lipides, protéines, acides aminés et glucides). Les plantes produisent, en plus, un grand

nombre de composés qui ne sont pas issus directement lors de la photosynthèse, mais résultent des réactions chimiques ultérieures. Ces composés sont appelés métabolites secondaires. De nos jours, un grand nombre de ces composés sont utilisés en médecine moderne et une majorité de ceux-ci le sont selon leur usage traditionnel.

Ils sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, et qui sont divisés principalement en trois grandes familles : Les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes [21,22]. Ci-dessous quelques importants groupes phytochimiques considérés comme source de molécules biologiquement actives.

I.2.1.1 Les polyphénols

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc. [23,24].

En effet les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus [24].

Les principales classes de composants phénoliques sont : les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines [25,26]. Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits [27].

Les polyphénols ont récemment suscité un intérêt considérable en raison de leurs effets biochimiques et antioxydants potentiels sur la santé humaine. Communément appelés antioxydants, ils peuvent prévenir diverses maladies associées au stress oxydatif, comme les cancers, les maladies cardiovasculaires, l'inflammation et d'autres. La plupart des résultats expérimentaux ont confirmé que les polyphénols ont plusieurs activités biologiques, y compris les activités de balayage radical, anti-inflammatoire, anti-mutagène, anticancéreux, anti-VIH, anti-allergique, anti-plaquettaire et antioxydante [28].

Chimiquement, les polyphénols sont un groupe diversifié de composés naturels contenant de multiples fonctionnalités phénoliques. Ils constituent une grande famille de molécules complexes, toujours en expansion, avec des structures, des propriétés et des tailles diverses allant des monomères aux polymères. Les polyphénols rassemblent une gamme de substances faiblement acides possédant des cycles

aromatiques portant des substituants hydroxyle et constituent l'un des groupes de substances les plus nombreuses et largement distribuées avec plus de 8000 structures phénoliques actuellement connues.

Les polyphénols peuvent être divisés en différentes classes en fonction de leur structure de base. Les principales classes de polyphénols sont les acides phénoliques et les flavonoïdes tandis que les moins fréquents sont les stilbènes et les lignanes. Les principales sous-classes présentes dans les aliments correspondent aux anthocyanines, aux flavanols, aux flavones, aux flavanones, aux flavonols et aux isoflavones [28].

Les polyphénols sont des composés naturels trouvés en grande partie dans les fruits, les légumes, les céréales et les boissons. Ces molécules sont des métabolites secondaires des plantes et sont généralement impliquées dans la défense contre les rayons ultraviolets ou l'agression par des agents pathogènes et peuvent également contribuer à l'amertume, l'astringence de la nourriture. Les chercheurs ont exploré que ces molécules sont de très bons antioxydants et peuvent neutraliser la réactivité destructive des espèces réactives d'oxygène / azote indésirables produites sous forme de sous-produit pendant les processus métaboliques dans le corps. Des études épidémiologiques ont révélé que les polyphénols offrent une protection importante contre le développement de plusieurs maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires (MCV), le cancer, le diabète, les infections, le vieillissement, l'asthme [29].

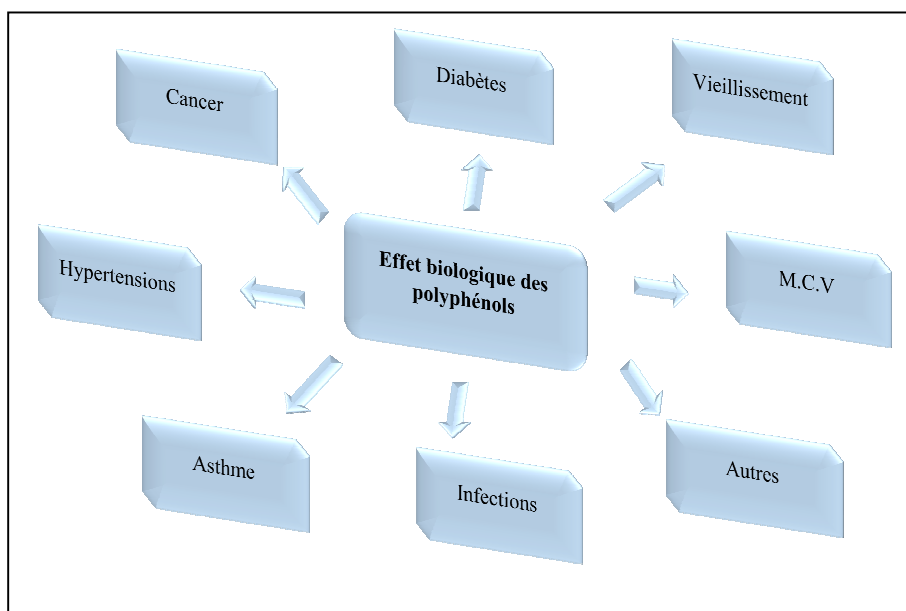


Figure 1 : Effets biologiques de la santé de pléiotropie des polyphénols de plantes alimentaires [29].

I.2.1.2 Choix des solvants

La détermination réussie de composés biologiquement actifs à partir de matières végétales dépend en grande partie du type de solvant utilisé dans la procédure d'extraction. Les propriétés d'un bon solvant dans les extractions végétales incluent, la faible toxicité, la facilité d'évaporation à faible feu, la promotion d'une absorption physiologique rapide de l'extrait, une action conservatrice, l'incapacité de provoquer l'extraction ou l'extraction de l'extrait. Les facteurs qui influent sur le choix du solvant sont la quantité des composés phytochimiques à extraire, le taux d'extraction, la diversité des différents composés extraits, la diversité des composés inhibiteurs extraits, la facilité de la manipulation ultérieure des extraits, la toxicité du solvant dans le processus d'essai biologique, la santé potentielle risque des agents d'extraction [24]. Le choix du solvant est influencé par ce qui est destiné à l'extrait. Étant donné que le produit final contiendra des traces de solvant résiduel, le solvant ne doit pas être toxique et ne doit pas interférer avec l'essai biologique. Le choix dépendra également des composés ciblés à extraire [29, 30]. [31]. (Tableau 01).

Tableau 1: Les composés actifs issues des divers solvants utilisés pour l'extraction [31]

Eau	Éthanol	Méthanol	Chloroforme	Éther	Acétone
Anthocyanine	Tannins	Anthocyanine	Terpenoids	Alcaloïdes	Phénol
Starches	Polyphénols	Terpenoids	Flavonoids	Terpenoids	Flavonols
Tannins	Poly acétylènes	Saponins		Coumarins	
Saponines	Flavonol	Tannins		Fatty acids	
Terpenoids	Terpenoids	Xanthoxyllines			
Polypeptides	Stérols	Totarol			
Lectins	Alcaloïdes	Quassinoids Lactones Flavones Phenones Polyphenols			



Chapitre II
Bio-activités des métabolites

II. Bio-activités des métabolites

II.1. Effets Biologiques

Les polyphénols sont des métabolites secondaires produits par des plantes supérieures, qui jouent plusieurs rôles essentiels dans la physiologie végétale et possèdent des propriétés saines potentielles sur l'organisme humain, principalement comme antioxydants, antiallergiques, anti-inflammatoires, anticancéreux, antihypertenseurs et antimicrobiens. Les paragraphes ci-dessous sont des exemples de leur activité.

II.1.1 Activité antioxydante

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques a augmenté considérablement vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement à cause de leur rôle dans des phénomènes aigus, tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais, aussi, à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement, tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire [32]. Des efforts intenses ont été fournis dans divers domaines de recherche pour extraire, identifier et quantifier de ces composés (antioxydants) à partir de substances à savoir les plantes et les produits agroalimentaires. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques [33]

II.1.2 Activité Anti-cancer

Les polyphénols sont en particulier parmi les phytochimiques divers qui ont le potentiel dans l'inhibition de la cancérogenèse [34]. Les acides phénoliques réduisent généralement de façon significative la formation des nitrosamines spécifiques promettant le cancer à partir des nitrites et des nitrates alimentaires. Les glucosinolates de diverses sources végétales comme le brocoli, le chou, le chou-fleur et les choux de Bruxelles exercent un important soutien protecteur contre le cancer du côlon. La consommation régulière de choux de Bruxelles par des sujets humains (jusqu'à 300 g. jour⁻¹) provoque miraculeusement très rapidement (disons dans un délai de 3 semaines) un accroissement appréciable de la glutathion-transférase et une réduction notable de la concentration urinaire d'un métabolite de purine spécifique qui sert de marqueur de la dégradation de l'ADN dans le cancer. Les isothiocyanates et les indole-3-carbinols interfèrent catégoriquement dans le métabolisme des cancérogènes, provoquant ainsi l'inhibition de l'activation pro carcinogène et induisant ainsi les enzymes de phase II, à savoir : NAD (P) H quinone réductase ou glutathion S -transférase, qui détoxifient spécifiquement les métabolites électrophiles sélectionnés qui sont capables de modifier la structure des acides nucléiques. Le

sulforaphane (riche en brocoli) s'est avéré être un inducteur enzymatique de phase 2 extrêmement puissant. Il provoque principalement un arrêt spécifique du cycle cellulaire ainsi que l'apoptose des cellules néoplasiques (cancéreuses). Sulforaphane produit catégoriquement de la d-D-gluconolactone qui a été établie pour être un inhibiteur significatif du cancer du sein. L'indole-3-carbinol (l'indole le plus important et le plus important présent dans le brocoli) inhibe spécifiquement le virus du papillome humain (VPH) qui peut causer le cancer de l'utérus. Il bloque les récepteurs d'estrogène spécifiquement présents dans les cellules cancéreuses du sein ainsi que vers le bas régule CDK6, et jusqu'à régule p21 et p27 dans les cellules cancéreuses de la prostate. Il permet l'arrêt du cycle cellulaire G1 et l'apoptose des cellules cancéreuses du sein et de la prostate de manière significative et améliore l'expression de p 53 dans les cellules traitées avec du Benz pyrène. Il déprime également les voies de signalisation Akt, NF-kappaB, MAPK et Bel-2 dans une mesure raisonnable. Les phytostérols bloquent le développement de tumeurs (néoplasmes) dans le côlon, le sein et les glandes de la prostate. Bien que les mécanismes exacts et précis par lesquels ledit blocage ait effectivement lieu ne sont pas encore bien compris, ils semblent cependant modifier radicalement le transfert de membrane cellulaire qui en résulte dans le phénomène de croissance du néoplasme et ainsi réduire significativement l'inflammation [33]

II.1.3 Activité Anti-ulcère

Des extraits de plantes inhibent à la fois la croissance de *Helicobacter pylori in vitro* ainsi que son activité d'uréase [35]. L'efficacité de certains extraits dans un milieu liquide et à de faibles niveaux de pH augmente leur puissance même dans l'estomac humain. Leur effet inhibiteur sur l'activité Na^+ / K^+ ATPase intestinale et rénale et sur le transport d'alanine dans le jéjunum de rat a également été rapporté [35,33].

II.1.4 Activité Antidiabétique

Le cinnamaldéhyde, un extrait de phytoconstituant, présente un effet antihyperglycémique significatif, entraînant une diminution des taux de cholestérol total et de triglycérides et, en même temps, une augmentation du HDL-cholestérol chez les rats diabétiques. Cette étude révèle le potentiel du cinnamaldéhyde en tant qu'agent oral naturel, avec des effets à la fois hypoglycémiques et hypolipidémiques.

Des rapports récents indiquent que l'extrait de cannelle et les polyphénols avec des polymères de procyanidine de type A présentent le potentiel d'augmenter la quantité de TTP (Thrombotic Thrombocytopenic Purpura), d'IR (Insulin Resistance) et de GLUT4 (Glucose Transporter-4) dans les adipocytes

3T3-L1. Il a été suggéré que le mécanisme de l'activité analogue à l'insuline de Cinnamon pourrait être en partie dû à l'augmentation des quantités de TTP, IR et GLUT4 et que les polyphénols de cannelle pourraient avoir des rôles supplémentaires d'anti-inflammatoires et/ou d'anti-angiogénèse agents [35,33].

II.1.5 Activité Anti-inflammatoire

L'huile essentielle de brindilles de *Cinnamomum. osmophloeum* possède d'excellentes activités anti-inflammatoires et une cytotoxicité contre les cellules HepG2 (Human Hépatocellular Liver Carcinoma Cell Line). Des rapports antérieurs ont également indiqué que les constituants de *C. osmophloeum* brindille présentaient d'excellentes activités anti-inflammatoires dans la suppression de la production d'oxyde nitrique par les macrophages stimulés par le LPS (lipopolysaccharide) [35, 33]

II.1.6 Cibles multifonctionnelles

Des cibles moléculaires multiples de composés phytochimiques alimentaires ont été identifiées, à partir de protéines pro- et anti-apoptotiques, de protéines de cycle cellulaire, de molécules d'adhésion cellulaire, de protéines kinases, de facteurs de transcription à des métastases et de voies de croissance cellulaire [36]. Les phytochimiques tels que l'épigallocatechine-3-gallate(EGCG) issu du thé vert, la curcumine du curcuma et le resvératrol du vin rouge tendent à viser une multitude de cibles moléculaires. C'est à cause de ces caractéristiques que les mécanismes d'action définitifs ne sont pas disponibles malgré des décennies de recherche [37]. La nature multi-cible des composés phytochimiques peut être bénéfique pour surmonter la résistance aux médicaments anticancéreux. Ce mode d'action à facettes multiples entrave probablement la capacité des cellules cancéreuses à développer une résistance aux phytochimiques.

II.1.7 Activité antimicrobienne

II.1.7.1 Généralités

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, protozoaires). Elles sont divisées en bactéries proprement dites (Bacteria) et bactéries primitives (Archaea). Toutes les bactéries rencontrées en pathologie appartiennent aux Bacteria.

Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1 μ m. Nous pouvons les voir au microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (cocci), en bâtonnet (bâcilles), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochètes). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'en microscopie électronique [38].

II.1.7.2 Activité antimicrobienne des extraits des plantes

L'utilisation des antibiotiques conduit dans la très grande majorité des cas à la sélection de populations microbiennes résistantes. Cette résistance est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages, transposons, intégrons). Ces résistances ont conduit à chercher de nouveaux agents antimicrobiens possédant une efficacité plus importante que les drogues synthétiques d'une part et bien acceptés par l'organisme d'autre part (sans exercer des effets délétères sur la santé humaine) [39, 40]. Beaucoup de groupes de recherches ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales telles que fenouil (*Foeniculum vulgare*), menthe poivrée (*Mentha piperita*), thym (*Thymus vulgaris*), ils ont trouvé que ces extraits sont actifs non seulement contre les bactéries mais aussi contre les champignons, les levures et les virus [41].

D'autres groupes de chercheurs ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifié les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes, cette étape constitue une plateforme pour plusieurs implications incluant l'industrie pharmaceutique, la médecine alternative, et la thérapie naturelle [42]. Le tableau 02 illustre quelques mécanismes d'actions antimicrobiennes des polyphénols

Tableau 2 : Classe majeure de composés antimicrobiens des plantes et mécanisme d'action [43].

Classes	Sous classe	Exemples	Mécanisme d'action
Phénols	Phénols simples	Catéchol	Privation en substrat Perturbation de la membrane
	Acides phénoliques Quinones	Acide cinnamique	Liaison aux adhésines, complexe avec la paroi cellulaire, inactive les enzymes
		Hypéricine	
	Flavonoïdes Flavones	Chryisine	Complexe avec la paroi cellulaire Inactive les enzymes
		Abyssinone	Inhibe la transcriptase reverse du HIV ?
	Flavonols Tannins	Totarol	Liaison aux protéines
		Ellagitanine	Liaison aux adhésines Inhibition des enzymes Privation en substrat Complexe avec la paroi cellulaire Perturbation de la membrane Complexe aux ions de métaux
	Coumarines	Warfarine	Interaction avec l'ADN eucaryote (Activité antivirale)
			Perturbation de la membrane
	Terpenoïdes, huiles essentielles		Capsaïcine
Alcaloïdes		Berberine Pipérine	Bloque la fusion ou l'adsorption virale
Lectines et polypeptides		Agglutinine spécifique du mannose Fabatine	Forme des ponts disulfures ?
Polyacétylènes		8S-Heptadeca2(Z),9(Z)-diène4,6-diyne-1,8-diol	

II.1.7.3 Les antibiotiques

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent

sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques [44].

La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents a entraîné la sélection de souches multi-résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouvelles voies et surtout vers les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration de nouveaux médicaments [45].

a/ **Mécanismes d'actions antimicrobiennes des antibiotiques**

La première phase d'action des antibiotiques est leur mise au contact des bactéries ciblées dont ils doivent perturber une voie métabolique vitale qui constitue leur site d'action. [46].

Les structures et fonctions bactériennes les plus communément ciblées sont : la paroi cellulaire, la membrane cytoplasmique, les métabolismes de synthèses des protéines et des acides nucléiques [46].

- ∇ **Action sur la paroi** : contrairement aux cellules animales, les bactéries possèdent une paroi rigide qui les protège de perturbations et des effets osmotiques du milieu. Elle a la particularité d'être constituée d'un complexe macromoléculaire exclusif : le peptidoglycane. Le métabolisme de synthèses de ce composant pariétal essentiel constitue la cible sélective de nombreux antibiotiques. La différence de pression osmotique entre le milieu intracellulaire de la bactérie et son environnement externe entraîne alors la lyse et la mort des bactéries [46].
- ∇ **Action sur la membrane cytoplasmique** : la membrane cytoplasmique est le siège des transports membranaires de substrats et de métabolites entre la bactérie et son milieu. Ils agissent par la désorganisation des fonctions normales de la membrane cytoplasmique, en altérant sa structure par la formation des pores et par la dérégulation du transport des ions et d'autres substrats [46].
- ∇ **Action sur la synthèse des protéines** : nombreux antibiotiques ont pour cible primaire les sous unités 30S ou 50S des ribosomes bactériens. Leur action aboutit à l'altération de la synthèse des protéines à différents niveaux [46].
- ∇ **Action sur la Synthèse des acides nucléiques** : certains antibiotiques perturbent le métabolisme de synthèse des acides nucléiques, essentiellement en inhibant l'ADN-polymérase. Mais

ils agissent aussi sur d'autres enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN et dans sa transcription [46].

II.1 Description des bactéries étudiées

a/ *Escherichia coli*

Escherichia coli est un bacille à gram négatif [47], de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 μm , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 μm [48].

L'habitat préférentiel de ces bactéries sont les matières fécales, aliments contaminés et les eaux usées. [47].

Les infections hospitalières les plus fréquentes sont les infections urinaires, plaies septicémies et les infections respiratoires [47].

b/ *Staphylococcus aureus*

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1 μm . Elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ce type de bactéries sont immobiles, asporulés, habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré [47] *S. aureus* représente est la cause de méningite, ostéomyélite et la diarrhée [48]

L'habitat préférentiel de ces bactéries sont Peaux, cheveux, nasopharynx, périnée, poussières, air et les aliments contaminés [47].

Les infections hospitalières les plus fréquentes sont les infections cutanées, plaies, brûlures, abcès, Ostéites, ostéomyélites, Endocardites, Septicémies, Infection pulmonaires et les intoxications alimentaires.

c/ *Pseudomonas aeruginosa*

Les espèces *Pseudomonas aeruginosa* sont des bacilles à Gram négatif, ces bactéries fines sont de 1.5 à 3 μm de long et 0.5 à 0.8 μm de large. Elles sont mobiles grâce à une ciliature de type polaire monotriche.

P. aeruginosa ne forme ni spores ni sphéropastes. Elle est responsable de 10 % de l'ensemble des infections nosocomiales [47].

L'habitat préférentiel de ces bactéries sont Sol, eau, plantes voies respiratoires matières fécales réfrigérateurs et appareil sanitaires [47].

Les infections hospitalières les plus fréquentes sont les Infection pulmonaires et urinaires, Brulures, Plaies et septicémies.

d/ *Bacillus cereus*

Le genre *Bacillus* est constitué de bactéries sporulées et telluriques, ubiquitaires, sont des bacilles à Gram positif

Rencontrées ou leur habitat préférentiel est dans le sol, l'eau, les poussières, laits (en poudre), les plantes et les matières fécales de l'homme et des animaux.

Les infections hospitalières les plus fréquentes sont Intoxication alimentaires et Septicémies chez les immunodéprimés

e/ *Micrococcus luteus*

Le genre *Micrococcus* est le genre type de la famille des *Micrococcaceae*[50], sont des Cocci à Gram positif ; le genre *Staphylococcus* faisait autrefois partie du genre *Micrococcus*, mais il en a été retiré pour former un nouveau genre, en s'appuyant sur l'utilisation du glucose [51], et le contenu en guanine+cytosine (G+C) de l'ADN [52]. Quatre des huit sous-groupes restants du genre *Micrococcus* ont été replacés ultérieurement dans le genre *Staphylococcus* en s'appuyant sur l'hybridation moléculaire ADN-ADN et la chimie de la paroi cellulaire [53]

L'habitat préférentiel de ces bactéries sont : peau ; voies respiratoires supérieures ; oropharynx, sol, poussières, eaux et air.

Les infections hospitalières les plus fréquentes sont des infection nosocomiales chez les immunodéprimés.

f/ *Klebsiella pneumoniae*

Le genre *Klebsiella*, de la famille des entérobactéries, comporte cinq espèces dont l'espèce-type est *Klebsiella pneumoniae* qui est la plus fréquente des bactéries à Gram négatif impliquée dans les cas de pneumonies nosocomiales.

L'habitat préférentiel de ces bactéries sont Matières fécales voies aériennes supérieures aliments contaminés.

Les infections hospitalières les plus fréquentes sont Infection pulmonaires et urinaires, plaie et septicémies [47].

g/ *Candida albicans*

Les levures sont typiquement unicellulaires, quoique très souvent les cellules restent collées les unes aux autres après la division cellulaire [54].

Candida albicans est la seule levure prise dans notre étude. Elle est principalement à l'origine de la candidose disséminée. C'est un champignon fréquemment retrouvé au niveau de la bouche et du tractus gastro-intestinal de plusieurs personnes normales. Parmi les conditions favorisant une infection à candida, notons le diabète, la grossesse, les antibiotiques, les corticostéroïdes et toute maladie pouvant affecter l'état général d'un individu. La nystatine (Mycostatin) est très efficace dans le contrôle des infections muco-cutanées [55, 32].



Partie 2 : Expérimentale



Chapitre III
Matériel et méthodes

III. Matériel et méthodes

III.1 Matériel

III.1.1 Matériel végétal

Nous avons effectué des expérimentations sur les plantes suivantes :

- *Equisetum arvense*.
- *Haloxylon scoparium* (en phase de floraison et phase de dormance).
- *Cistus villosus*

III.1.2. Matériel chimiques

Tous les produits chimiques ont été délivrés par sigma (aldrich) : Méthanol, acétone, hexane, DMSO (diméthylsulfoxyde),

III.2 Méthodes

III.2.1 Récolte des échantillons :

La plante *Haloxylon scoparium* a été récoltée de deux régions différentes Taadmitte (état de floraison (mi-octobre 2016)) et EL- KHNEG (état de dormance (début septembre)). La plante *Cistus villosus* a été récoltée de la région de Djelfa en avril 2015 (état de floraison) par contre *Equisetum arvense* a été fournie par un herboriste de la ville de Laghouat.

III.2.2 Séchage et conservation

Après chaque récolte le matériel végétal est nettoyé (débarrassé de ses débris), étalé sur papier et laisser sécher à température ambiante dans une pièce aérée, à l'abri de la lumière et protégé de l'humidité.

III.2.3 Broyage et préparation des échantillons

Pour obtenir une poudre solide de nos échantillons, les plantes sont réduites en poudre fine suite au broyage à l'aide d'un pilon et un mortier, puis les faire tamiser à l'aide d'un tamis (Figure 3).

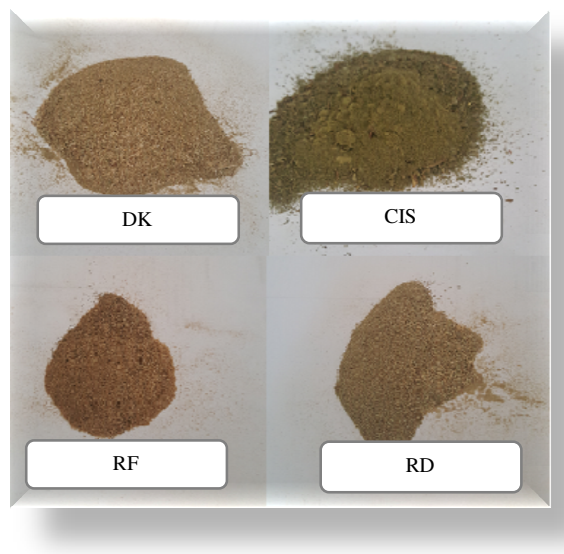


Figure 2.: Photos des plantes en poudre (originale)

III.2.4 Méthode d'extraction

D'après la bibliographie, il existe plusieurs méthodes d'extraction. Dans notre étude la méthode de « **Sonication** » a été choisie.

Par définition la Sonication : La procédure implique l'utilisation d'ultrasons avec des fréquences allant de 20 kHz à 2000 kHz ; Cela augmente la perméabilité des parois cellulaires et échelle produit de la cavitation. Bien que le processus soit utile dans certains cas, son application à grande est limitée en raison des coûts plus élevés. Un inconvénient de la procédure est l'effet délétère, occasionnel mais connu, de l'énergie ultrasonore (plus de 20 kHz) sur les constituants actifs des plantes médicinales par la formation de radicaux libres et par conséquent des changements indésirables dans les molécules de médicament un appareil qui utilise la un ultrason qui a une marge entre 20 à 2000 Mhz. [30]

La poudre obtenue a été affrontée à l'Hexane pour dépigmenter les pigments chlorophylliens, caroténoïdes, les lipides et des sucres, puis subit une Sonication pendant une heure à 25C° (Figure 03). Après la filtration nous obtenons deux phases (liquide / Solide), nous récupérons un filtrat qui va subir une macération dans différents solvants: Acétone, Méthanol, un mélange Méthanol-Eau (80-20) et un mélange Acétone-Eau (70-30) à raison de 50 ml pour 05g de la poudre, puis les faire passer dans

l'appareil de Sonication pendant 1 heure à une température de 25 C°. Les mélanges sont ensuite filtrés puis l'extrait a été évaporé à sec par un Rota-vapeur à 45°C et à 150 tours/min.



Figure 3: Photo de l'appareil de Sonication

III.2.5 Calcul de rendement

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

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

R (%) : Rendement exprimé en %.

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

P0 : poids vide du ballon / cristallisateur (g)

E : poids de la poudre végétale (g).

Le protocole suivi pour la réalisation de cette extraction est illustré dans le diagramme suivant (figure 04) et pour plus de détails voir tableau 13 (Annexe3).

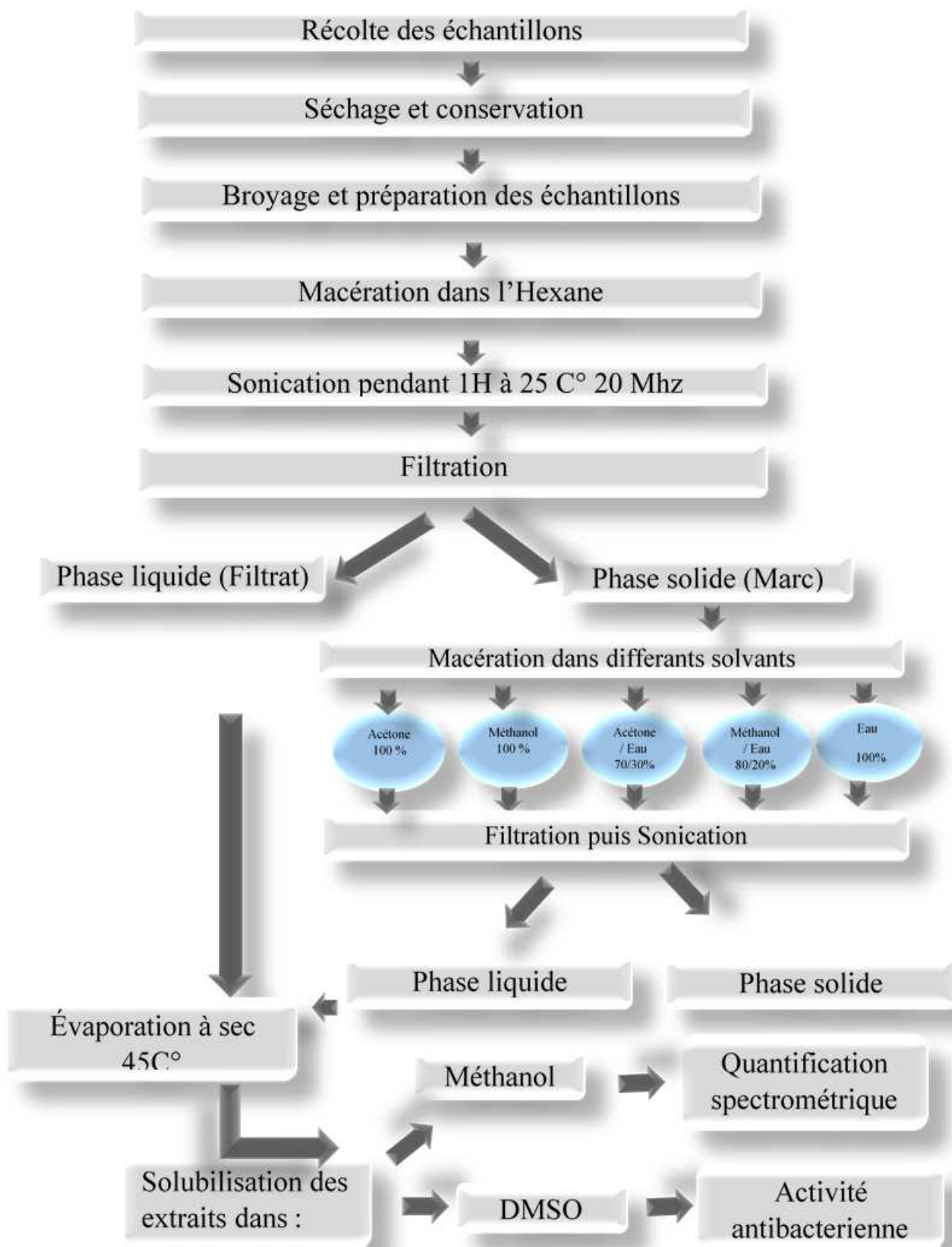


Figure 4 : Diagramme illustrant le protocole de l'extraction

III.2.6 Dosage des composés phénoliques

III.2.6.1. Dosage des phénols totaux

a/ Principe de la méthode

La teneur en phénols totaux des extraits des plantes qui font l'objet d'analyse a été déterminé par la méthode de Singleton et Rossi (1965) [56 - 57]. Cette méthode est basée sur la réaction des composés phénoliques avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif de couleur jaune est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation [58] par les groupements hydroxyles des phénols [59], en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximale est comprise entre 725 et 760 nm est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits végétaux [58]

b/ Protocole expérimentale

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé par la méthode décrite par Waterhouse (2001). 500 μ l du réactif de Folin-Ciocalteu a été ajoutée à un volume de 100 μ l de l'extrait convenablement dilué puis agiter. Après 2 minutes, 1 ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) d'une concentration de 2% à 3% est ajoutée tout en agitant par un vortex.

Après une incubation à l'obscurité pendant 30 min à 40° C, l'absorbance est mesurée à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (Shimatzu 1601), contre un blanc (le même mélange excepté l'extrait qui est remplacé par le MÉOH). Tous les essais sont reproduits deux fois.

Une courbe d'étalonnage ($y= ax+b$) a été réalisée en parallèle par l'acide gallique à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons (Figure 05).

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

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

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

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

V : Volume de l'extrait.

m : Le poids de la matière sèche (g).

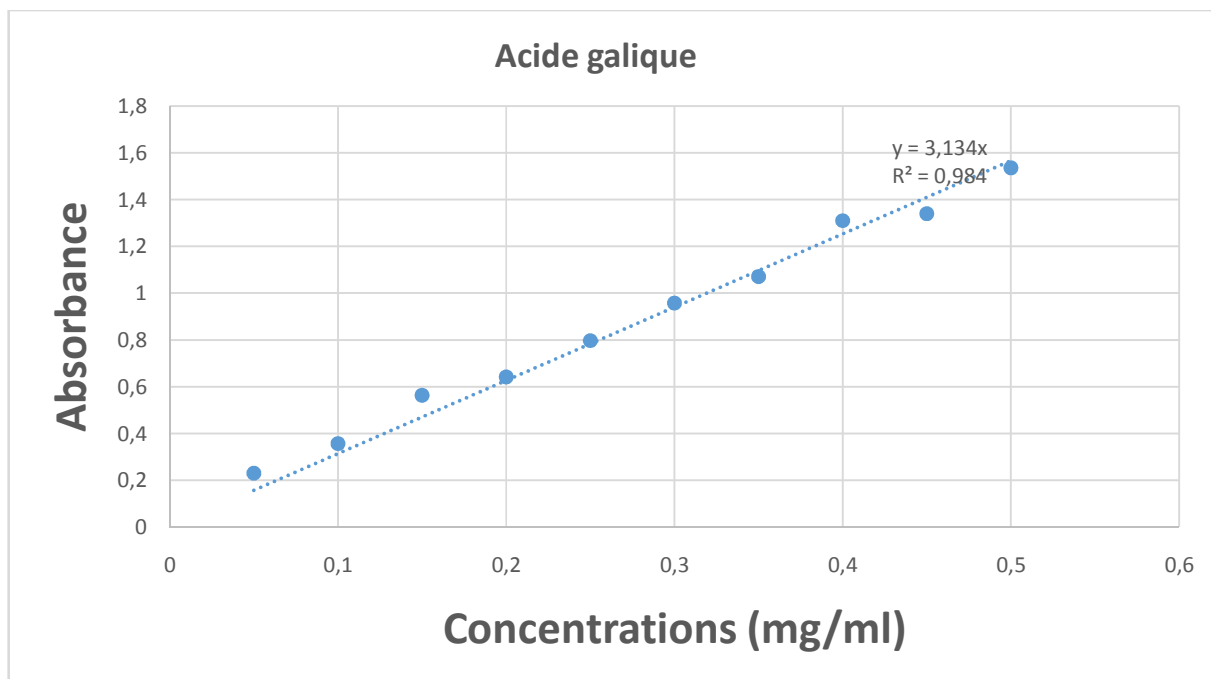


Figure 5 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

III.2.6.2. Dosage des flavonoïdes

a/ Principe de la méthode

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux dans les extraits a été déterminée par la méthode de Bahorun et al. (1996).

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium [60]. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons [61]

b/ Protocole expérimentale

La teneur totale en flavonoïde des extraits est mesurée selon la méthode spectrophotométrie [62]. 1ml de chlorure d'aluminium (2%) est ajouté à 1 ml de l'extrait puis incubé à l'obscurité pendant 20min à la température ambiante du laboratoire. La lecture de nos échantillons a été faite à 430 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Visible.

La teneur en flavonoïdes a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage ($y = ax + b$) de la quercétine à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons (Figure 06). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de quercétine par gramme de matière sèche.

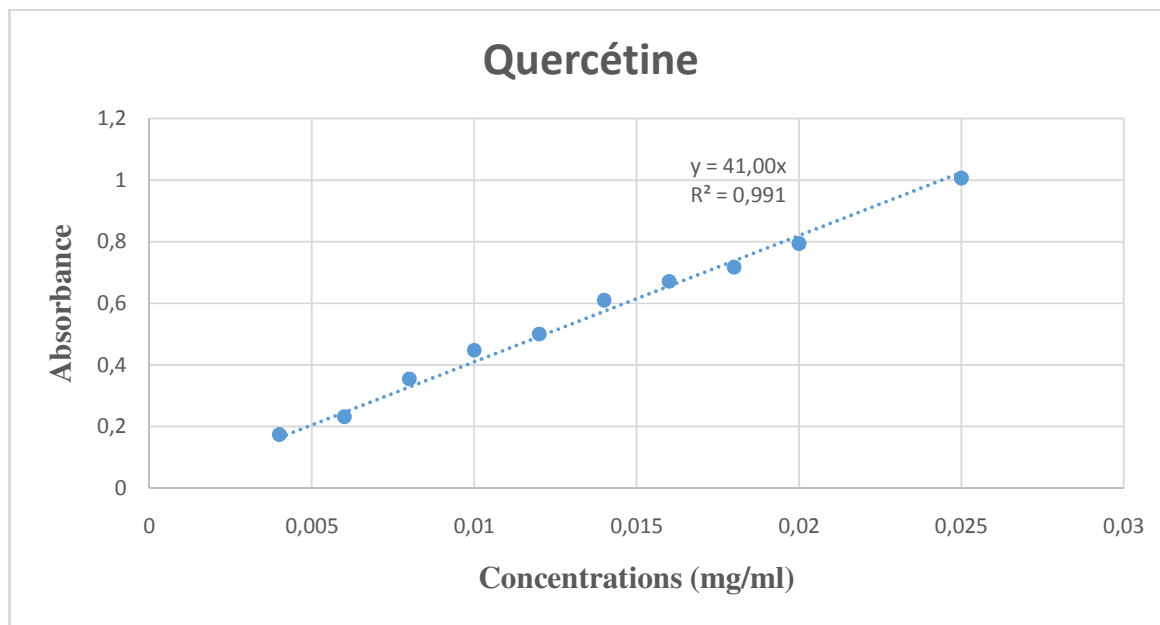


Figure 6 : Courbe d'étalonnage de Quercétine (mg/ml) pour le dosage des flavonoïdes.

III.2.7 Activité Antibactérienne :

Les tests antimicrobiens ont été réalisés, au niveau du laboratoire de Microbiologie, sur les extraits issus des solvants d'extraction (Hexane –Acétone – Méthanol - Acétone + eau –Méthanol + Eau – Eau), solubilisés dans le Diméthylsulfoxyde DMSO.

III.2.7.1. Germes cibles

Nos tests antibactériens ont été réalisés sur 07 souche de bactéries références (Tableau 05) :

- 1- *Escherichia Coli* « EC »
- 2- *Pseudomonas Aeruginosa* « PA »
- 3- *Staphylococcus Aureus* « SA »
- 4- *Klebsiella pneumoniae* « KP »
- 5- *Micrococcus luteus* « ML »
- 6- *Bacillus Cireus* « BC »
- 7- *Candida Albicans* « CA »

Les souches sont conservées à 5°C dans des boîtes à pétries stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné (gélose nutritive).

Tableau 3 : Origines des souches utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne.

<i>Souche microbienne</i>		<i>Gram</i>	<i>Code</i>	<i>Origine</i>
<i>Bactéries</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 6538	MNHN
	<i>Bacillus cereus 01</i>		ATCC 10876	/
	<i>Bacillus cereus 02</i>		ATCC 25921	LAPRONA
	<i>Micrococcus luteus</i>		ATCC 9341	MNHN
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	ATCC 27853	LAPRONA
	<i>Escherichia coli</i>		ATCC 8739	MNHN
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		IBMC Strasbourg	MNHN
<i>Levure</i>	<i>Candida albicans</i>		CIP 444	LAAPCSAB

Notre choix pour ces souches repose sur les critères suivants :

- 8- Ils sont très fréquemment dans l'environnement.
- 9- Ils sont très fréquemment isolés au niveau du laboratoire (fréquemment responsables de l'infection humaine).
- 10- Leur culture est facile et poussent sur des milieux ordinaires simple (ils ne sont pas des germes exigeants).
- 11- Ils sont des souches de référence c'est-à-dire des souches pathogènes connaissant leurs caractères vis-à-vis des ATB.

III.2.7.2 Protocole expérimental de l'activité antimicrobienne :

Dans notre expérience, la réalisation des tests antimicrobiens a été effectuée sur des milieux de cultures de gélose nutritive, de Muller-Hinton Agar et de gélose Sabouraud pour la levure, tout en débutant par la préparation de pré-cultures. Les différentes espèces bactériennes ont été repiquées et les colonies jeunes obtenues dans les tubes à essai, ont été ensemencées dans les boîtes de Pétrie afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum. Après cette étape, des boîtes de pétries stériles préalablement coulées et identifiées par des codes, sont ensemencées par étalage à l'aide d'un écouvillon stérile. Pour tester nos extraits de plantes, des disques de papier Wattman N°4 de 6 mm de diamètre, stériles (stérilisation à 120 C° pendant 20 min par autoclavage) préalablement préparés, sont imprégnés d'une goutte d'extrait (10µl par disque), ensuite déposés à la surface de la gélose inoculée. Un témoin a été établi, par imprégnation de disques d'une goutte de DMSO (10µl). Les boîtes sont ensuite posées dans le réfrigérateur pendant 2H pour une pré-diffusion, puis incubées dans l'étuve pendant 18 à 24H à 37C°. L'activité antibactérienne est déterminée en termes de diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques après 24H d'incubation à 37C°. A la sortie de l'incubation, la lecture des boîtes a été effectuée.

III.2.7.3 Lecture

Il est à noter que l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo d'inhibition autour du disque qui est relativement circulaire, dont le diamètre est mesuré et exprimé soit en cm, soit en mm.

- La sensibilité d'un germe est nulle (N) quand le diamètre est inférieur ou égale à 8mm.
- La sensibilité d'un germe est limitée (L) quand le diamètre est compris entre 8 et 14 mm
- La sensibilité d'un germe est moyenne (M) quand le diamètre est compris entre 14 et 20mm
- Le germe est très sensible (S) pour un diamètre supérieur ou égal à 20 mm

Le protocole utilisé est présenté dans le diagramme suivant (Figure 07) :

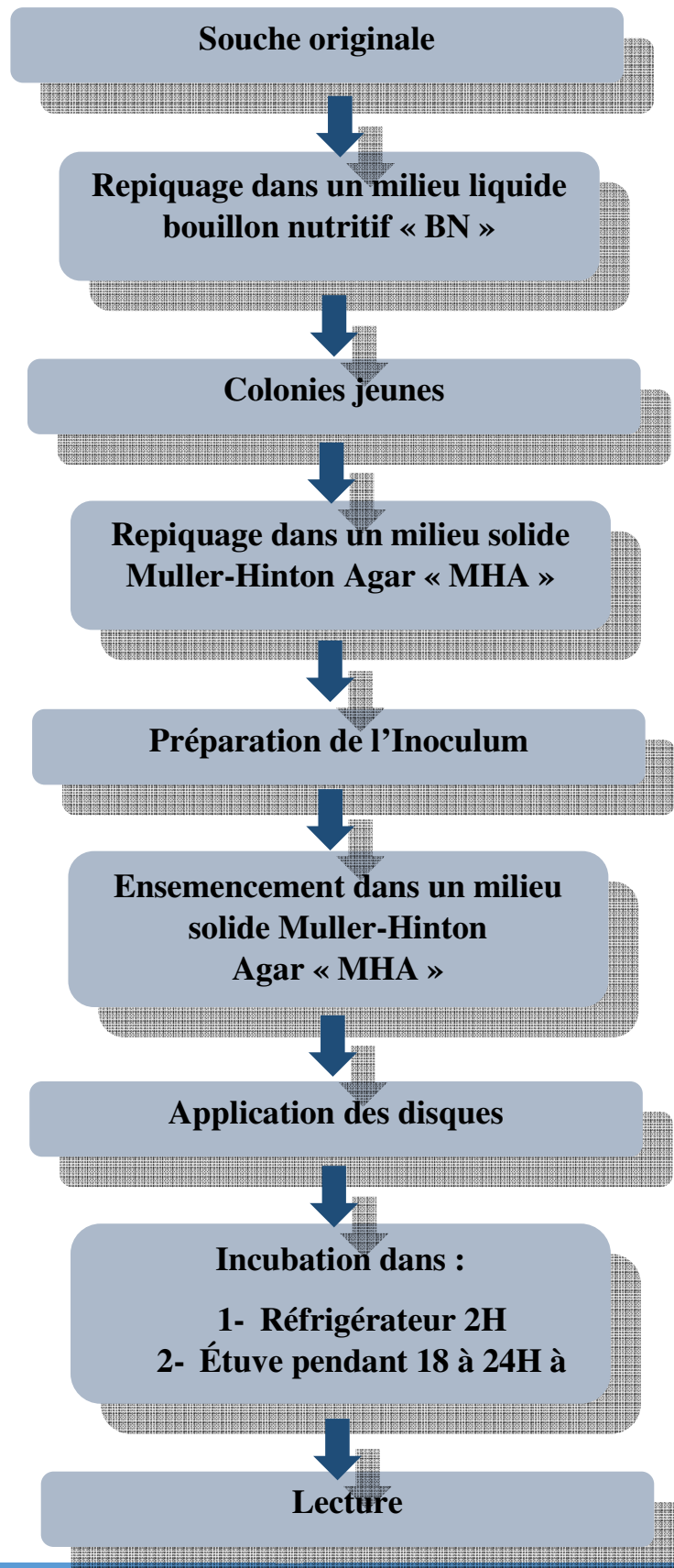


Figure 7: Diagramme illustrant les différents étapes du protocole expérimental de l'activité antibactérienne

III.2.7.4 L'antibiogramme

L'antibiogramme a pour but de prédire la sensibilité d'un microorganisme vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques. Cette sensibilité est exprimée par l'apparition de zones d'inhibition autour de ces disques.

Le tableau 4 montre les cinq antibiotiques utilisés dans les mêmes conditions expérimentales.

Tableau 4 : Les antibiotiques utilisés

Abréviation et concentration	L'antibiotique
NA : 30µg	Acide Nalidixique
IMI: 10µg	Imipenème
F : 300µg	Nitrofurantoïne
AML 30µg	Amoxicilline
AMP 10 µg	Ampicilline
Nys 10 µg	Nystatine



Chapitre VI
Résultats et discussion

VI. Résultats et discussion

VI.1 Rendement et concentration

L'extraction est une étape très importante pour l'isolement et l'identification des principes actifs ajoutée à partir de la matière végétale, notamment le cas des polyphénols, qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêt grâce à leurs activités biologiques diverses tels que leurs propriétés anti-oxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires.

Beaucoup d'études ont montré l'influence de différentes conditions d'extraction sur les rendements d'extraction des composés phénoliques d'origine végétale, tels que le temps et la température d'extraction, le pH, la composition chimique des échantillons et la polarité du solvant. [63]

Dans notre étude, l'hexane a été utilisé, en première phase, pour la dépigmentation puis les autres solvants (Méthanol, Acétones, Eau) pour l'extraction brute des polyphénols.

L'utilisation de différents solvants à polarité différente permet de séparer des composés selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. La méthode de sonication utilisant les ultrasons avec des fréquences ne dépassant pas les 20 kHz, à courte durée, augmente la perméabilité des parois cellulaires et permet d'extraire le maximum des composants bioactifs

Les rendements d'extraction pour les différents solvants utilisés sont indiqués dans le Tableau ci-dessus (Tableaux 5).

Tableau 5 : Les rendements et concentration d'extraits bruts par rapport aux différents solvants

Solvants	<i>Equisetum arvense</i> DK		<i>Haloxylon scoparium</i> RF		<i>Haloxylon scoparium</i> RD		<i>Cistus villosus</i> Cis	
	Rendement %	Concentration mg/ml	Rendement %	Concentration mg/ml	Rendement %	Concentration mg/ml	Rendement %	Concentration mg/ml
Hexane	3,064	15,32	7,044	35,22	2,608	13,04	13,756	68,78
Méthanol	4,928	24,64	11,562	57,81	10,82	54,1	16,542	82,71
Acétone	0,578	2,89	1,032	5,16	1,172	5,86	5,134	25,67
Méthanol + Eau	9,32	46,6	15,768	78,84	15,968	79,84	15,072	75,36
Acétone + Eau	6,484	32,42	13,254	66,27	14,582	72,91	15,532	77,66
Eau	9,23	46,15	15,324	76,62	12,98	64,9	11,072	55,36

D'après les résultats obtenus et pour l'ensemble des plantes étudiées, le rendement le plus élevé a été obtenu par le solvant Méthanol-eau (80-20 v/v), par contre l'Acétone (100%) représente le rendement d'extraction le plus faible. Pour le reste des solvants le rendement varie d'une plante à une autre (Figure 08).

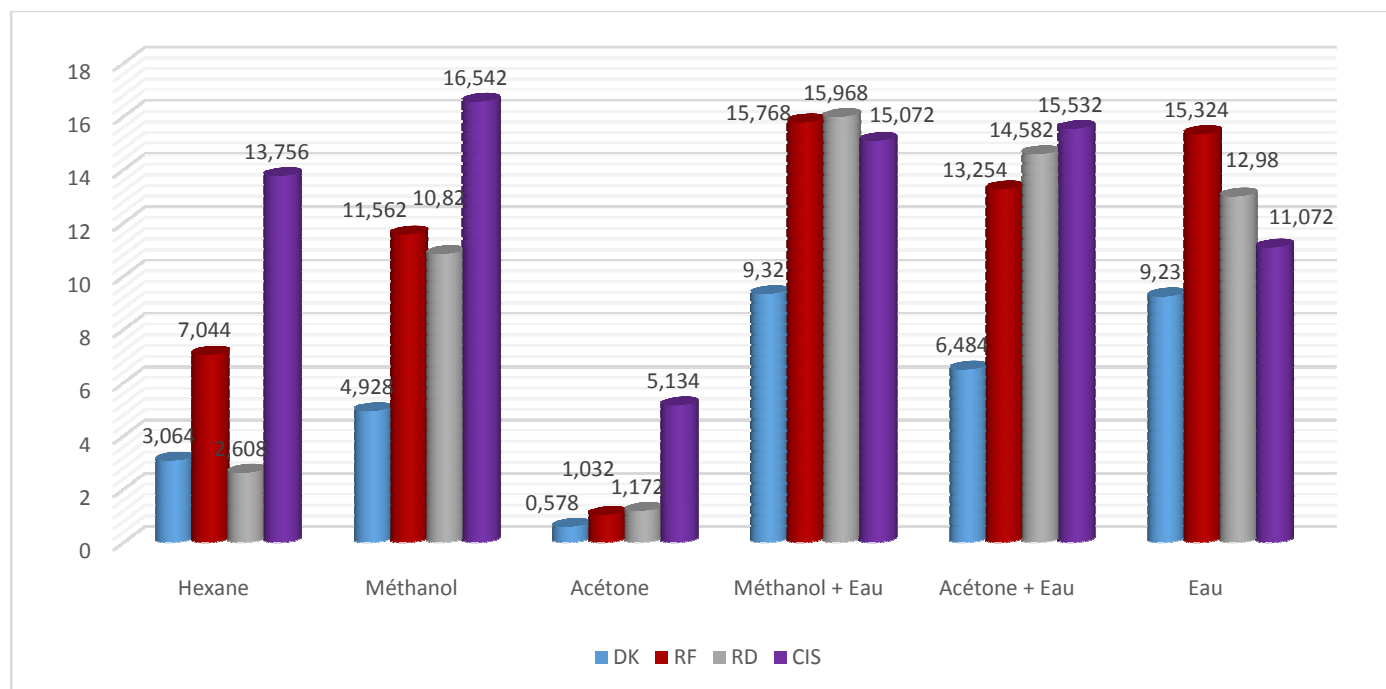


Figure 8 : histogrammes des rendements (%) des différents extraits bruts pour chaque plante

Il est à noter, aussi, que le rendement de l'hexane a été omis car il représente une valeur calculer par rapport à 25g de matière végétal macérée (voir chapitre matériel et méthodes). L'hexane a été utilisé pour la dépigmentation c.à.d. un solvant qui a servi d'éliminer les pigments chlorophylliens, caroténoïdes et les lipides et tout composé non phénolique.

VI.2 Dosage de polyphénols et Flavonoïdes

Il existe de nombreuses méthodes impliquées dans l'extraction et la quantification des constituants végétaux et chacune de ces méthodes à ses propres avantages et inconvénients [31]. La partie végétale utilisée, le solvant d'extraction et la procédure d'extraction sont les paramètres de base influençant la qualité d'un extrait [31]. En ce qui concerne nos extraits végétaux, la solubilisation a été faite dans du méthanol et la quantification de la teneur en composés phénoliques et flavonoïdes de chaque extrait a été estimée par spectrophotométrie.

D'après les résultats obtenus et pour l'ensemble des plantes étudiées, la teneur en polyphénols la plus élevée a été obtenue par le solvant Acétone-eau (70-30 v/v), par contre l'Acétone (100%) représente la teneur la plus faible. Pour le reste des solvants nous avons constaté une variation non prononcée de la teneur entre les différentes plantes (Figure 09). Concernant les Flavonoïdes et pour l'ensemble des plantes étudiées, la teneur varie d'une plante à une autre (Figure 10).

La quantité de phénols totaux la plus élevée a été observée dans l'extrait **Cis** (15.56 mg/ml) du solvant Acétone / Eau. De même, la plus forte teneur en flavonoïdes a été observée dans l'extrait de **Cis** du solvant Méthanol / Eau avec 0,79 mg/ml. Tandis que **DK** représente la valeur la plus faible chez les deux composés : phénoliques (0,41 mg/ml dans l'acétone) et flavonoïdes (0,05 mg/ml dans le Méthanol).

Ces différences en rendement et en composés phénoliques peuvent être attribuées à la polarité de solvant d'extraction [64]. L'utilisation de l'eau en combinaison avec des solvants organiques contribue à la création d'un milieu modérément polaire qui assure l'extraction des polyphénols [65], ce qui s'accorde avec nos résultats.

Selon, [13] nos plantes sont riches en composés phénolique par rapport à la même espèce ou d'autres espèces de même famille.

D'après nos résultats, la plante Cis a montré une corrélation importante entre le rendement, la teneur en composés phénoliques, et ceci pour différents extraits.

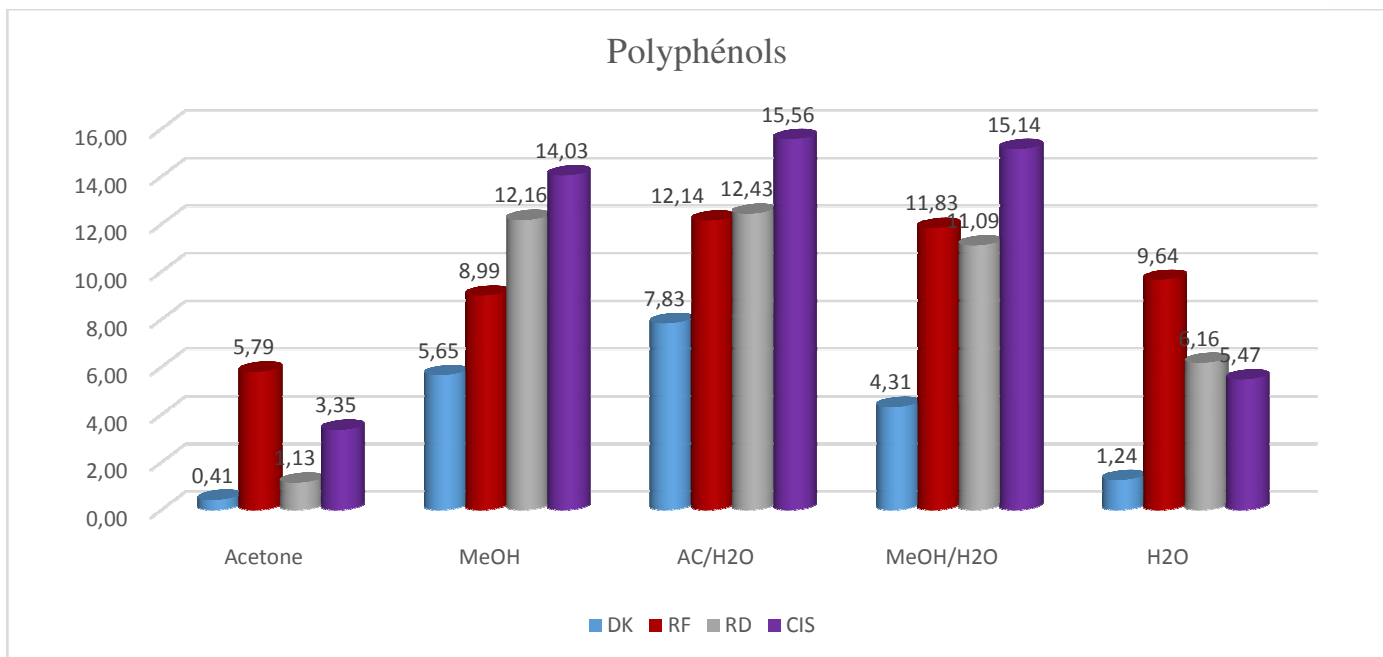


Figure 9 : La teneur en polyphénols pour chaque plante exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche.

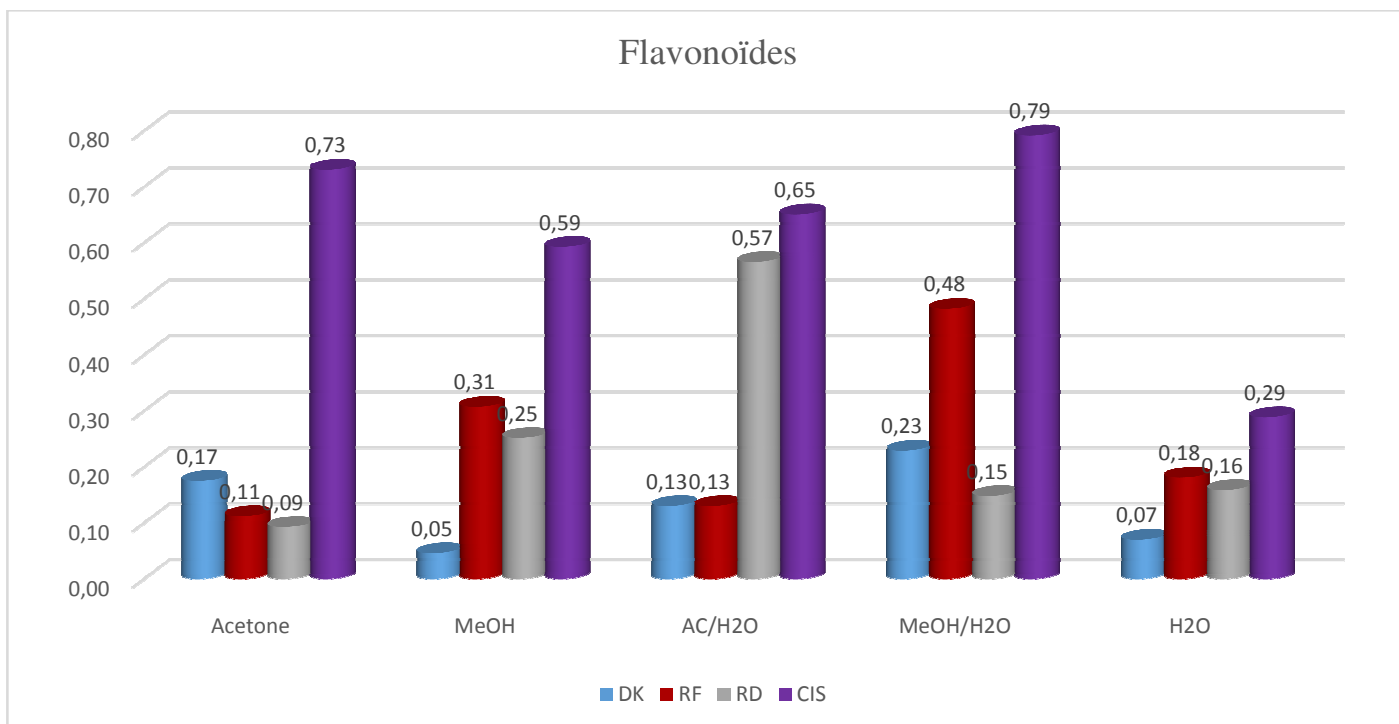


Figure 10 : La teneur en flavonoïdes pour chaque plante exprimée en milligramme équivalent de quercétine par gramme de matière sèche

VI.3 L'activité antibactérienne

VI.3.1 Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques

Pour une meilleure interprétation de nos résultats, des tests de sensibilité aux antibiotiques ont été réalisés. Le tableau 6 indique les valeurs, en millimètre, des zones d'inhibitions atteintes avec les différentes souches étudiées. Les résultats montrent que les cinq antibiotiques utilisés possèdent des effets distincts vis-à-vis des différentes souches bactériennes.

Tableau 6 : Activité antimicrobienne des antibiotiques et de l'antifongique standards exprimée par le diamètre d'inhibition en millimètre

Antibiotique	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)					
	Gram Négatif			Gram positif		
	<i>Ec</i>	<i>Pa</i>	<i>Kp</i>	<i>Sa</i>	<i>Bc</i>	<i>Ml</i>
NA : 30µg	20,92±0,1272	6±0	17,55±0,325	11,095±0,304	17,99±4,2284	6±0
IMI: 10µg	6±0	6±0	6±0	18,05±0,763	6±0	24,275±0,304
F : 300µg	23,785±1,393	6±0	20,07±0,183	20,595±0,629	21,615±1,081	6±0
AML:30µg	13,245±0,304	6±0	6±0	42,08±0,593	6±0	56,75±1,0606
AMP:10 µg	19,68±1,442	8±2,828	6±0	38,535±0,148	6±0	41±1,414
<i>Candida albicans</i> (CIP 444)						
Nys: 10 µg	26,5 ±1,124					

Les résultats de l'antibiogramme montrent que les cinq antibiotiques possèdent des effets distincts sur les bactéries testées ou d'une autre manière que les différentes souches bactériennes réagissent différemment aux antibiotiques testés.

Selon Duraffourd et *al.* (1990) [69] la sensibilité d'un germe est nulle pour un diamètre inférieur ou égal à 8 mm ; la sensibilité est limitée pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm. Elle est moyenne pour un diamètre entre 14 et 20 mm. Pour un diamètre supérieur ou égal à 20 mm le germe est très sensible.

Selon cette classification et d'après les résultats indiqués dans le Tableau 06, il a été constaté que parmi les souches étudiées à Gram Négatif *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* se révèlent résistantes vis-à-vis de la plupart des antibiotiques testés. La bactérie *Ec* est résistante seulement à l'IMI.

Concernant les souches à Gram ⁺, *Sa*, est sensible pour les cinq antibiotiques, tandis que *Ec* est plus ou moins résistante. *Ml* sensibilité élevée à l'AML, l'IMI et l'AMP mais résistante vis-à-vis de l'AN et F.

D'après ces résultats nous remarquons que les bactéries à gram positif sont plus sensibles à la majorité des antibiotiques testés par rapport aux bactéries à Gram Négatif. Nos résultats sont similaires par rapport à ceux trouvés par Yakhlef et al [66].

La levure *Ca* est très sensible à la nystatine où un diamètre d'inhibition d'environ 26 mm est mesuré. Ce résultat est similaire par rapport à celui trouvé par Naeimi et al. [67].

VI.3.1 Activité antimicrobienne des différents extraits des plantes.

Les résultats des tests de sensibilité microbienne des extraits bruts de nos plantes extraites sont regroupés dans les (Tableaux 07-08-09-10). Les valeurs indiquées ont été estimées en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques imbibés d'extraits vis-à-vis des sept (07) germes microbiens (03 bactéries Gram ⁺ et 03 Gram ⁻ et une levure) sur un milieu gélosé solide Mueller-Hinton Agar. Le diamètre (en mm) de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre.

D'après les premières observations, nous notons que l'ensemble de nos extraits bruts ont réagi tous de manière positive sur au moins une des souches microbiennes testées.

Nous remarquons, aussi que la plante **Cis** est douée de propriétés antimicrobiennes très appréciées, car la plupart des souches microbiennes testées présentent une sensibilité vis-à-vis de son extrait sauf pour EC. A l'inverse, la plante RF montre une certaine activité antimicrobienne négative pour les différentes souches microbiennes à l'exception de la levure **Ca** qui a donné des résultats remarquables et pour tous les solvants avec une zone d'inhibition maximale de 22,30 mm de diamètre.

Concernant les souches bactériennes, la souche **Kp** n'a donné aucune zone d'inhibition, avec toutes les plantes, sauf pour la plante **CIS** et uniquement avec le solvant Acétone/Eau avec un diamètre

14.44mm. Il est à signaler, aussi, qu'il n'y a aucune souche qui s'est trouvée sensible avec tous les solvants.

Dans notre expérience, les souches à Gram ⁺ sont les souches les plus sensibles par rapport aux souches Gram ⁻, ce qui s'accorde avec la littérature. Cette sensibilité est due essentiellement à la structure plus simple de la paroi des Gram ⁺, reliant la sensibilité des Gram ⁺ aux poly phénols, soit à l'inhibition des enzymes nécessaires à la production de l'énergie dans la cellule bactérienne, soit au changement au niveau de la perméabilité de la cellule et aussi à l'inhibition de la synthèse de l'ARN [46, 3]. Par contre la résistance des Gram ⁻ est due principalement à la structure complexe de la paroi des bactéries testées où le peptidoglycane qui est très fin et associé à une enveloppe externe définissant un espace péri-plasmique (voir Figure 11 ;Annexe 04). Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines) et de lipopolysaccharides (LPS). L'espace périplasmique est généralement pourvu d'une gamme d'enzymes capable de protéger la bactérie en dégradant toute substance toxique pour elle, comme les antibiotiques, les métaux lourds [68].

Pour les solvants, les extraits de l'Acétone /Eau et de Méthanol, des différentes plantes, ont donné des résultats remarquables avec les différentes souches.

Tableau 7: Activité antimicrobienne de différents extraits de la plante *Cistus villosus*

	<i>Diamètre de la zone d'inhibition (mm)</i>					
	Acétone	Méthanol	Hexane	Acétone + Eau	Méthanol + Eau	Eau
<i>Ec</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Ml</i>	14.26 ± 0.26*	9.75 ± 0.16	11.18 ± 0.17	9.60 ± 0.31	9.82 ± 0.20	12.18 ± 0.20
<i>Bc-1</i>	7.18 ± 0.23	10.35 ± 0.12	9.55 ± 0.08	9.35 ± 0.21	9.82 ± 0.10	13.15 ± 0.13
<i>Kp</i>	-	-	-	14.44 ± 0.37	-	-
<i>Sa</i>	-	10.44 ± 0.06	-	8.76 ± 0.15	8 ± 0.06	11.06 ± 0.37
<i>Bc-2</i>	8.31 ± 0.26	10.27 ± 0.11	11.49 ± 0.26	11.85 ± 0.01	9.99 ± 0.16	13 ± 0.28
<i>Pa</i>	-	9.01 ± 0.37	12.45 ± 0.50	9.05 ± 0.09	8.14 ± 0.11	8.41 ± 0.23
<i>Ca</i>	-	18.60 ± 0.53	7.97 ± 0.27	20.77 ± 0.14	18.55 ± 0.18	18.43 ± 0.77

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

Tableau 8: Activité antimicrobienne de différents extraits de la plante *Equisetum arvense*.

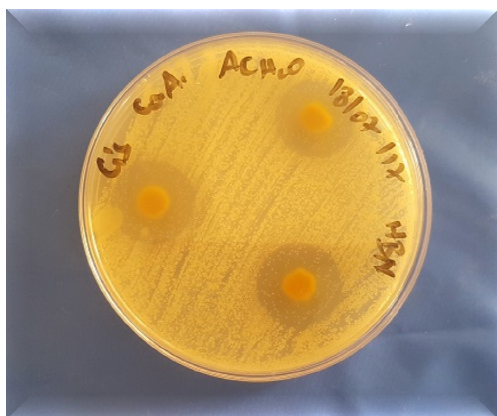
	<i>Diamètre de la zone d'inhibition (mm)</i>					
	Acétone	Méthanol	Hexane	Acétone + Eau	Méthanol + Eau	Eau
<i>Ec</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Ml</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bc-1</i>	8 ± 0.58	9,96 ± 0.88	8,33 ± 1,33	10,33 ± 0.88	9.67 ± 0.67	-
<i>Kp</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Sa</i>	-	6,67 ± 0.33	-	9,33 ± 0.88	-	-
<i>Bc-2</i>	Non testées « NT »					
<i>Pa</i>						
<i>Ca</i>						

Tableau 9: Activité antimicrobienne de différents extraits de la plante *Haloxylon scoparium* en phase de dormance.

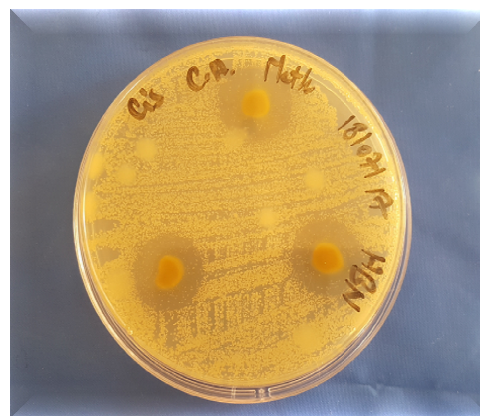
	<i>Diamètre de la zone d'inhibition (mm)</i>					
	Acétone	Méthanol	Hexane	Acétone + Eau	Méthanol + Eau	Eau
<i>Ec</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Ml</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bc-1</i>	7 ± 1	6.67 ± 0.33	-	-	-	-
<i>Kp</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Sa</i>	-	7.67 ± 0.88	-	8.67 ± 0.33	-	-
<i>Bc-2</i>	Non testés « NT »					
<i>Pa</i>						
<i>Ca</i>						

Tableau 10 : Activité antimicrobienne de différents extraits de la plante *Haloxylon scoparium* en phase de floraison

	<i>Diamètre de la zone d'inhibition (mm)</i>					
	Acétone	Méthanol	Hexane	Acétone + Eau	Méthanol + Eau	Eau
<i>Ca</i>	6.62 ± 0.01	15.51 ± 0.47	-	14.84 ± 0.58	22.30 ± 0.50	15.53 ± 0.23
<i>Un test négatif a été observé pour les autres Souches</i>						



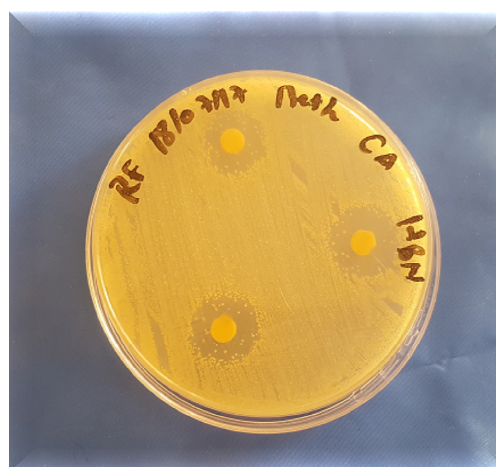
a/ Zone d'inhibition de la plante CIS du solvant Act/eau sur la souche Ca.



b/ Zone d'inhibition de la plante CIS du solvant Méthanol sur la souche Ca.



c/ Zone d'inhibition de la plante CIS du solvant Meth/eau sur la souche Ca.



d/ Zone d'inhibition de la plante RF du solvant Méthanol sur la souche Ca.

Figure 11 : Les zones d'inhibition sur la souche CA (a-b-c-d)

En général la sensibilisation des souches dépend de la zone d'inhibition autour des disques qui apparaît dans les boîtes de Pétri (Figure 12). Les résultats obtenus diffèrent d'une plante à une autre et d'un solvant à un autre d'où nous remarquons que la zone la plus faible et la plus grande ont été exprimé par la même plante RF avec des diamètres de 6.62 mm de 22.30 mm respectivement et ceci vis-à-vis de la levure *Ca.*; par ailleurs dans la plante Cis, les diamètres sont compris entre 7.18 mm

dans le solvant Acétone pour la souche *Bc*-1 et d'un diamètre d'inhibition de 20.77 mm pour le solvant acétone / Eau contre la souche *Ca*.

Selon le classement de sensibilité avancé par Duraffourd et *al.* (1990) [69], nos résultats montrent que toutes les souches microbiennes testées présentent une sensibilité à majorité limitée et que les extraits de *Cis* sont les plus actifs avec une sensibilité moyenne pour les souches bactériennes et à très sensible pour le *Ca*.

En comparaison avec les antibiotiques, la majorité des zones d'inhibitions chez nos extraits bruts sont comprises entre 6 et 10mm, par contre celles des antibiotiques la majorité est supérieurs à 15 mm.

Le résultat de *Cis* s'accorde avec ceux rapportés par [14]. Le pouvoir antimicrobien de nos extraits bruts est tributaire de leurs compositions chimiques. Les composés phénoliques et flavonoïdes ont été prouvés d'être des agents antimicrobiens et antifongiques [70, 71].

Les extraits de l'hexane semblent avoir un effet intéressant sur la souche *Pa*, ce qui élimine l'effet des composés phénoliques, dans ce cas, et favorise les autres composés tels que les pigments, sucres et lipides, ce qui mérite d'être suivi.



Conclusion

Conclusion :

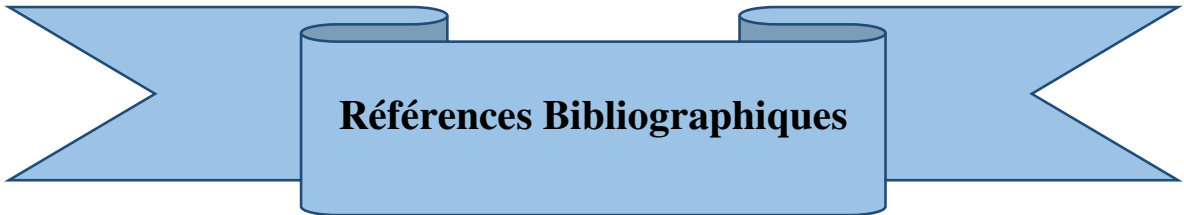
Au terme de ce travail, nous pouvons dire que les plantes contiennent de nombreuses molécules bioactives douées d'une activité antimicrobienne importante et parmi ces constituants les composés phénoliques et les flavonoïdes.

Nous avons essayé de contribuer à la valorisation de trois plantes de l'Atlas Algérien utilisés dans la médecine traditionnelle de la région et ceci par l'étude de leur pouvoir antimicrobien. Il s'agit des plantes : *Arthrophytum scoparium*, *Equisetum arvense* et *Cistus villosus*. Ces plantes étant soumises à des tests antimicrobiens, vis-à-vis de plusieurs souches bactériennes et une levure, ont montré que toutes les souches microbiennes testées présentaient une sensibilité à majorité limitée et que les extraits de *Cistus villosus* sont les plus actifs avec une sensibilité moyenne à très sensible pour le *Candida albicans*.

Il s'est avéré que l'utilisation de la méthode des disques dans notre cas a montré un effet distinctif des souches à Gram positif par rapport aux souches à Gram Négatif. L'espèce la plus résistante est l'*Escherichia Coli*.

Le pouvoir antimicrobien de nos extraits bruts est tributaire de leurs compositions chimiques. Les résultats d'extraction et du dosage des polyphénols totaux ont montré que leur teneur n'est pas stable, et varie d'une espèce à une autre, et d'un solvant à un autre. Elle a été plus importante chez les échantillons du solvant Acétone-eau et plus faible pour l'Acétone (100%).

Les résultats de notre mémoire consolident le fait que le domaine des composés phénoliques reste un domaine très intéressant ouvert à la recherche et que les extraits de plantes restent une source importante pour l'identification ultérieure de produits naturels bioactives qui peuvent acheminer au développement de nouveaux agents antimicrobiens.



Références Bibliographiques

Références Bibliographiques :

- [1] Middleton, E., Kandaswami, C., (1994). The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implication for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne, J.B. (Ed.), *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*. Chapman and London, Hall, pp. 619–952. *In situ* Hassiba Metrouh-Amir, Catarina M.M. Duarte, Fadila Maiza (2015). Solvent effect on total phenolic contents, antioxidant, and antibacterial activities of *Matricaria pubescens*. *Industrial Crops and Products*. 67, 249–256
- [2] Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., Capasso, F., 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci*. 65, 337–353. *In situ* Hassiba Metrouh-Amir, Catarina M.M. Duarte, Fadila Maiza (2015). Solvent effect on total phenolic contents, antioxidant, and antibacterial activities of *Matricaria pubescens*. *Industrial Crops and Products*. 67, 249–256
- [3] Cowan, M.M., (1999). Plants products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 564–582.
- [4] Daglia M (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23 :174–181.
- [5] Stéphane Dorsaz,^a Tiia Snäkä,^a Quentin Favre-Godal,^b Pierre Maudens,^b Nathalie Boulens,^b Pascal Furrer,^b Samad Nejad Ebrahimi,^e Matthias Hamburger, Eric Allémann,^b Katia Gindro,^d Emerson Ferreira Queiroz,^b Howard Riezman, ^c Jean-Luc Wolfender,^b Dominique Sanglard (2017). Identification and Mode of Action of a Plant Natural Product Targeting Human Fungal Pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Volume 61 Issue 9 e00829-17
- [6] Djabali S (2012). Effet des polyphénols sur la résistance à l'infestation fongique dans le grain d'haricot sec. Mémoire de magister en sciences alimentaires (I.N.A.T.A.A), Université Mentouri-Constantine
- [7] Marion Grare (2009). De la genèse d'une nouvelle classe d'antibactériens à base de polyphénols cycliques de type calixarène : études moléculaire(s), cellulaires(s) et structurale(s) en vue de l'identification des cibles d'action : le cas du para-guanidinoéthylcalixarène. Thèse de doctorat en Pharmacologie, Nancy 1
- [8] Nostro, A., Germanò M. p., D'Angelo V., Marino, A. et Cannatelli, M.a. (2000) Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lettres en microbiologie appliquée*. 30 (5), p379.
- [9] Schnaubelt K. 1998 *Advanced Aromatherapy*. Vermont: Healing Arts Press.

- [10] Farid baba Aissa. (2011) Encyclopédie des plantes utiles. ISBN : 978-9961-48-714-3
- [11] Iserin, P, 2001. Larousse Encyclopédie des plantes médicinales. Ed Larousse, pp10, 335.
- [12] Mohammedi Zohera (2006). Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie. Université Abou Baker Blkaid Tlemecen.
- [13] Khacheba, I., Djeridane, A., Yousfi, M. (2014). Twenty Traditional Algerian Plants Used in Diabetes Therapy as Strong Inhibitors of α -Amylase Activity. International Journal of Carbohydrate Chemistry, Article ID 287281, 12 pages
- [14] H. Bouamama el, J. Villard, A. Benharref, M. Jana. (2006). Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. Journal of Ethnopharmacology 104, 104–107
- [15] Chinou, I., Demetzos, C., Harvala, C., Roussakis, C., Verbist, J.F., 1994. Cytotoxic and antibacterial labdane-type diterpenes from the aerial parts of *Cistus incanus* subsp. creticus. Planta Medica, 60, 34–36.
- [16] Polunin, O., 1969. Flowers of Europe a Field Guide. Oxford University Press, Oxford, p. 254.
- [17] Dimas, K., Demetzos, C., Angelopoulou, D., Kolokouris, A., Mavromoustakos, T., 2000. Biological activity of myricetin and its derivatives against human leukemic cell lines in vitro. Pharmacological Research 42, 475–478.
- [18] Yesilada, E., U˘ stu˘n, O., Sezik, E., Takaishi, Y., Ono, Y., Honda, G., 1997. Inhibitory effects of Turkish folk remedies on inflammatory cytokines: interleukin-1 α , interleukin-1 β and tumour necrosis factor α . Journal of Ethnopharmacology 58, 59–73.
- [19] Singh, M., Pal, M., Sharma, R.P., 1998. Biological activity of labdane diterpenes. Planta Medica 65, 2–8.
- [20] Demetzos, C., Dimas, C., Hatziantoniou, S., Anastasaki, T., Angelopoulou, D., 2001. Cytotoxic and anti-inflammatory activity of labdane and cisclerodane type diterpenes. Planta Medica 67, 614–618.
- [21] Lutge U., Kluge M., Bauer G. (2002). Botanique 3ème Ed : Technique et documentation Lavoisier. Paris. 211p. (Lutge et al., 2002 ; Abderrazak et Joël., 2007)
- [22] Abderrazak M. et Joël R. (2007). La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. 177p.
- [23] Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3ème Ed Techniques et documentations. Paris. pp: 227-310-312-313-314.494
- [24] Lugasi A., Hovari J., SagiK., and Biro L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. J.Acta.biologica. szegediensis. 47 (1-4):119-125. (Cited inMohammedi Z, 2005) (Lugasi et al., 2003).
- [25] King A. and Young G. (1999). characteristics and occurrence of phenolic Phytochemicals. J of the

- American dietetic association.99:213-218. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).
- [26] Tapiero H., Tew K.D., Nguyen B.G., and Mathé G. (2002). Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies; *Biomed.pharmacother.* 56: 200-207. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).
- [27] Boizot N. and Charpentier.J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en Composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra.* Pp 79-82. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).(Boizot et Charpentier., 2006).
- [28] Nour-Eddine Es-Safi (2012). *Plant Polyphenols: Extraction, Structural Characterization, Hemisynthesis and Antioxidant Properties, Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0203-8.
- [29] Kanti Bhooshan Pandey and Syed Ibrahim Rizvi. (2009) *Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2:5, 270-278.
- [30] K. Sahira Banu Dr. L. Cathrine. (2015) *General Techniques Involved in Phytochemical Analysis International Journal of Advanced Research in Chemical Science (IJARCS) Volume 2, Issue 4, PP 25-32 ISSN 2349-039X (Print) & ISSN 2349-0403 (Online)*
- [31] Prashant Tiwari, Bimlesh Kumar, Mandeep Kaur, Gurpre et Kaur, Harleen Kaur (2011) *Phytochemical screening and Extraction: A Review internationale pharmaceutica sciencia jan-march 2011 | vol. 1 | issue 1*
- [32] Yakhlef Ghania (2009-2010). Thèse de mémoire master *Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de Thymus vulgaris L. et Laurus nobilis L.* universite el hadj lakhdar –Batna.
- [33] James Hamuel Doughari (2012). *Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents, Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0296-0,
- [34] Liu, R.H. (2004). *Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of Action. Journal of Nutrition.* 134(12 Suppl):3479S-3485S. *Cited in James Hamuel Doughari (2012). Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents, Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0296-0
- [35] Jakhetia, V.; Patel, R., Khatri, P., Pahuja, N., Garg, S., Pandey, A. & Sharma, S.A. (2010). *Cinnamon: a pharmacological review. Journal of Advanced Scientific Research.* 1(2): 19- 23. *Cited in James Hamuel Doughari (2012). Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents, Phytochemicals - A Global Perspective of Their*

Role in Nutrition and Health, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0296-0.

- [36] Aggarwal, B.B. & Shishodia, S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemistry and Pharmacology*. 71:1397–1421. Cited in James Hamuel Doughari (2012). *Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents*, *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0296-0
- [37] Francis, M. S.; Wolf-Watz, H., & Forsberg, A. (2002). Regulation of type III secretion systems. *Current Opinion in Microbiology*. 5(2):166–172. Cited in James Hamuel Doughari (2012). *Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents*, *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0296-0
- [38] Nauciel. C., and Vildé J.L. (2005). *Bactériologie médicale*, 2èmeEd. Masson. Paris. pp: 5-10. Cited in Boudjouref Mourad. (2011). Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Mémoire de magister en Biochimie Université Ferhat Abbas, Sétif
- [39] Garcia-Ruiz A., Bartolomé B., Martinez-Rodriguez A.J., Pueyo E., Martin-Alvarez P.J., and Moreno-Arribas M.V. (2008). Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*. 19 : 835–841. Cited in Boudjouref Mourad. (2011). Étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Mémoire de magister en Biochimie Université Ferhat Abbas, Sétif
- [40] Kempf S. Zeitouni. (2009). Coût biologique de la résistance aux antibiotiques: analyse et conséquences *Pathologie Biologie* : article in press. Cited in Boudjouref Mourad. (2011). Étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Mémoire de magister en Biochimie Université Ferhat Abbas, Sétif
- [41] Jürgen R., Paul.S., Ulrike S., and Reinhard S. (2009). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties– an Overview: *Forsch Komplement-med*.16: 79–90. Cited in Boudjouref Mourad. (2011). Étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Mémoire de magister en Biochimie Université Ferhat Abbas, Sétif
- [42] Huang Guangrong., Jiang Jiabin. and Dai Dehui. (2008). Antioxidative and antibacterial activity of the methanol extract of *Artemisia anomala* S. Moore. *African Journal of Biotechnol*.7 (9): 1335-1338. Cited in Boudjouref Mourad. (2011). Étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Mémoire de magister en Biochimie Université Ferhat Abbas,

Sétif

- [43] Hassiba Metrouh-Amir, Catarina M.M. Duarte, Fadila Maiza (2015). Solvent effect on total phenolic contents, antioxidant, and antibacterial activities of *Matricaria pubescens*. *Industrial Crops and Products*. 67, 249–256
- [44] Bergogne-Berezin E., Dellamonica P. (1995) *Antibiothérapie en pratique clinique*. Ed Masson, Paris, 486 p.
- [45] Billing J., Sherman P. W. (1998) Antimicrobial function of spices. *Q Rev Biol*. 73: 3-49.
- [46] Bousseboua H. *Eléments de Microbiologie*. Edition 2005 campus club. Pages 213-215
- [47] S L Percival, R M Chalmers, M Embrey, P R Hunter, J. Sellwood, P. Wyn-Jones. (2004) *Microbiology of Waterborne Diseases* Patrick. ISBN 0-12-551570-7
- [48] Steven. P., Rachel. C., Martha. E., Paul. H., Jane. S., and Peter W.J. (2004). *Microbiology of Waterborne Diseases*. Ed Elsevier Academic Press. pp71-132.
- [49] Teyssou, P. Hance, E. Nicand, J.Y. Nizou, Y. Buisson. (1998). Les infections à *Bacillus cereus* : bactériologie, clinique et traitement. *La Lettre de l'Infectiologue - Tome XIII - n° 3*
- [50] Cohn, F., (1872). Untersuchungen über Bakterien. *Beitr Biol Pflanz* 1:127–244.
- [51] Baird-Parker, A. C. (1965). The classification of *Staphylococcus* and *Micrococcus* from world-wide sources. *Journal of General Microbiology* 38:363-87.
- [52] Rosypal, S., Rosypalová, A., Horejs, J., (1966). The classification of *Micrococcus* and *Staphylococcus* based on their DNA base composition and adansonian analysis. *Journal of General Microbiology*. 44:281-92.
- [53] Stackebrandt, E., Koch, C., Gvozdiak, O., Schumann, P., (1995). Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45(4):682-92.
- [54] Fuerst F. (1976) *Microbiologie Clinique*. Ed HRW Québec. 507 p.
- [55] Pieri F., Kirkiacharian S. (1992) *Pharmacologie et Thérapeutique*, 2ème édition Marketing. Paris. 443 p.
- [56] Singleton V.L., Orthofer R., and Lamuela-Raventos R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteu reagent. *Method.Enzymol.* 299 : 152-178.
- [57] Singleton, V.L.; Ross, J.A. (1956) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic– phosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144-158.

- [58] Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P., Sudraud, P. (1972) Analyse et contrôle des vins. Tome 1. In : Sciences et techniques du vin : traité d'œnologie. Paris : Dunod
- [59] Vermerris W., et Nicholson R. (2006), Phenolic compounds biochemistry. Springer science.netherlands. 276p.
- [60] Boulekbache L. (2005), Profil GC-MS des polyphénols d'une plante médicinale *Eucalyptus globulus*. Mémoire de Magister. Université de Bejaïa. 71p.
- [61] Ribéreau-Gayon J, Peynaud m, Ribéreau-Gayon P et Sudraud P. (1972), Sciences et techniques du vin. Tome 1, analyse et controle des vins. Ed. Dunod, Paris, p. 671.
- [62] Kim D., Chun O., Kim Y., Moon H., et Lee C. (2003), Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J. Agric, Food Chem.*, 51(22), 6509-6515.
- [63] Jayaprakasha G et Patil B. (2007), In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange, *Food Chemistry*, 101: 410-418
- [64] Negi P., Chauhan A., Sadia G., Rohinishree Y., et Ramteke R. 2005, Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) seed extracts, *Food Chemistry*, 119-124.
- [65] Liyana-Pathirana C et Shahidi. 2005, Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology, *Food Chemistry*, 93: 47-56.
- [66] G. Yakhlef, S. Laroui, L. Hambaba, M.-C. Aberkane, A. Ayachi. (2011). Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine. *Phytothérapie* 9:209-218
- [67] A.Naeini A.R.KhosraviM.ChitsazH.ShokriM.Kamlnejad. (2009) Anti-Candida albicans activity of some Iranian plants used in traditional medicine. *Journal de Mycologie Médicale* Volume 19, Issue 3, Pages 168-172
- [68] Djaballah, Z et Brahim, F. 2011. Etude de l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait polyphénolique de *Tamarix gallica.L.* Ingénieur d'état : Université de Djelfa P 68
- [69] Duraffourd C., D'Hervicourt L., Lappraz J.C : 1990. Cahiers de phytothérapie clinique. Examen de laboratoire galénique. Elements thérapeutiques synergiques. 2ème édition Masson (Paris), 87 pp.
- [70] Maria Daglia. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23:174–181
- [71] Stéphane Dorsaz, Tiia Snäkä, Quentin Favre-Godal, Pierre Maudens, Nathalie Boulens, Pascal Furrer, Samad Nejad Ebrahimi, Matthias Hamburger, Eric Allémann, Katia Gindro, Emerson Ferreira Queiroz, Howard Riezman, Jean-Luc Wolfender, Dominique Sanglard. (2017). Identification and

Mode of Action of a Plant Natural Product Targeting Human Fungal Pathogens. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Volume 61 Issue 9 e00829-17



Annexes

Annexe 01

Tableau 11 : Aspects et Couleurs des Extraits de nos plantes

Extraits	DK		RD		RF		CIS	
	Couleur	aspect	Couleur	aspect	Couleur	aspect	Couleur	aspect
Hexane	Vert	Pâteux	Vert claire	Pâteux	Vert	Pâteux	Vert foncé	Pâteux
Acetone	Vert claire	Pâteux	Vert claire	Pâteux	Vert foncé	Pâteux	Vert foncé	Pâteux
Méthanol	Vert foncé	Pâteux	Vert foncé	Pâteux	Marron foncé	Pâteux	Vert foncé	Pâteux
Ac/ Eau	Vert foncé	Pâteux	Marron	Pâteux	Marron foncé	Lyophilisé	Marron foncé	Lyophilisé
Meth / Eau	Marron	Pâteux	Marron	Lyophilisé	Marron foncé	Lyophilisé	Marron foncé	Lyophilisé
Eau	Marron foncé	Pâteux	Vert foncé	Pâteux	Marron foncé	Lyophilisé	Marron foncé	Lyophilisé

Annexe 02




Tableau 12 : Description et pouvoir pathogène des souches testées

Groupe de germes	Espèces	Habitat préférentiel	Infections hospitalières les plus fréquentes
Bacillus gram (-)	Escherichia coli « EC »	Matières fécales aliments contaminés eaux usées	<ul style="list-style-type: none"> ● Infection urinaires ● Plaies ● Septicémies ● Infection respiratoires ● Infection pulmonaires et urinaires
	Pseudomonas Aeruginosa « PA »	Sol, eau, plantes voies respiratoires matières fécales réfrigérateurs appareil sanitaires	<ul style="list-style-type: none"> ● Brulures ● Plaies ● septicémies ● Infection pulmonaires et urinaires
	Klebsiella pneumoniae « KP »	Matières fécales voies aériennes supérieures aliments contaminés	<ul style="list-style-type: none"> ● Plaie ● Septicémies
Bacillus gram (+)	Bacillus cereus « BC »	Sol, poussières eaux aliments, laits (en poudre) Sol, Peaux, cheveux	<ul style="list-style-type: none"> ● Intoxication alimentaires ● Septicémies chez les immunodéprimés
Cocci gram (+)	Staphylococcus aureus « SA »	Nasopharynx	<ul style="list-style-type: none"> ● Infection cutanées, plaies, brulures, abcès
		Périnée	<ul style="list-style-type: none"> ● Ostéites, ostéomyélites
		Poussières, air	<ul style="list-style-type: none"> ● Endocardites
		Aliments contaminés	<ul style="list-style-type: none"> ● Septicémies ● Infection pulmonaires ● Intoxication alimentaires

	Micrococcus Luteus « ML »	Peau ; voies respiratoires supérieures ; oropharynx Sol, poussières; eaux; air	<ul style="list-style-type: none"> • Infection nosocomiales chez les immunodéprimés
Levure	Candida Albicans « CA »	Tube digestif	<ul style="list-style-type: none"> • Septicémies et infection viscérales • Candidose superficielles

Annexe 03

Tableau 13: Les étapes de la méthode de sonication

<i>N°</i>	<i>Méthodes</i>	<i>Protocoles</i>	<i>Photos</i>
01	Mesure	Pesée la plantes broyer à 5 g	
02	Macération	Mettre 5g de broyat dans 50 ml	
03	Sonication	Mettre le mélange dans l'appareil de sonication pendant 1H à 25C°.	



04 Filtration. Filtrer le mélange pour obtenir un filtrat.



05 Récupération
III. Récupération de filtrat.
IV. Récupération du Marc liquide (hexane).



06 Vaporisation à sec Mettre le mélange dans un ballon et le mettre dans le Rota-vapeur



07 Mesure Pesée le ballon avant et après la vaporisation (vide et avec l'extrait)



08 Solubilisation au DMSO (Di-MethylSolfoOxide) La pâte collé obtenu après la vaporisation est solubilisé dans 10 ml de DMSO

09

Récupération des extraits

Mettre l'extrait obtenu après la solubilisation dans un tube à essai



Annexe 04

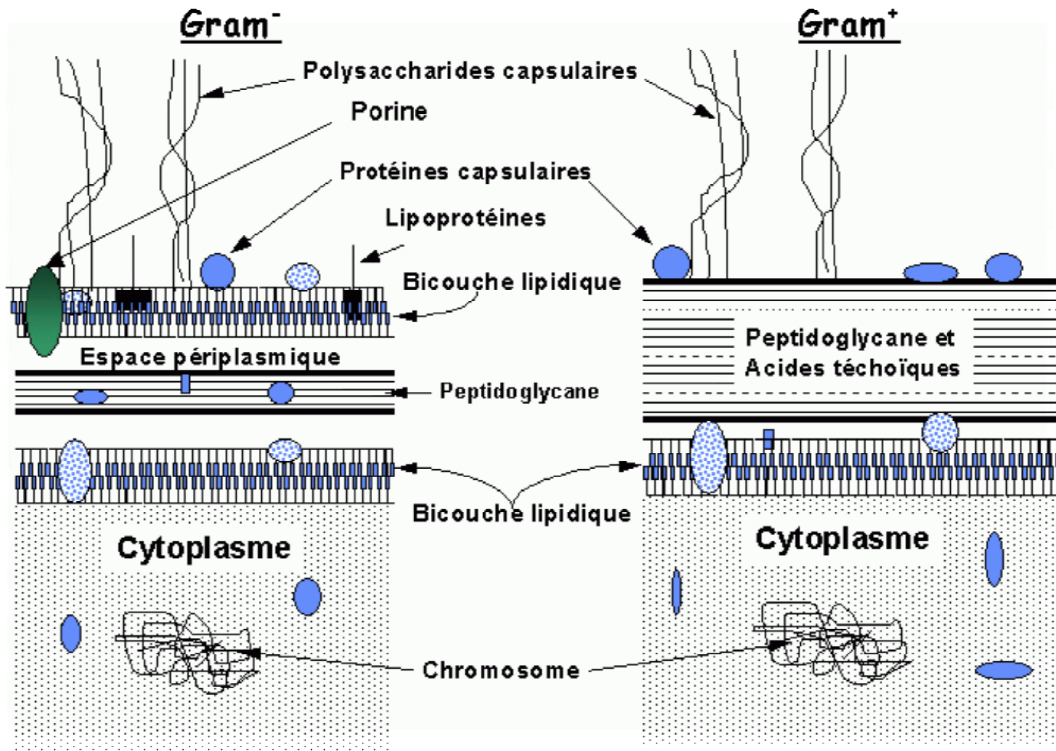


Figure 12 : Schéma de la paroi d'une bactérie Gram négatif / Gram Positif