

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثايجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée

THEME

Contribution à l'étude des activités antimicrobienne et antioxydante de la partie aérienne des deux espèces *Thymelaea virgata* (Desf.) et *Nolletia chrysocomoides* (Desf.)

Présenté par :

- ADDA Ferdous
- BELLAKHDAR Nour El Imane

Devant le jury composé de :

M. SIFI Ibrahim	MCA (Université Amar Télidji, Laghouat)	Président
M ^{elle} ZAKHROUF Zohra	MAA (Université Amar Télidji, Laghouat)	Examinatrice
Mme. ELHOUITI Fatiha	MCA (Université Amar Télidji, Laghouat)	Rapporteur
Mme. NEBEG Halima	MCB (Université Amar Télidji, Laghouat)	Co-Rapporteur

Soutenu publiquement le : 29/06/ 2022.

Résumé

Les plantes médicinales constituent une source riche et diversifiée en molécules bioactives, qui ont une application commerciale dans les domaines pharmaceutiques et biomédicaux. Notre travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des ressources naturelles, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude des taux des composés phénoliques, des tocophérols, l'évaluation des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de deux plantes médicinales, *Thymelaea virgata* (Desf.) et *Nolletia chrysocomoides* (Desf.).

Des extractions successives, par des solvants organiques à polarité croissante (hexane, acétate d'éthyle et méthanol), ont abouti à des différents rendements. Le dosage quantitatif des polyphénols totaux montre la richesse de l'extrait méthanolique de *T. virgata* avec une valeur de $110,215 \pm 2,688$ mg EAG/g ES, alors que l'extrait de *N. chrysocomoides* présente une teneur de $63,645 \pm 5,108$ mg EAG/g ES. Tandis que le taux en tocophérols est de l'ordre de 15,829 mg EVE/g ES pour *T. virgata* et 5,3987 mg EVE/g ES pour *N. chrysocomoides*. Le pouvoir antioxydant de ces extraits a été évalué *in vitro* par le test de DPPH. D'après les résultats obtenus les deux plantes possèdent des propriétés antioxydantes dont la plus importante est enregistrée chez l'extrait méthanolique de *T. virgata* de 8,258 mg/g ES.

L'activité antimicrobienne des extraits a été étudié vis-à-vis plusieurs souches bactériennes et fongiques par la méthode de diffusion sur milieu gélosé et celle des dilutions sur milieu liquide, les résultats obtenus montrent que nos extraits, sont doués d'une activité antimicrobienne. La plus importante était de l'extrait méthanolique de *N. chrysocomoides* contre *Candidat albicans* 26 et *Candidat albicans* 10 avec des zones d'inhibition de 26,3 et 22,6mm respectivement. Les valeurs de la concentration minimale inhibitrice des différents extraits ont montré un large éventail de valeurs jusqu'à 0,195 mg/ml.

Mots clé : *Thymelaea virgata*, *Nolletia chrysocomoides*, solvants organiques, composés phénoliques, tocophérol, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

Abstract

Medicinal plants are a rich and diverse source of bioactive molecules that have commercial applications in the pharmaceutical and biomedical fields. In this work, we are interested in the study of the rate of phenolic compounds, tocopherol, as well as the evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of extracts from two medicinal plants, *Thymelaea virgata* (Desf.) and *Nolletia chrysocomoides* (Desf.).

The successive extractions with increasing polarity organics solvents (hexane, ethyl acetate, and methanol) have resulted a different yield. The quantitative dosage of total polyphenols demonstrates the richness of *T. virgata* methanolique extract with a value of 110,215,688 mg EAG/g ES, whereas *N. chrysocomoides*'s methanolique extract has a value of 63,645 5,108 mg EAG/g ES. While the tocopherol level is around 15,829 mg EVE/g ES for *T. virgata* and 5,3987 mg EVE/g ES for *N. chrysocomoides*. The antioxidative activity of these extracts was determined *in vitro* using the DPPH test. According to the results, both plants have antioxidant properties, with the most significant being found in *T. virgata*'s methanolique extract (8,258 mg/g ES).

The antibacterial activity of the extracts was investigated using diffusion on agar medium and the dilution method in a liquid medium; the results show that our extracts have antibacterial activity. The most significant inhibition zones are 26,3 and 22,6mm for *N. chrysocomoides* methanolique extract against *Candidat albicans 26* and *Candidat albicans 10*. The values of the inhibitory concentration minimal of various extracts revealed a wide range of values up to 0.195 mg/ml.

Key words: *Thymelaea virgata*, *Nolletia chrysocomoides*, organics solvents, phenolic compounds, tocopherol, antioxydant Activity, antimicrobial activity.

مُلخّص

النباتات الطبية تُعدّ مصدرا غنيا ومتنوعا بالمركبات الحيوية التي لها استخدامات تجارية في المجالات الصيدلانية والطبية الحيوية. يندرج عملنا في إطار تثمين الموارد الطبيعية، ونحن مهتمون في هذا العمل بدراسة محتوى المركبات الفينولية، التوكوفيرول، بتقييم الفعالية المضادة للأكسدة والفعالية المضادة

للميكروبات لمستخلصات النبتتين الطبيتين *Thymelaea virgata* (Desf.)

و *Nolletia chrysocomoides* (Desf.)

عمليات الاستخلاص المتتالية عن طريق المذيبات ذات القطبية المتزايدة (الهكسان، أسيتات الايثيل والميثانول) أدت إلى الحصول على مردودات مختلفة. تحديد المحتوى الكمي للمركبات الفينولية يظهر ثراء المستخلص الميثانولي لـ *T. virgata* بقيمة $110,215 \pm 2,688$ مغ مكافئ لحمض القاليك / غ مستخلص جاف. في حين أن المستخلص الميثانولي لـ *N. chrysocomoides* يحتوي على $63,645 \pm 5,108$ مغ مكافئ لحمض القاليك / غ مستخلص جاف. بينما يبلغ مستوى التوكوفيرول حوالي $15,829$ مغ مكافئ فيتامين هـ / غ مستخلص جاف لـ *T. virgata* و $5,398$ مغ مكافئ فيتامين هـ / غ مستخلص جاف. لـ *N. chrysocomoides*. الفعالية المضادة للأكسدة لهذه المستخلصات مخبريا تم تقييمها عن طريق اختبار تثبيط الجذر الحر الألكيلي. ووفقاً للنتائج المتحصل عليها فإن للنبتتين خصائص مضادة للأكسدة، وأهمها يتم تسجيلها في المستخلص الميثانولي لـ *T. virgata* بـ $8,258$ ملغ/غ مستخلص جاف.

تمت دراسة النشاط المضاد للميكروبات للمستخلصات تجاه العديد من السلالات البكتيرية والفطرية بواسطة طريقة الانتشار على وسط جيلوزي والتمديدات على وسط سائل، تظهر النتائج أن مستخلصاتنا تتمتع بنشاط مهم أعلاه يسجل في المستخلص الميثانولي ضد السلالات الفطرية *Candidat albicans 26* و *Candidat albicans 10* مع مناطق تثبيط تقدر بـ $26,3$ و $22,6$ مم على التوالي. كما تظهر قيم الحد الأدنى للتركيز المثبط نطاقا واسعا من القيم تصل إلى 0.195 ملغ/مل.

الكلمات المفتاحية: *Thymelaea virgata*, *Nolletia chrysocomoides* ، المذيبات العضوية، المركبات الفينولية، التوكوفيرول، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للميكروبات.

À nos très chers parents...

À toute notre famille...

À tous nos amis...

À tous ceux qui aiment la science...

Remerciement

À terme de cette expérience qui représente la réalisation d'un mémoire de master, nous tenons à remercier les personnes qui ont rendu possible l'élaboration de ce travail :

Nos profonds remerciements à **M. Yousfi Mohamed**, Directeur du Laboratoire des Sciences Fondamentales de l'Université AMAR TELIDJI de Laghouat de nous avoir accueilli et d'avoir mis à nos disposition tout le matériel nécessaire.

Nous tenons à remercier notre encadrante, **Mme. El Houiti Fatiha** pour la confiance qu'elle nous a accordées en acceptant d'encadrer ce travail. Nous ne saurons dire à quel point nous avons eu le plaisir à discuter avec lui et combien nous avons apprécié ses multiples compétences et ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail.

Nos profonds remerciements s'adressent à notre Co-encadrante, **Mme. Nebeg Halima** qui a régulièrement suivi notre travail et nous a fourni de nombreux conseils. Nous sommes infiniment reconnaissantes pour votre aide.

Nous remercions très sincèrement **M. Harrath Mohamed**, Son aide et sa disponibilité ont été des atouts précieux.

Un grand merci à **M^{elle} Zegrir Anfal**, pour sa disponibilité, ses conseils précieux et avisés et sa générosité exceptionnelle.

Nous remercions le président du jury, **M. Sifi Ibrahim** d'avoir accepté de présider le jury. Nous remercions également **M^{elle} Zakhrouf Zohra** de nous avoir honorés en examinant notre travail.

Nous tenons à remercier **nos très chers parents** du plus profond de cœur, pour leurs innombrables sacrifices et de nous avoir tant aidé, soutenu, réconforté, et encouragé dans les moments de doute.

Une pensée amicale à nos chères amies, **Nesrine, Abir et Nabila** pour leur soutien et leur aide.

Un grand merci à toutes les personnes qui m'ont soutenu de près ou de loin au cours de la réalisation de ce modeste travail.

Table de Matière

Liste des figures	III
Liste des tableaux	IV
Liste des abréviations	V
Introduction générale	- 2 -
Partie I : Étude bibliographique	- 5 -
I.1. Monographie des plantes médicinales	- 5 -
I.1.1. Plantes médicinales	- 5 -
I.1.1.1. Intérêt et domaine d’application des plantes médicinales	- 5 -
I.1.2. Phytothérapie	- 6 -
I.2. Les substances bioactives des plantes	- 6 -
I.2.1. Composés phénoliques	- 7 -
I.2.2. Les alcaloïdes	- 7 -
I.2.3. Les terpenoides	- 9 -
I.3. Activités biologiques	- 9 -
I.3.1. Activité antioxydante	- 9 -
I.3.1.1. Les antioxydants	- 10 -
I.3.1.2. Types d’antioxydants	- 11 -
I.3.1.3. Stress oxydatif	- 11 -
I.3.1.4. Les radicaux libres et leurs origines	- 11 -
I.3.1.5. Les cibles des radicaux libres	- 13 -
I.3.2. Activité antimicrobienne	- 14 -
I.3.2.1. Agents antimicrobiens	- 14 -
I.3.2.2. Mode d'action des agents antimicrobiens	- 14 -
I.3.2.3. Activité antibactérienne	- 15 -
I.3.2.4. Activité antifongique	- 15 -
I.3.2.5. Description des microorganismes étudiés	- 16 -
Partie II : Matériel et Méthodes	- 19 -
II.1. Matériel biologique	- 19 -
II.1.1. Matériel végétal	- 19 -
II.1.1.1. Description botanique des plantes étudiées	- 20 -
A. Les Thymelacées	- 20 -
B. Les Astéracées	- 21 -

C. Répartition géographique.....	- 22 -
II.1.1.2. Systématiques des plantes étudiées.....	- 23 -
II.1.2. Les souches microbiennes utilisées	- 23 -
II.2. Méthode expérimentale.....	- 25 -
II.2.1. L'extraction.....	- 25 -
II.2.2. Analyses quantitatives des extraits	- 28 -
II .2.2.1. Rendement des extraits	- 28 -
II.2.2.2. Dosage des composés phénoliques totaux	- 28 -
II.2.2.3. Dosage d' α -tocophérol.....	- 29 -
II.2.3. Étude des activités biologiques	- 29 -
II.2.3.1. Test de l'activité antioxydante	- 29 -
II.2.3.2. Activité antimicrobienne.....	- 31 -
A. La méthode de diffusion sur gélose.....	- 33 -
B. La méthode de micro dilution sur milieux liquide (Détermination des CMI, CMB et CMF).....	- 36 -
Partie III : Résultats et discussions	- 39 -
III.1. Rendement des extractions	- 39 -
III.2. Dosage des polyphénols	- 40 -
III.3. Dosage des tocophérols	- 42 -
III.4. Étude des activités biologiques	- 44 -
III.4.1. Résultats du test du pouvoir antioxydant.....	- 44 -
III.4.2. Test du pouvoir antimicrobien.....	- 47 -
III.4.2.1. Résultats de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur gel. -	50 -
III.4.2.2. Les résultats de la détermination de la CMI.....	- 59 -
Conclusion et perspectives	- 66 -
Références.....	- 69 -
Annexe I.....	- 76 -
Annexe II	- 77 -
Annexe III.....	- 78 -
Annexe IV	- 79 -

Liste des figures

Figure 1 : Les différentes classes des composés phénoliques.	- 7 -
Figure 2 : La structure d'isoprène.....	- 9 -
Figure 3 : Radicaux libres et anti-radicaux libre.	- 10 -
Figure 4 : Les origines des espèces réactives (Poisson, 2013).....	- 12 -
Figure 5 : Les différentes cibles des Espèces Réactive de l'Oxygène (Poisson, 2013).....	- 13 -
Figure 6 : Photographie illustrant l'espèce <i>Thymelaea virgata</i> (Desf.).....	- 21 -
Figure 7 : Photographie illustrant l'espèce <i>Nolletia chrysocomoides</i> A : Fleurs jaunâtre, B : Capitule, fleurs périphériques, centrales et akènes.....	- 22 -
Figure 8 : Organigramme de notre travail.	- 25 -
Figure 9 : Protocole d'extraction.....	- 27 -
Figure 10 : Réaction de radical DPPH.....	- 30 -
Figure 11 : Préparation des dilutions des extraits des plantes.	- 32 -
Figure 12 : Schéma simplifié du principe de la méthode de diffusion sur milieu solide.	- 33 -
Figure 13 : Schéma de la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques.	- 35 -
Figure 14 : Schéma de la méthode de micro dilution sur milieu liquide.....	- 37 -
Figure 15 : Comparaison entre les rendements en % des différents extraits.	- 39 -
Figure 16 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	- 41 -
Figure 17 : Teneur en polyphénols totaux des échantillons.	- 42 -
Figure 18 : Courbe d'étalonnage de la vitamine E.....	- 43 -
Figure 19 : Le pouvoir antioxydant des standards, graphes représentant le pourcentage d'inhibition de radical libre (DPPH) en fonction de la concentration des standards en mg/ml.	- 44 -
Figure 20 : L'activité antioxydante, la teneur en composés phénoliques et le taux en tocophérols des différents extraits.....	- 46 -
Figure 21 : Effet de DMSO sur quelques souches étudiées.....	- 47 -
Figure 22 : Effet des antibiotiques sur quelques souches étudiées.....	- 49 -
Figure 23 : Effet de différents extraits organiques de <i>T. virgata</i> sur la croissance des souches microbiennes.....	- 55 -
Figure 24 : Effet de différents extraits organiques de <i>N. chrysocomoides</i> sur la croissance des souches microbiennes.....	- 57 -
Figure 25 : Détermination de la Concentration minimal inhibitrice des extraits organiques de <i>Thymelaea virgata</i> vis-à-vis des souches pathogènes par la méthode de micro-dilution.	- 63 -
Figure 26 : Détermination de la Concentration minimale inhibitrice des extraits organiques de <i>Nolletia chrysocomoides</i> vis-à-vis des souches pathogènes par la méthode de micro-dilution.	- 64 -

Liste des tableaux

Tableau 1: Les principales classes des alcaloïdes.....	- 8 -
Tableau 2 : Les espèces végétales employées.	- 20 -
Tableau 3: Distribution des plantes étudiées en Algérie.	- 23 -
Tableau 4: Classification systématique des plantes étudiées.	- 23 -
Tableau 5 : Références des microorganismes testés dans notre étude.	- 24 -
Tableau 6: Les antibiotiques et l'antifongique utilisés.	- 33 -
Tableau 7: Le Rendement (%), Aspect, et Couleur des différents extraits étudiés.	- 39 -
Tableau 8: Teneurs en polyphénols totaux dans les différents extraits de <i>Thymelaea virgata</i> et <i>Nolletia chrysocomoides</i>	- 41 -
Tableau 9: Quantité des tocophérols dans les extraits hexaniques de <i>Thymelaea virgata</i> et <i>Nolletia chrysocomoides</i>	- 43 -
Tableau 10: Les valeurs des VEEAC, VCEAC en (mg/g ES) et le rapport (C_E / C_{VE} ou C) des extraits hexanique, d'acétate d'éthyle et méthanolique.	- 45 -
Tableau 11: Diamètre de zone d'inhibition en mm en présence de quelques antibiotiques....	- 48 -
Tableau 12: Diamètre des zones d'inhibitions des extraits de <i>Thymelaea virgata</i> vis-à-vis des souches étudiées.	- 51 -
Tableau 13: Diamètre des zones d'inhibitions des extraits de <i>Nolletia chrysocomoide</i> vis-à-vis des souches étudiées.	- 52 -
Tableau 14: Les concentrations minimales inhibitrices et fongicides des extraits organiques en (mg/ml), de <i>Nolletia chrysocomoides</i>	- 60 -

Liste des abréviations

A

AA : Acide ascorbique.
AFNOR : Association française de normalisation
ATB : Antibiotique.
ATCC: American Type Culture Collection.
ATF : Antifongique
ADN : Acide désoxyribonucléique.

B

BHA : butylhydroxyanisole

BHT : butylhydroxytoluène.

BN : Bouillon nutritif.

C

CA : Capacité antioxydante.

C_E : Concentration de l'extrait.
CMB : Concentration minimale bactéricide.

CMF : Concentration minimale fongicide.
CMI : Concentration minimale inhibitrice.

CP : Composés phénoliques.

C_{VC} : Concentration de la vitamine C.
C_{VE} : Concentration de la vitamine E.

D

DMSO : Diméthyle sulfo-oxyde

DO : Densité optique.

DPPH : (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

D : Diamètre

E

EVE : Équivalent-en en vitamine E.
EVC : Équivalent-en en vitamine C.
EOR : Les espèces oxygénées réactives
ES : Extrait sec.
EAG : Équivalente acide gallique.

M

MH: Muller Hinton
min: minute

N

N. chrysocomoides : *Nolletia chrysocomoides* (Desf.).
nm : nanomètre.

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

P

PAM : Plante aromatique et médicinale.
PG : Gallate propylée.
PI% : Pourcentage d'inhibition.

R

R² : Coefficient d'extinction molaire.

T

TBHQ : Tétra-butylhydroquinone.
T. virgata : *Thymelaea virgata* (Desf.)

U

UV : Ultraviolet.

V

VECAC : Capacité antioxydante équivalent en Vitamine C (Vitamin C equivalent antioxydant capacity).
VEEAC : Capacité antioxydante équivalent en Vitamine E (Vitamin C equivalent antioxydant capacity).

Introduction générale

Introduction générale

Depuis l'antiquité, l'humanité a utilisé les plantes pour traiter les maladies, sans savoir à quoi étaient dus leurs effets bénéfiques. Aujourd'hui, les traitements à base des plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments décroît avec le temps ce qui oriente les chercheurs scientifiques à faire des études approfondies sur les plantes médicinales (**Medjekal et al., 2016**).

Les plantes renferment une part importante de composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions biochimiques ayant lieu dans l'organisme. Deux groupes de métabolites ont été distingués, primaire et secondaires. Les métabolites primaires sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules végétales pour y assurer sa survie. Quant aux métabolites secondaires, se sont des molécules ayant une répartition limitée et qui ne sont pas toujours nécessaires à la survie. Ils ont un intérêt multiple, ils sont mis à profit en thérapie comme antioxydants, antibactériens, antifongiques, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, ...etc. (**Hartmann, 2007**).

L'Algérie par sa position géographique, possède un important patrimoine botanique. Il existe plus de 3000 espèces végétales. Parmi ces ressources naturelles les plantes aromatiques et médicinales occupent une large place et jouent un rôle important dans l'économie nationale. Elle a été utilisée dans une variété de domaines, y compris : l'industrie alimentaire, agriculture, la pharmacie et la phytothérapie (**Boukhatem et al., 2011**).

Afin d'exploiter ces potentialités nationales, beaucoup de chercheurs se sont intéressés au domaine de la phytochimie. Parmi les PAM algériennes dont elles n'ont pas encore fait l'objet de travaux antérieurs, nous avons opté pour deux plantes ; *Thymelaea virgata* et *Nolletia chrysocomoides*.

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des propriétés antioxydantes, antibactériennes et antifongiques de la partie aérienne de ces deux espèces.

Ce manuscrit est divisé en quatre parties :

- La première partie présente principalement une étude bibliographique sur les plantes médicinales, les molécules bioactives des plantes et les activités biologiques.
- La deuxième partie est consacrée à la présentation du matériel et la description des protocoles expérimentaux utilisés. Premièrement, nous nous sommes intéressés à l'extraction et le dosage de composés pouvant présenter des activités et intérêts potentiels comme les phénols totaux et les tocophérols. Dans un second lieu, nous avons évalué

l'activité antioxydante de nos extraits organiques par le test du DPPH. Enfin, nous nous sommes intéressés à l'étude du pouvoir antimicrobien de nos extraits vis-à-vis des souches microbiennes (bactéries et levures) par la méthode de diffusion sur milieu solide. Par la suite, cette activité a été confirmée par la méthode de micro dilution sur milieu liquide en estimant les concentrations minimales inhibitrices (CMI). La troisième partie est réservée à la présentation et la discussion des résultats obtenus.

- Nous terminons cette étude par une conclusion générale et des perspectives de recherche.

Étude bibliographique

Partie I : Étude bibliographique

I.1. Monographie des plantes médicinales

I.1.1. Plantes médicinales

Les plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines. L'Algérie reconnue par sa diversité variétale en plantes médicinales et aromatiques, ainsi que leurs diverses utilisations populaires dans l'ensemble des terroirs du pays (**Blama, 2013**). D'après la Xème édition de la Pharmacopée française, les plantes médicinales "sont des drogues végétales au sens de la Pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses" (**Chabrier, 2010**).

Plus spécifiquement, une plante aromatique et médicinale (PAM) est une plante qui contient suffisamment de molécules aromatiques dans un ou plusieurs de ses organes producteurs à savoir feuilles, fleur, fruit, graine, écorce etc. De nos jours entre 20000 et 25000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée humaine (**Iserin, 2001**).

I.1.1.1. Intérêt et domaine d'application des plantes médicinales

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme (**Iserin, 2001**).

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans plusieurs domaines :

- **En pharmacie** : Selon l'OMS 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une molécule active d'origine végétale. De nombreuses substances extraites des plantes sont utilisées pour la synthèse ou l'hémisynthèse des médicaments (**Chabrier, 2010**).
 - L'utilisation de la plante comme médicament : c'est ce que l'on entend aujourd'hui sous le terme de phytothérapie et dans ce cas il ne peut s'agir que de plants peu ou pas toxique (**Chen, 2004**).
 - L'extraction des substances actives contenues dans les végétaux pour les préparations médicamenteuses.
- **En alimentation** : les épices et les herbes sont très utilisées dans l'alimentation. La notion de flaveur des épices et aromates recouvre l'ensemble des perceptions olfactogustatives (**Smallfield, 2001**).

- **En agriculture** : les huiles de certaines plantes ont des utilisations dans le contrôle de certains insectes et nématodes (**Regnault-Roger et al., 2012**).
- **En cosmétique** : plusieurs plantes médicinales sont à l'origine des produits de beauté, parfums, articles de toilettes et produits d'hygiène (**Pichard et al., 2017**).

I.1.2. Phytothérapie

Le mot phytothérapie provient de deux mots grecs (*phuton* : plante, et *therapia* : soigner) qui signifient essentiellement soigner avec les plantes. C'est l'art de se soigner avec les produits issus de notre belle nature. Sur notre planète sont recensées près de 95000 plantes reconnues pour leur vertu médicinales (**Cavalier et al., 2014**).

La Phytothérapie peut donc se définir comme étant une discipline allopathique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de plantes, de parties de plantes ou de préparations à base de plantes (**Chabrier, 2010**).

I.2. Les substances bioactives des plantes

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées (**Macheix et al., 2005**). Parmi ces substances les métabolites primaires qui sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ces composés sont classés en trois principaux groupes, les glucides, les protéines et les lipides.

De plus, les plantes produisent des molécules ayant une répartition limitée dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais elles représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme, ces composés sont appelés métabolites secondaires. Sur la base de leurs origines biosynthétiques, les métabolites secondaires des plantes peuvent être divisés en trois grands groupes : les polyphénols, les terpénoïdes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités biologique (**Crozier et al., 2008**).

I.2.1. Composés phénoliques

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle benzénique, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) libre ou engagé dans une fonction (Krief, 2003).

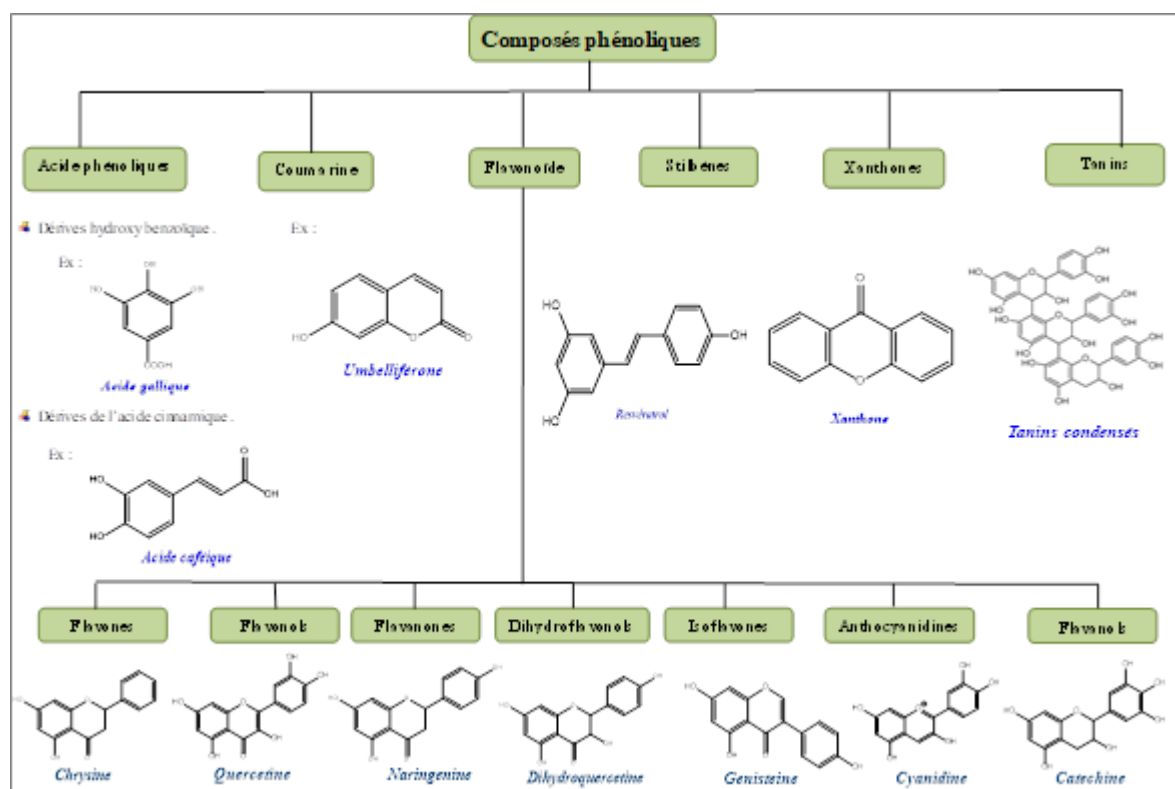


Figure 1 : Les différentes classes des composés phénoliques.

I.2.2. Les alcaloïdes

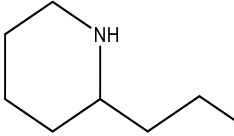
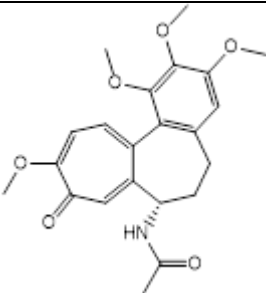
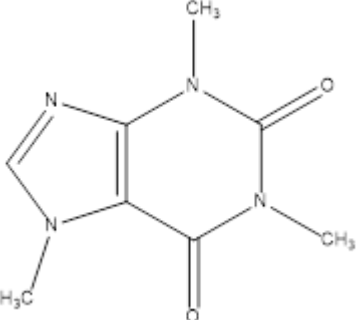
Ce sont des produits d'origine naturelle (le plus souvent végétal), azoté plus ou moins basique, de distribution restreinte et doué, à faible dose. Les alcaloïdes ont de plus la propriété de réagir avec des sels de métaux lourds, ce qui permet leur caractérisation aisée (réactifs de Mayer, de Dragendorff) (Djermane, 2014).

Les pseudo-alcaloïdes ne sont pas des dérivés des acides aminés dont l'atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique, on les nomme alors alcaloïdes terpéniques. Exemple : laconiine.

Les proto-alcaloïdes sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique. Exemple : la colchicine.

Les alcaloïdes vrais que l'on classe suivant de leur cycle. L'atome d'azote est inclus dans un hétérocycle, biosynthétiquement formés à partir d'acides aminés, possèdent une activité pharmacologique marquée. Exemple : la caféine (**Merghem, 2009**).

Tableau 1: Les principales classes des alcaloïdes.

Classe	Structure	Nom commun
Pseudo-alcaloïde		Coniine
Proto-alcaloïde		Colchicine
Alcaloïdes vrais		Caféine

I.2.3. Les terpénoïdes

Le terme terpène inventé par Kékulé (**Teisserie, 1991**), vient de leur origine historique de l'arbre de térébinthe : « Pistacia Terebinthus » (**Koskinen, 1993**).

Les terpènes, ou isoprénoïdes, sont l'une des classes les plus diverses de métabolites secondaires. Du point de vue structurel leur squelette carboné est constitué d'unités isopréniques reliées, c'est ce que l'on appelle la règle de l'isoprène. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des cycles. (**Brielmann et al., 2006**). Ils sont des arômes et des parfums, des antibiotiques, des attracteurs d'insectes, des additifs alimentaires (**Crozier et al., 2008**).

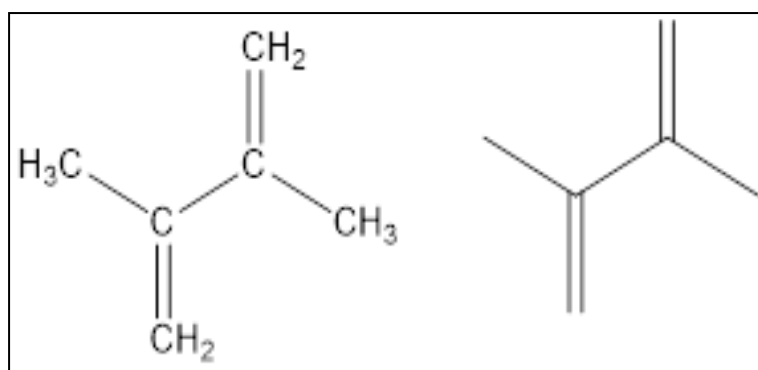


Figure 2: La structure d'isoprène.

I.3. Activités biologiques

Les plantes médicinales sont des sources inépuisables de substances naturelles douées de propriétés biologiques diverses et multiples présentant un intérêt réel, notamment : anticancéreuse, anti-inflammatoire, antioxydante, antimicrobienne.

I.3.1. Activité antioxydante

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Du fait de leur haute réactivité, les espèces oxygénées réactives (EOR) appelé aussi radicaux libres sont responsables de nombreux dommages vis-à-vis des constituants cellulaires (**Obame et Engonga, 2009**), cette production d'espèces délétères est généralement équilibrée par leur consommation à vitesse égale par le système antioxydant endogène. La rupture de l'équilibre entre espèce pro- et antioxydante est désigné par le terme de stress oxydant. Les recherches, ont identifié le stress oxydant comme cause première de plus de 130 maladies chroniques tels que : Le cancer, diabète, la maladie de Parkinson, l'inflammation et les maladies cardio-vasculaires (**Astrid, 2016**).

Des nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits végétaux. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Selon la bibliographie, parmi les méthodes les plus utilisées : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) et la réduction du 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH•), par la mesure de la capacité réductrice de ce radical stable en présence d'antioxydants (Krishnaiah *et al.*, 2010).

I.3.1.1. Les antioxydants

L'organisme produit les radicaux libres, mais il s'en protège avec des molécules appelées antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme étant une substance capable, à concentration relativement faible d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables afin de les inhiber (Halliwell, 1999).

Pour chaque radical libre produit par l'organisme il existe un antioxydant capable de le neutraliser, en offrant un électron (Figure 3) (Causse, 2005).

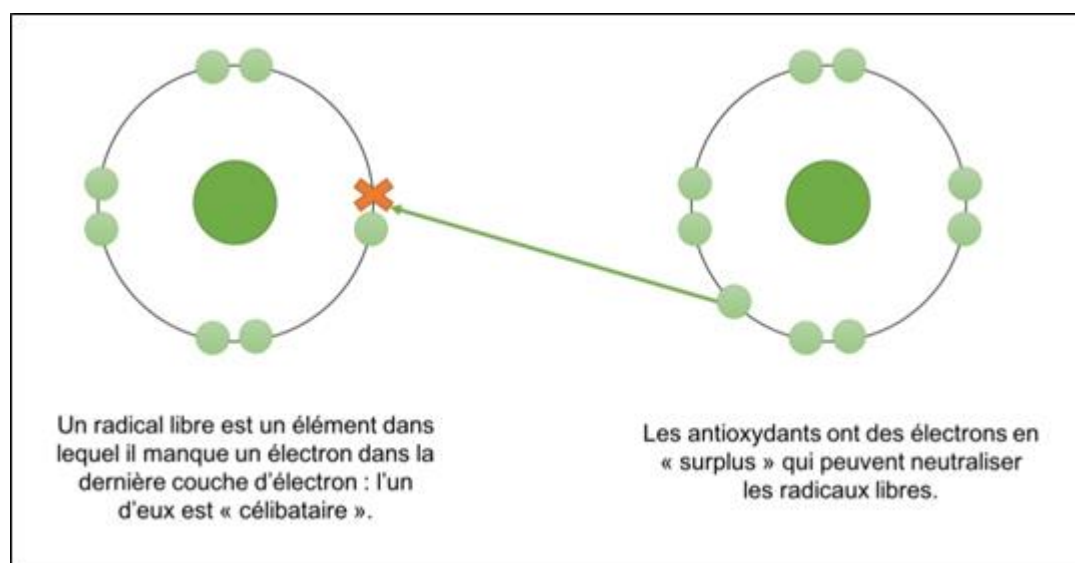


Figure 3: Radicaux libres et anti-radicaux libre.

Source : [Huiles essentielles antioxydantes – LABORATOIRE DUMANI](#)

I.3.1.2. Types d'antioxydants

➤ Antioxydants naturels

Les antioxydants sont naturellement présents dans presque toutes les plantes, les microorganismes, les champignons et même dans les tissus animaux. Les antioxydants naturels les plus connus sont : le β -carotène, l' α -tocophérol (Vitamine E), L'acide ascorbique (Vitamine C) et les composés phénoliques (**Martini, 2011**).

➤ Antioxydants synthétiques

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), le gallate propylée (PG) et le tétra-butylhydroquinone (TBHQ) sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces, et moins chers que les antioxydants naturels. Ces antioxydants sont de nature chimique. Ils présentent des effets négatifs sur l'organisme ; ce qui contribue à l'apparition de certaines maladies (**Balasundram et al., 2006**).

I.3.1.3. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est un processus physiopathologique (**Léophonte et al., 2006**), qui due à un déséquilibre entre les oxydants (augmentation) et les antioxydants (diminution), responsable de l'altération de biomolécule (ADN, glucides, protéines, lipides), et de la perte de contrôle des voies de signalisation intracellulaire redox (**Marvin, 2011 ; Benseguini, 2007**).

Le stress oxydant se traduit au niveau des mitochondries par une peroxydation lipidiques, oxydation des protéines et des mutations dans l'ADN qui peuvent être à l'origine de la survenue de certains cancers (**Marvin, 2011**).

I.3.1.4. Les radicaux libres et leurs origines

Un radical libre est défini comme une espèce chimique, molécule, un fragment moléculaire ou simple atome. Il est produit en permanence par notre organisme en faible quantité comme des médiateurs tissulaires et des produits de dégradation énergétique. Possédant un électron ou plusieurs non apparié qui se trouve le plus souvent sur l'orbital externe de la molécule (**Haliwell et Gutterige, 1999**). Il est très instable de durée de vie très courte environ 4-10s. Ce radical libre aura toujours tendance à chercher à se stabiliser en s'appariant avec un électron appartenant à une autre molécule voisine provoquant ainsi sa déstabilisation et entraînant soit une

réaction en chaîne, soit un arrêt de la propagation des réactions radicalaires (Souchard *et al.*, 2002).

Cependant, certaines situations (vieillesse, tabagisme, exposition au soleil, pollution et rayonnement) entraînent un excès de radicaux libres. Les antioxydants ne réussissent pas toujours à fournir une protection efficace dans ces situations. L'équilibre a été perturbé et une maladie peut se manifester (Céline cause, 2005).

Les radicaux libres sont également produits par des phénomènes dits exogènes et endogènes :

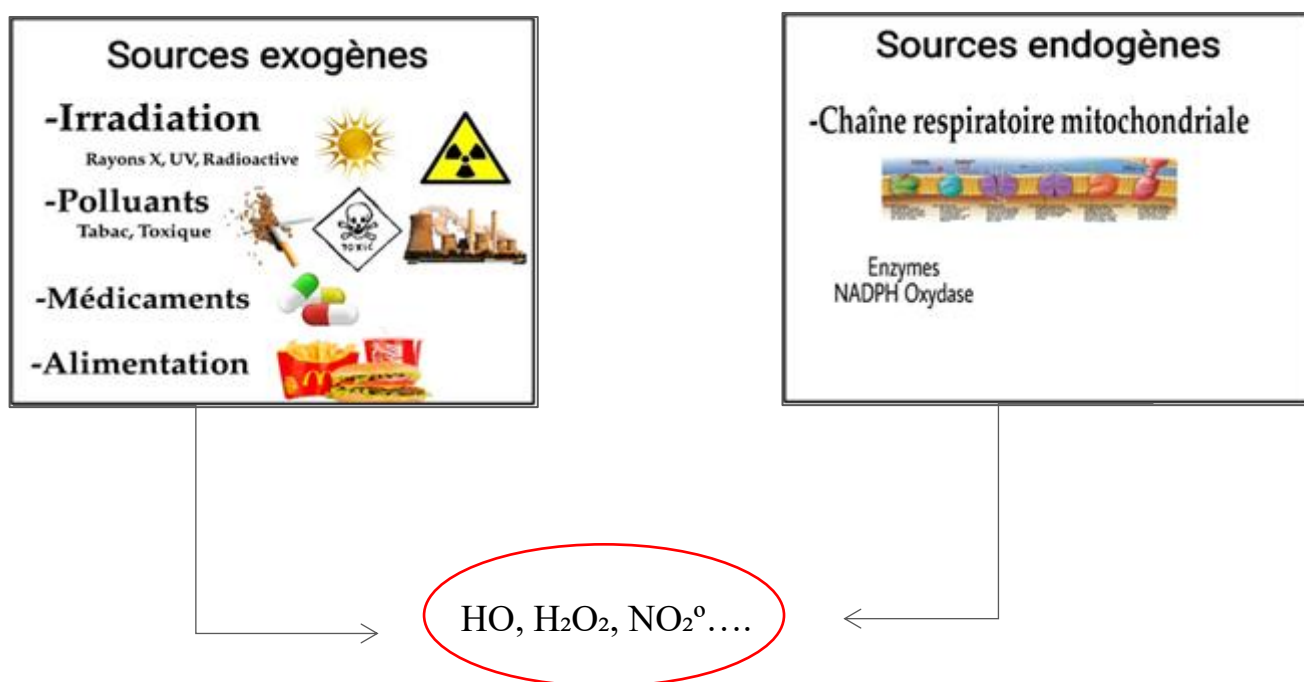


Figure 4: Les origines des espèces réactives (Poisson, 2013).

I.3.1.5. Les cibles des radicaux libres

Les radicaux libres attaquent différents endroits du corps, mais ils ont trois grandes cibles privilégiées :

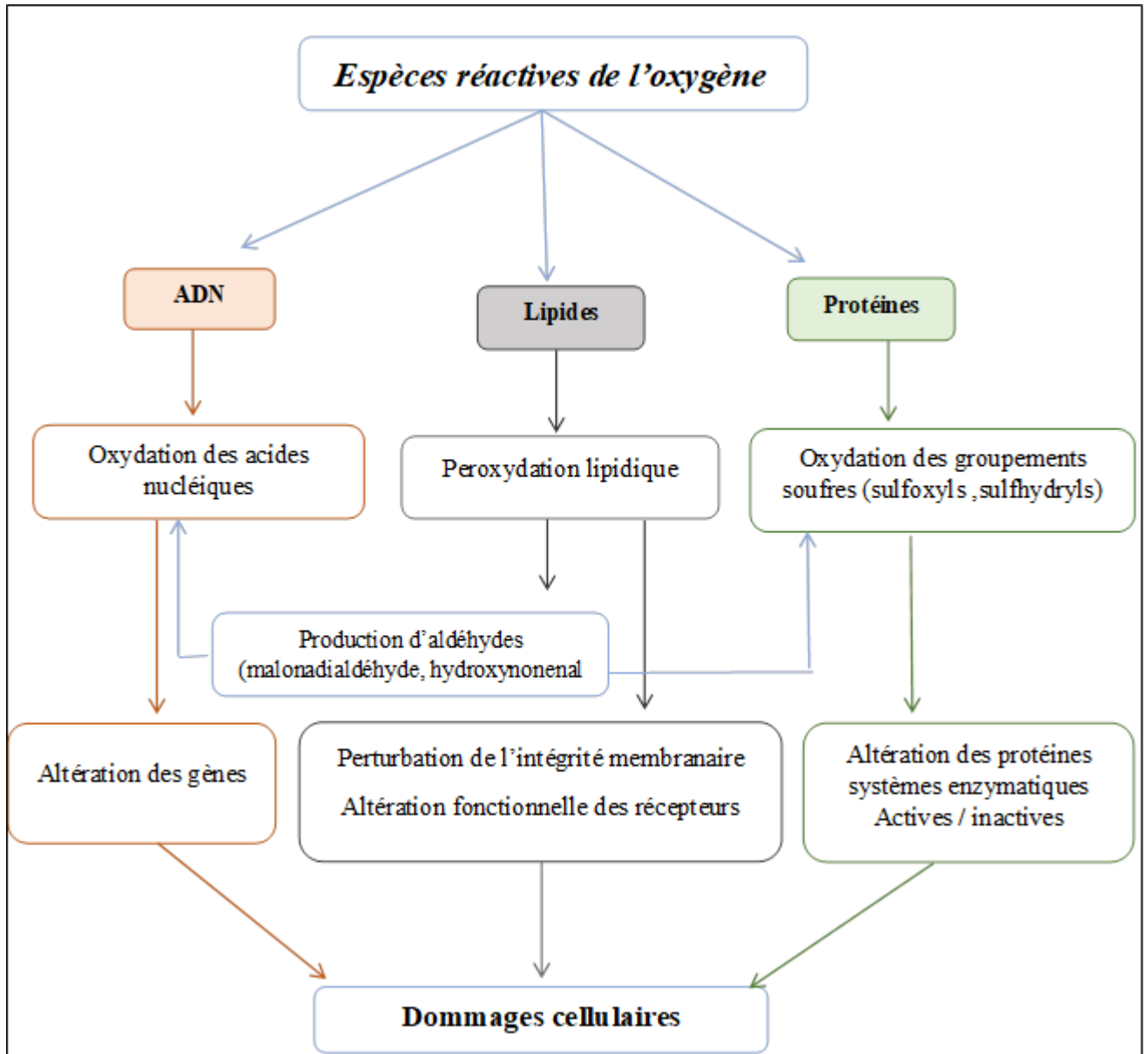


Figure 5: Les différentes cibles des Espèces Réactive de l'Oxygène (Poisson, 2013).

I.3.2. Activité antimicrobienne

Les micro-organismes ou microbes font partie d'un grand groupe d'organismes extrêmement divers. Ces organismes sont regroupés en fonction d'une seule propriété : ils sont si petits qu'ils ne peuvent être observés sans l'aide d'un microscope. Le développement de la chimie a permis l'émergence de nouvelles substances antimicrobiennes. Ceux-ci sont définis comme des substances utilisées pour détruire les micro-organismes ou arrêter leur croissance et comprennent les antibiotiques et autres agents antibactériens et antifongiques. Ces substances synthétiques ont été largement utilisées (**Belkheir, 2009**).

I.3.2.1. Agents antimicrobiens

On désigne par agent antimicrobien tout agent chimique, physique ou biologique inhibant la croissance et/ou la survie des micro-organismes. Ces substances ayant une affinité pour les cellules des parasites et le pouvoir de les tuer plus forts que les dommages qu'elles causent à l'organisme, rendant la destruction des parasites réalisable sans causer de graves altérations dans le corps (**Perry et al., 2002**).

I.3.2.2. Mode d'action des agents antimicrobiens

Les mécanismes d'action des produits antimicrobiens autres que les antibiotiques restent encore généralement peu et mal connus. Les agents antimicrobiens agissent par divers mécanismes et peuvent être utilisés de diverses manières en fonction des objectifs recherchés et leur mode d'action, qui peut être germicide ou germistatique.

- **Action germicide**

Cette action est létale, c'est-à-dire qu'il entraîne la mort de l'individu. On le nomme par le suffixe CIDE. Les agents antimicrobiens ont des effets bactéricides (agent antibactérien), algicide (agent anti-algues), fongicide (agent anti-champignons), virucide (agent anti-virus), ou antiparasitaire (agent anti-protistes) selon le type de micro-organisme ciblés (**Bousseboua, 2006**).

- **Action germistatique (bactériostatique et fongistatique)**

L'action germistatique correspond à une inhibition de croissance du microorganisme sans le tuer en présence du produit actif. On le nomme avec le suffixe STATIQUE (bactériostatique et fongistatique). Les microorganismes recommenceront à se développer dès que la concentration de la substance aura diminué ou dès que l'application du procédé physique sera interrompue donc les

substances bactériostatiques inhibent temporairement le développement microbien (**Bousseboua, 2006**).

I.3.2.3. Activité antibactérienne

Les infections bactériennes sont causées par une variété de microorganisme et sont à l'origine d'un grand nombre des maladies et épidémies les plus meurtrières au monde.

De nombreux antibiotiques sont développés pour les traiter, mais leur utilisation abusive est à l'origine de l'apparition de la multirésistance bactérienne. Cependant, ont des effets néfastes des molécules synthétiques utilisées pour lutter contre les infections bactériennes. En conséquence, il apparaît que trouver une alternative à l'utilisation des antibiotiques traditionnels est critique. De ce fait, le développement de nouvelles molécules bioactives à effet secondaires limités voire inexistantes issus de sources naturelles, et leur adoption comme une alternative thérapeutique aux molécules synthétiques sont devenues des objectifs prioritaires pour les recherches scientifiques et les industries alimentaires et pharmaceutiques (**Ben abdallah et al., 2019**).

I.3.2.4. Activité antifongique

Pendant longtemps, l'homme a été relativement peu armé face aux maladies causées par les champignons. Au cours des 20 dernières années, il y a eu une augmentation significative de la prévalence de ces maladies, qui affectent un large éventail d'hôtes. Elles causent des dommages importants aux humains ainsi qu'aux espèces végétales. Les produits chimiques sont les plus couramment utilisés pour résoudre ces problèmes.

Cependant, ce traitement atteint rapidement ses limites en raison de nombreux inconvénients, notamment le risque de sélection de souches résistantes aux fongicides.

Dans la recherche de molécules bioactives, l'exploration des ressources naturelles, notamment des plantes médicinales, apparaît comme une voie prometteuse, puisque leur biodiversité constitue une importante réserve de substances actives. Ils peuvent être utilisés pour formuler de nouveaux agents antifongiques (**Haji, 2016**).

I.3.2.5. Description des microorganismes étudiés

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus, également connu sous le nom de staphylocoque doré en raison de la couleur des colonies qu'il forme, a été décrit pour la première fois en 1880 par Louis Pasteur.

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. Sir Alexander Ogston cultive in vitro cette bactérie et l'appelle Staphylocoque (du grec staphulê « grain de raisin » et kókkos « graine »), identifiant un rôle de ce germe dans l'inflammation et la suppuration (**Morikawa et al., 2012**).

Escherichia coli

Escherichia coli est un bacille à gram négatif, 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 . Les bactéries appartenant à l'espèce *E. coli* constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux (**Steven et al., 2004**).

Pseudomonas aeruginosa

C'est une bactérie à Gram négatif trouvée principalement dans l'eau, le sol humide et en milieu hospitalier. Il est caractérisé comme l'un des principaux agents pathogènes opportunistes chez l'homme.

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 un flagelle polaire composé d'une structure protéique complexe. Sa morphologie est hétérogène, ses colonies sont généralement grandes, aplaties, lisses ou à bords en forme de scie, et peuvent présenter un éclat métallique (**Ossa et al., 2014**).

Yersinia enterocolitica

Est une bactérie de type coccobacilles, Gram négatif, fermentative. Sa taille varie de 1 à 3 µm de longueur et de 0,5 à 0,8 µm de diamètre.

C'est un organisme anaérobie facultatif unicellulaire avec de multiples flagelles périphériques, en raison de cette disposition des flagelles, la bactérie se déplace de manière rotative (**Blaylock et al., 2006**).

Klebsiella pneumoniae

C'est une bactérie anaérobie facultative à Gram négatif qui ne produit pas de spores et qui se présente sous la forme d'un bacille.

Il a la forme d'une canne. Il est court, mesurant entre 1 - 2 par 0,5 - 0,8 micromètres. Les cellules peuvent être trouvées individuellement, par paires, en chaînes et parfois en groupes. Il ne présente pas de flagelle (il n'est donc pas mobile) et possède une capsule proéminente (**Candan et Aksöz, 2015**).

Candida albicans

Cette espèce de champignon se trouve fréquemment dans la cavité buccale, dans l'intestin, sur la peau et, lorsqu'elle se trouve dans le système reproducteur féminin, elle est généralement la cause de fortes infections.

Les candidats sont des levures unicellulaires peuvent être vues sous différentes formes et beaucoup sont endogènes au corps humain. Ils ont un diamètre compris entre 2 et 8 µm.

Ces champignons se reproduisent exclusivement par reproduction asexuée (par bourgeonnement ou "germination") (**Van der Graaf et al., 2005**).

Matériel et Méthodes

Partie II : Matériel et Méthodes

Notre étude expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire des sciences fondamentales et le laboratoire pédagogique du département de biologie de l'Université Amar Telidji de Laghouat.

L'objectif de notre recherche est d'évaluer certaines propriétés biochimiques (activité antioxydante) et biologiques (activité antimicrobienne), de quelques extraits de la partie aérienne des deux plantes *Nolletia chrysocomoides* (Desf.) et *Thymelaea virgata* (Desf.).

Le travail pratique est subdivisé en plusieurs parties :

- Préparation de la matière végétale ;
- Extraction par sonication ;
- Dosage des polyphénols ;
- Dosage des tocophérols dans les extraits lipidiques ;
- L'étude de l'activité antioxydante des différents extraits ;
- L'étude de l'activité antibactérienne des différents extraits.

II.1. Matériel biologique

II.1.1. Matériel végétal

Les plantes médicinales sont largement employées dans divers problèmes de santé, ainsi les remèdes utilisant les plantes sont moins chers, et ont moins d'effets indésirables (**Hallimi, 2004**).

Dans le cadre de cette étude, nous sommes intéressées à l'étude de la partie aérienne des deux espèces (Tableau 2) : *Nolletia chrysocomoides* (Desf.) appartenant à la famille des *Asteraceae*, et *Thymelaea virgata* (Desf.) appartenant à la famille des *Thymelaeaceae*. Ces deux espèces endémiques avec des propriétés médicinales, sont très connues dans la flore algérienne.

Tableau 2 : Les espèces végétales employées.

Nom scientifique	Synonyme	Famille	Région	L'année de récolte
<i>Thymelaea virgata</i> (Desf.)	<i>Passerina virgata</i> (Desf.)	Thymelaeaceae	Aflou	2021
<i>Nolletia chrysocomoides</i> (Desf.)	<i>Conyza chrysocomoides</i>	Asteraceae		

II.1.1.1. Description botanique des plantes étudiées

A. Les Thymelacées

- **Généralité sur la famille des *Thymelaeaceae***

Les *Thymelaeaceae* sont une petite famille de dicotylédones composée de quelque 1200 espèces réparties en 67 genres. Elle constitue l'une des principales familles parmi les neuf formant l'ordre des Malvales (Judd *et al.*, 2002).

Les membres de cette famille sont répandus dans les zones tropicales et tempérées de la planète, particulièrement en Afrique, mais sont absents dans les régions froides (Vernon *et al.*, 2007).

- **L'espèce *Thymelaea virgata* (Figure 6)**

C'est une plante vivace pubescente-cendrée ; avec les caractéristiques botaniques suivantes (Quézel et Santa, 1963 ; Ozenda, 2004) :

- ✓ Tiges grêles, dressées ou diffuses, entièrement feuillées.
- ✓ Feuilles petites et linéaires.
- ✓ Capitules hémisphériques, hétérogames, multiflores, discoïdes, de 1 cm de diamètre environ, peu nombreux sur chaque tige.
- ✓ Fleurs jaunâtres, les marginales femelles et filiformes, les autres hermaphrodites et fertiles.
- ✓ Bractées de l'involucre velues lancéolées-linéaires, les intérieures aussi longues que les fleurs.



Figure 6: Photographie illustrant l'espèce *Thymelaea virgata* (Desf.)

Source: [Thymelaea virgata subsp. broussonetii - Plant Biodiversity of South-Western Morocco \(teline.fr\)](http://teline.fr)

B. Les Astéracées

- **Généralité sur la famille des *Asteraceae***

La famille des Astéracées est la plus large famille de Spermatophytes, mais également l'une des plus évoluées. Elle contient 1530 genres et plus de 23 000 espèces. Elle se compose principalement de plantes herbacées mais également d'espèces ligneuses telles que des arbustes et plus rarement des arbres.

Les plantes de la famille des *Asteraceae* se rencontrent sur toute la surface de la terre, c'est une famille cosmopolite avec une diversification plus importante au niveau des régions sèches (**Filleul, 2018**).

- L'espèce *Nolletia chrysochomoides* (Figure 7)

Plante vivace pubescente-cendrée avec les caractéristiques botaniques suivantes (Quézel et Santa, 1963 ; Ozenda, 2004) :

- ✓ Tiges grêles, dressées ou diffuses, entièrement feuillées ;
- ✓ Feuilles petites et linéaires ;
- ✓ Fleurs jaunâtres, les marginales femelles et filiformes, les autres hermaphrodites et fertiles
- ✓ Bractées de l'involucre velues lancéolées-linéaires, les intérieures aussi longues que les fleurs.



Figure 7: Photographie illustrant l'espèce *Nolletia chrysochomoides* A : Fleurs jaunâtre, B : Capitule, fleurs périphériques, centrales et akènes.

Source : [Nolletia chrysochomoides, Flore du Maroc, famille des Asteraceae \(floramaroccana.fr\)](http://floramaroccana.fr)

C. Répartition géographique

- ✓ Le genre *Thymelaea* comporte d'environ 30 Espèces, ce genre est représenté par 8 espèces répartis principalement en Algérie (Kerbab, 2017).
- ✓ Le genre *Nolletia* Cass est peu représentée dans les collections et publications, son aire de répartition naturelle est : l'Espagne, l'Afrique du nord, signalée de peu de station du Sahara occidental en mauritanien. Probablement dans le Maroc saharien (Quézel et Santa, 1963).

Tableau 3: Distribution des plantes étudiées en Algérie.

Espèces	Distribution
<i>Nolletia chrysocomoides</i> (Desf.)	Commun dans le Sahara septentrional algérien ; Laghouat, Djelfa, Biskra, Hoggar...
<i>Thymelaea virgata</i> (Desf.)	Hauts-Plateaux oranais, algérois et constantinois, l'Atlas Tellien, l'Atlas Saharien oranais, algérois et constantinois.

Source : [Thymelaea virgata subsp. broussonetii - Plant Biodiversity of South-Western Morocco \(teline.fr\)](#) ; [Nolletia chrysocomoides, Flore du Maroc, famille des Asteraceae \(floramaroccana.fr\)](#)

II.1.1.2. Systématiques des plantes étudiées

Tableau 4: Classification systématique des plantes étudiées.

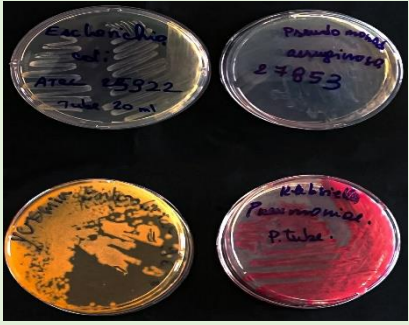
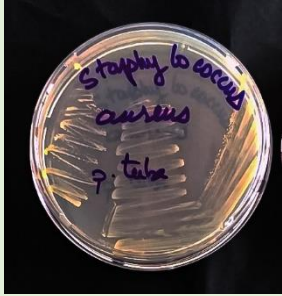

Règne	Plantae	
Embranchement	Tracheophyta	
Sou -embranchement	Angiospermes	
Classe	Magnoliopsida (Dicotylédones)	
Ordre	Malvales	Asterales
Famille	Thymelaeaceae	Asteraceae
Genre	Thymelaea Mill.	Nolletia Cass.
Espèces	<i>Thymelaea virgata</i> (Desf.)	<i>Nolletia chrysocomoides</i> (Desf.)

Source : https://www.gbif.org/api/widgets/literature/button?YOUR_FILTER

II.1.2. Les souches microbiennes utilisées

Les souches microbiennes utilisées étaient des souches de référence obtenues auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC), appartenant à des familles différentes et à des catégories différentes comme il est mentionné dans le tableau ci-dessous. Ils ont été recueillis du laboratoire vétérinaire de Laghouat et du labo microbiologique de l'université de Tlemcen.

Tableau 5 : Références des microorganismes testés dans notre étude.

	Souches bactériennes	Référence	Observation macroscopique
Gram (-)	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 9610	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 70603	
Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	
Levure			
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 26790	

II.2. Méthode expérimentale

L'ensemble du travail mené dans cette étude est illustré dans l'organigramme ci-après.

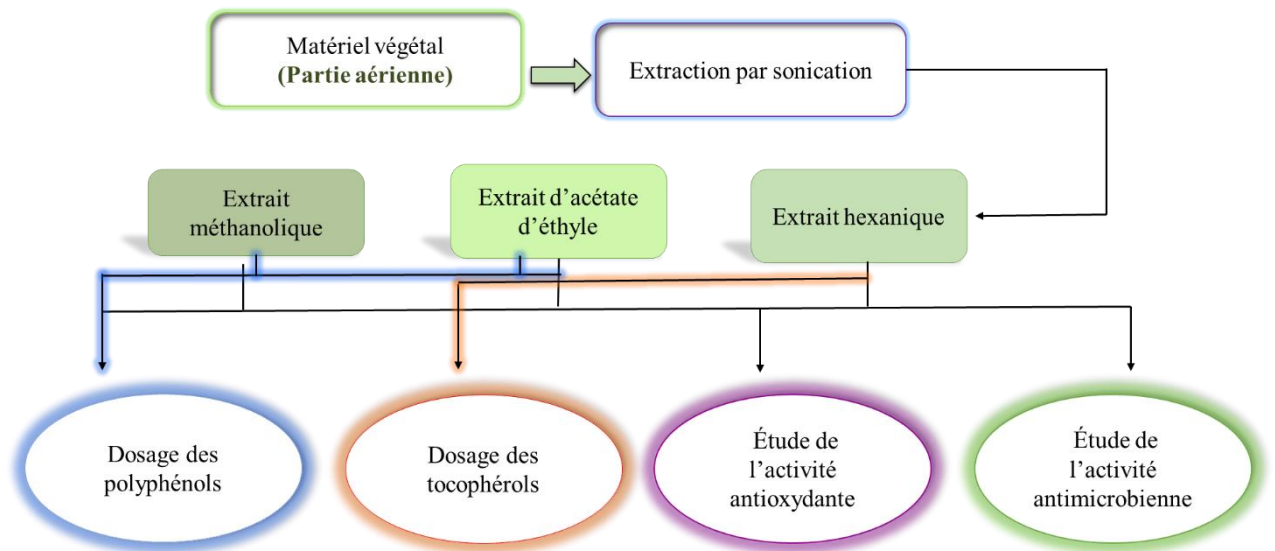


Figure 8: Organigramme de notre travail.

II.2.1. L'extraction

Les techniques d'extraction traditionnelles demande beaucoup de temps et des consommateurs, pour cette raison, plusieurs techniques ont été mises au point pour extraire les composés actifs des plantes.

Dans cette étude, nous avons utilisé la technique d'extraction par sonication, qui est une méthode simple, efficace et peu coûteuse, elle permet :

- De travailler à des températures relativement basses et d'éviter la thermodestruction des composés.
- D'utiliser une large gamme de solvant afin d'obtenir différents composés naturels.

✚ Principe :

L'utilisation de transducteurs, qui sont les principaux composants des équipements à ultrasons puisqu'ils sont responsables de la transformation de l'énergie mécanique ou électrique en formes d'ondes acoustiques, a été utilisée aux extractions assistées par ultrasons. L'onde sonore se déplace à travers le récipient rempli de milieu jusqu'à ce que la résonance acoustique soit produite par les transducteurs, et que la compression et la raréfaction (régions de haute et basse pression) se forment (**Ranjha et al., 2021**).

La cavitation et l'implosion déclenchées par la sonication entraînent une rupture de la paroi cellulaire et augmentent le nombre de cellules perturbées. Lorsque la cellule est perturbée, le solvant pénètre dans la cellule et le matériel végétal intracellulaire est incorporé dans le solvant (**Ranjha et al., 2021**).

✚ Procédure :

Des extractions successives avec des solvants organiques de polarités croissantes (hexane, acétate d'éthyle, méthanol) sont réalisées sur les poudres de la partie aérienne des deux espèces étudiées (Figure 9).

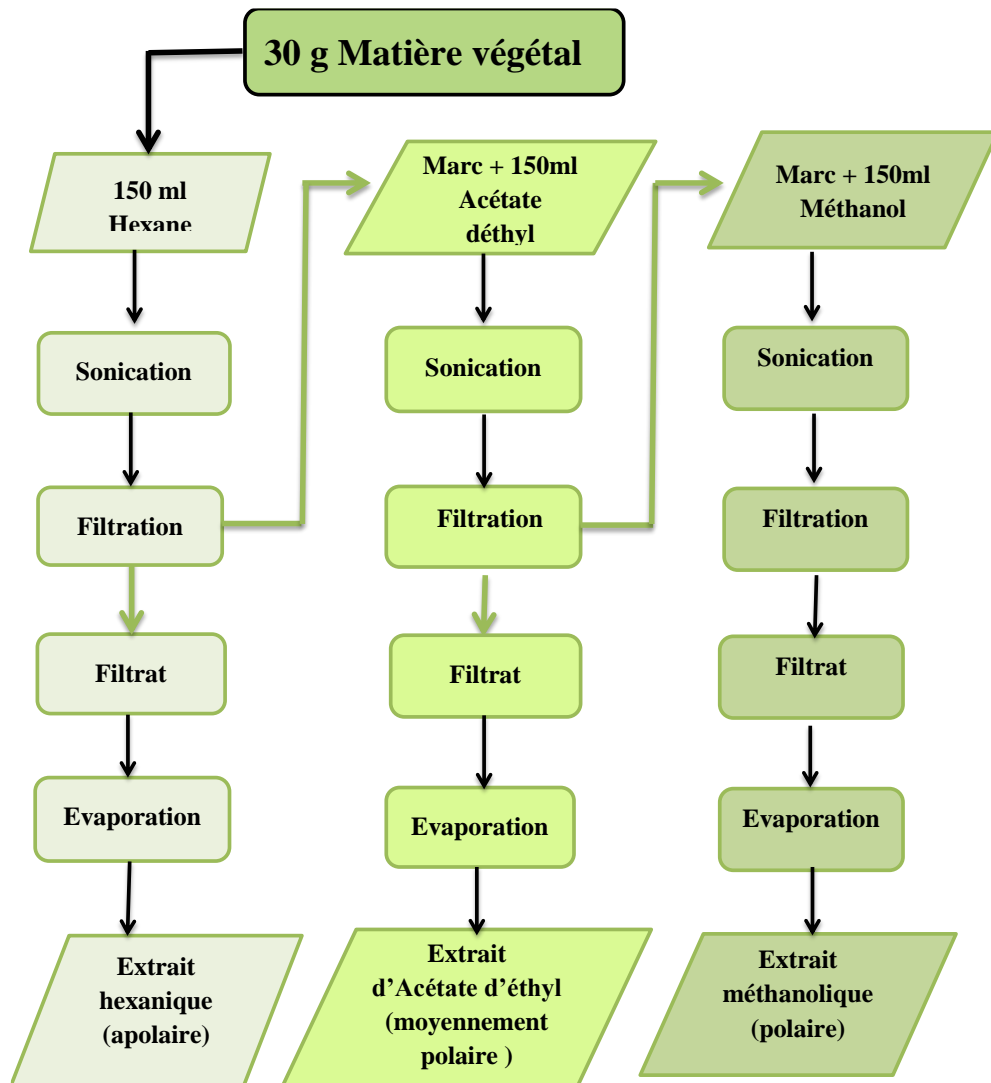


Figure 9: Protocol d'extraction.

Extraction par l'hexane : 30 g de poudre végétale est introduite dans des flacons, et 150 ml d'hexane est ajoutée. Après 20min d'extraction par ultrason à température de 30°C, le mélange est filtré dans un ballon, et le filtrat est concentré sous pression réduite au rotavapor. L'extrait hexanique obtenu est pesé après séchage.

Extraction par l'acétate d'éthyle : Avec la même procédure, une extraction par l'acétate d'éthyle, est réalisée sur le résidu végétal issu de la première extraction pour extraire les composés moyennement polaires et, l'extrait obtenu est pesé après séchage.

Extraction par le méthanol : Avec la même procédure, une extraction par le méthanol, est réalisée sur le résidu végétal issu de la deuxième extraction, pour extraire les composés polaires.

II.2.2. Analyses quantitatives des extraits

II .2.2.1. Rendement des extraits

Les rendements d'extractions sont calculés selon la formule suivante :

Rendement (%) : $(\text{Poids de l'extrait brut obtenu} / \text{Poids de la poudre végétale}) \times 100$

II.2.2.2. Dosage des composés phénoliques totaux

✚ Principe :

Le dosage des composés phénoliques totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Ce réactif de couleur jaune est composé par un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$). Lors de l'oxydation des phénols, il est réduit en un mélange d'oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration produite, dont l'absorption maximal est 760 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Zbadi *et al.*, 2018**).

✚ Procédure :

Pour établir la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, une gamme des solutions diluées d'acide gallique a été préparée à partir d'une solution étalon. 250 μl de réactif de Folin-Ciocalteu 10% (dilué 10 fois) ont été ajoutés à 50 μl de chaque solution diluée de l'acide gallique (entre 0,025 et 0,25 g/l) ou de l'extrait végétal dilué, après 2 minutes, 1 ml de carbonate de sodium Na_2CO_3 à 4% (m/v) ont été ajoutés, ces solutions ont été maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. La lecture de l'absorbance de chaque solution est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc (ce qui nous a permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et de doser les phénols totaux dans les extraits végétaux).

Les résultats sont exprimés en milligramme équivalents acide gallique par gramme d'extrait sec.

II.2.2.3. Dosage d' α -tocophérol

Principe :

Cette méthode colorimétrique est basée sur la réaction d'oxydoréduction entre les tocophérols et le fer ferrique (Fe^{3+}) qui est réduit en fer ferreux (Fe^{2+}). Ce dernier, en présence de phénantroline forme un complexe rouge-orangé stable dont le coefficient d'extinction molaire à 510 nm est très élevé.

Procédure :

Une courbe d'étalonnage est tracée à partir du tocophérol commercial, permet de relier l'absorbance et la concentration de tocophérol exprimée en g/l. À partir d'une solution commerciale de la vitamine E on a préparé une solution de concentration 0,1175g/l, ensuite nous avons préparé dans l'éthanol différentes dilutions (de 0,01175 à 0,05875 g/l). Par la suite, 1ml de réactif phénantroline et 0.5ml FeCl_3 (solutions éthanoliques) sont ajoutés à 1 ml de chaque solution fille ou de l'extrait végétal dilué. Après 5min on mesure l'absorbance à 510 nm.

II.2.3. Étude des activités biologiques

II.2.3.1. Test de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer *in vitro*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux libres. Dans notre travail, nous avons utilisé la méthode de DPPH.

Principe :

Le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) qui est un radical libre stable, en acceptant un électron ou un radical hydrogène, devient une molécule stable (Figure 10). L'effet des antioxydants sur ce radical se traduit par leur capacité à lui donner un radical hydrogène.

La réduction du radical libre DPPH \cdot par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence des antioxydants.

Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct des différentes substances actives dans nos extraits.

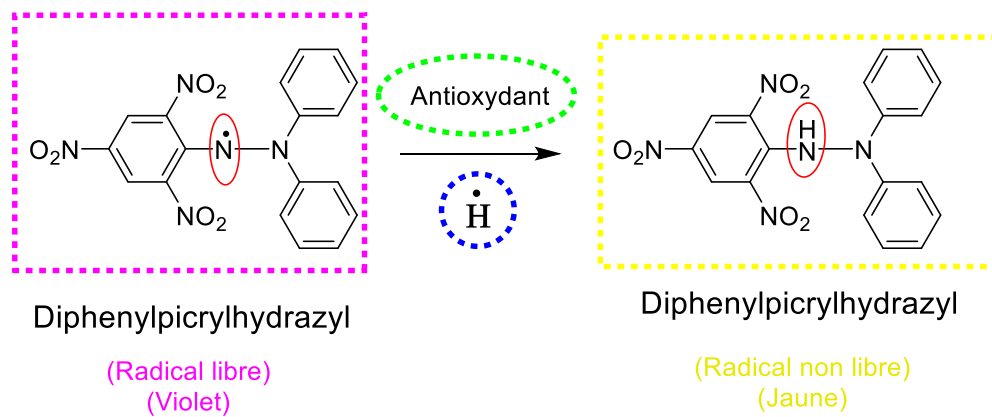


Figure 10: Réaction de radical DPPH.

✚ Procédure

Un volume de 500 μl de solution méthanolique/éthanolique de DPPH \cdot (250 μM) a été mélangé à 500 μl d'extrait et agité à l'aide d'un vortex. Le mélange a été incubé pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante. La capacité antioxydante (CA) des composés phénoliques de l'extrait a été exprimé en milligrammes équivalents en acide ascorbique (vitamine C/Méthanolique) par gramme d'extrait sec (mg AA/g ES) et celle des extraits lipidiques a été exprimé en milligrammes équivalents en tocophérol (vitamine E/Ethanolique) par gramme d'extrait sec (mg VE/g ES).

Le pourcentage d'inhibition du DPPH (PI%) est calculé selon la formule suivante :

$$\text{PI}\% = [1 - (A/A_0)] \times 100$$

A₀ : Valeur d'absorbance du blanc (DPPH dans le solvant).

A : Valeur d'absorbance de l'extrait.

II.2.3.2. Activité antimicrobienne

L'évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits organiques a été réalisée par deux méthodes :

- La méthode de diffusion sur gélose
- La méthode de micro dilution en milieu liquide pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales bactéricides (CMB) et fongicide (CMF).

- **Milieu de culture :**

Les milieux de culture utilisés pour réaliser l'activité antimicrobienne sont : Mueller Hinton (MH) et Sabouraud (Annex III).

- **Préparation des disques :**

Le papier Wattman N°3 a servi pour la préparation des disques de 5 mm de diamètres à l'aide de l'emporte-pièce en se référant aux diamètres des disques d'antibiotiques commercialisés.

- **Activation des souches stockés :**

Les souches microbiennes sont repiquées sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive à partir d'un milieu de conservation, puis incubées pendant 18h à 37 °C afin de les activer et obtenir des cultures jeunes. À partir de ces cultures jeunes, quelques colonies de la culture ont été diluées dans de l'eau physiologique stérile pour atteindre une densité optique de 0,08 à 0,1, à 625 nm ; ce qui correspond à une concentration de 10^8 cellules/ml.

- Préparation des dilutions :

On Pèse 0,05g de chaque extrait des deux plantes par une balance analytique et on l'introduit dans un tube à essai contenant 4ml de DMSO, on obtient alors une solution mère (0,0125g/ml), ensuite, on Introduit 500 μ l de la solution mère dans des tubes contenant 500 μ L 2000 μ l de DMSO pour obtenir les dilutions (0,00625g/ml), (0,0025 g /ml) respectivement (Figure 11).

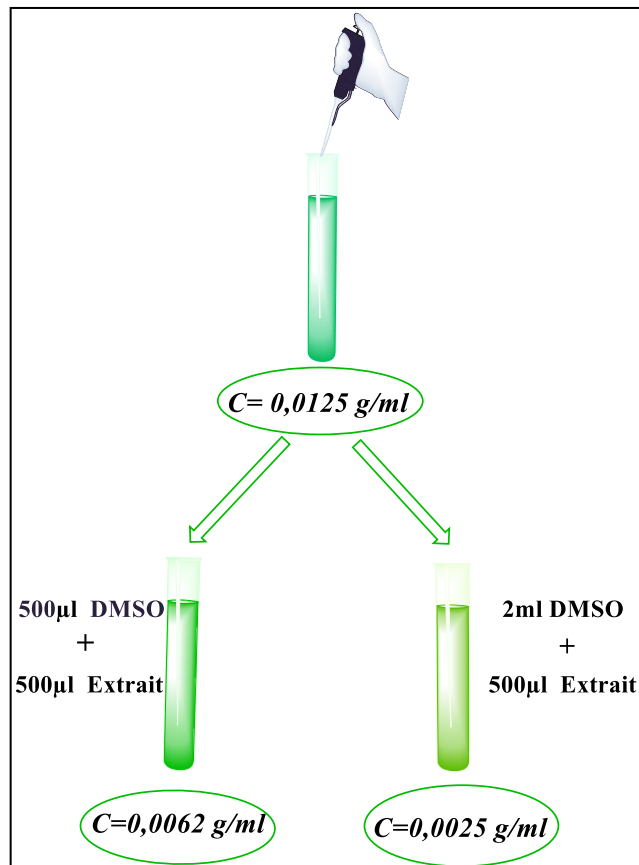


Figure 11: Préparation des dilutions des extraits des plantes.

- Disques d'antibiotiques et d'antifongiques

Le choix des disques a été choisi en fonction des souches sélectionnées et la disponibilité, nous avons utilisé les ATB et les ATF représentés dans le tableau 6.

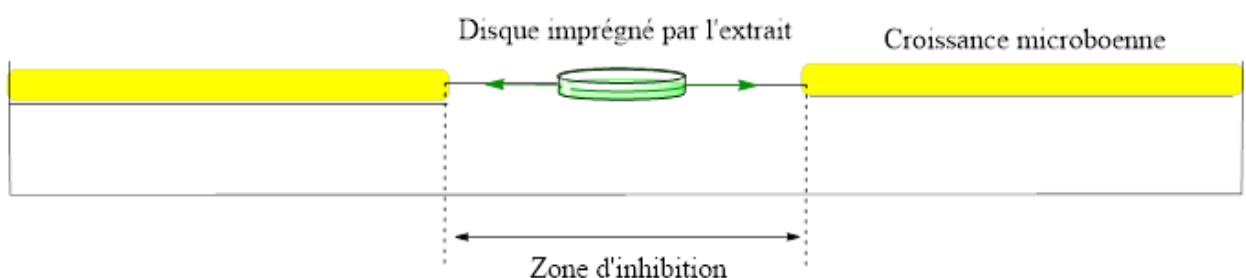
Tableau 6: Les antibiotiques et l'antifongique utilisés.

Antibiotique	Le code	La dose
Amikacine	AK100	10mg/ml
Doxycycline	DXT30	30mg/ml
Gentamycine	GEN10	10mg/ml
Spiramycine	SP10	10mg/ml
Céphalosporine		1g
Antifongique		
Amphotéricine b	Fungizone	40ml 10%

Nous avons réalisé le test d'antibiogramme afin de valider nos souches microbiennes et de comparer la sensibilité de ces derniers vis-à-vis les ATB ou les ATF à leur sensibilité vis-à-vis nos extraits.

A. La méthode de diffusion sur gélose

La méthode de diffusion du disque est utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits bruts des deux plantes, en raison de sa simplicité et de son efficacité dans le test de la sensibilité microbienne.

**Figure 12:** Schéma simplifié du principe de la méthode de diffusion sur milieu solide.

L'activité antimicrobienne des différents extraits des deux plantes a été réalisée contre une seule souche fongique (la levure *Candida albicans*) et cinq souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*.) en utilisant la méthode de diffusion sur gélose

- Après réactivation des souches, un inoculum est prélevé dans l'eau physiologique à partir de cultures jeunes incubées de 18 h à 24 heures à 37°C afin de préparer une suspension ajustée à une concentration de 10^8 cellules/ml.
- Des écouvillons stériles ont été utilisés pour l'ensemencement en surface du milieu gélosé MH, pour les bactéries, et le milieu Sabouraud, pour la levure.
- Les disques du papier Wattman N° 3 (5 mm de diamètre) sont déposés aseptiquement à l'aide d'une pince stérile sur la gélose inoculée, puis imprégnés à l'aide d'une micropipette par 10 µl de chaque concentration (0,0125 g/ml, 0,00625 g/ml, 0,0025 g/ml) de chaque extrait.
- Les boîtes de pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante, puis incubées à l'étuve à une température de 37°C pendant 24h.
- Dans les boîtes de contrôle, des disques trempés de DMSO sont utilisés comme contrôle négatif et des disques standards d'antibiotiques sont utilisés comme contrôle positif
- La lecture des résultats se fait après incubation, par la mesure des diamètres des zones d'inhibition, pour les différentes concentrations des différents extraits à l'aide d'un pied à coulisse.
- L'opération a été répétée 3 fois pour chaque dilution (3 disques de la même dilution par boîte).

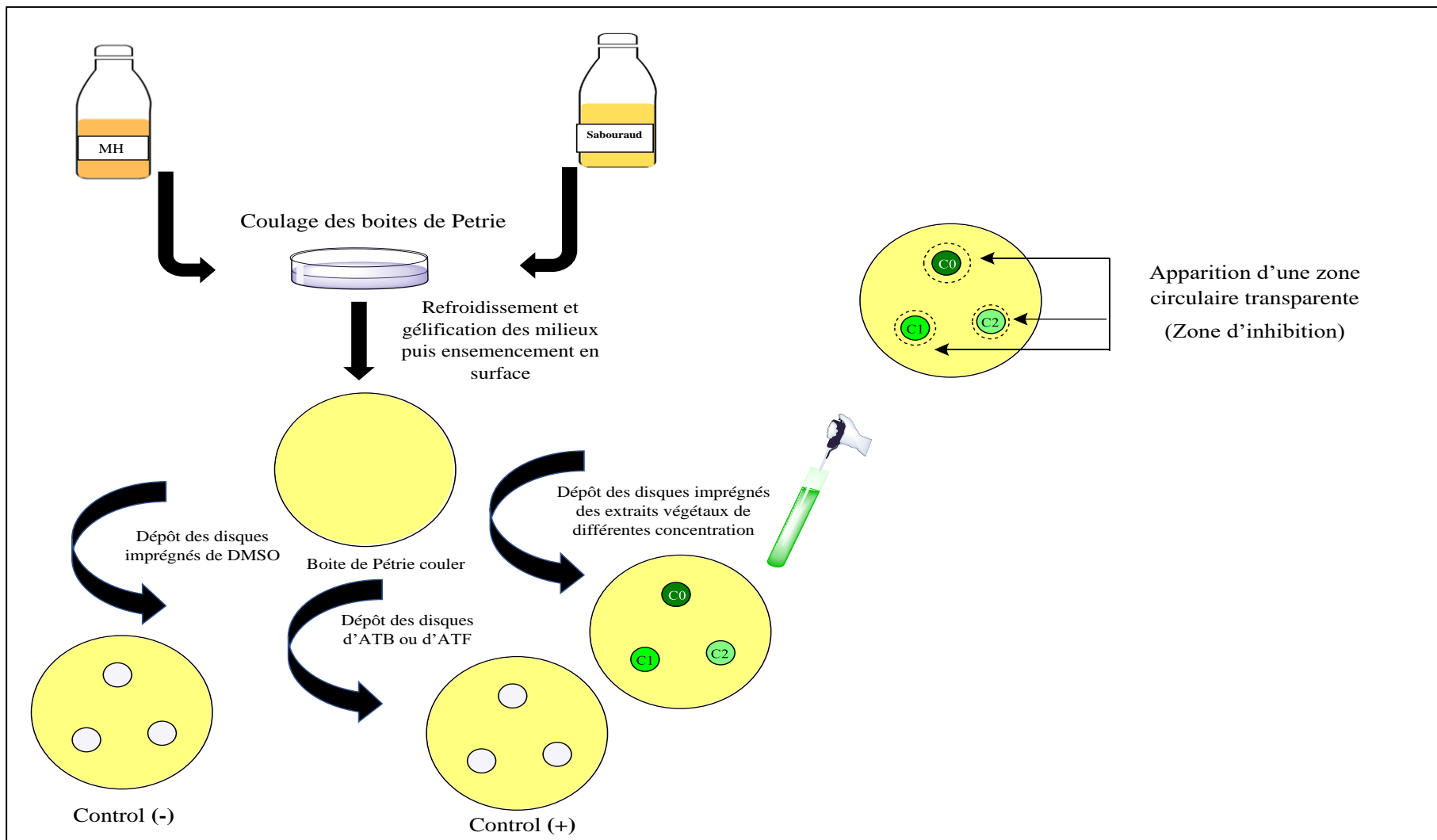


Figure 13: Schéma de la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques.

B. La méthode de micro dilution sur milieux liquide (Détermination des CMI, CMB et CMF)

Les CMI, CMB et les CMF de différents extraits ont été déterminés en milieu liquide dans des microplaques en plastique, stérile à 96 puits à fond rond. Les puits sont alignés en 8 lignes (A à H) et 12 colonnes (1 à 12). 100µl de milieu de culture liquide (BN) sont disposés dans les puits. Ensuite, 100µl des solutions d'extraits ($C_0 = 0,0125$ g/ml) ont été ajoutés dans la colonne 1 puis dilués en série de la colonne 1 à 6 (dilution en cascade de telle sorte que tous les puits contiennent 100µl de l'extrait dilué avec le BN). L'inoculum a été réalisé par dépôt de 100µl de la suspension microbienne avec une charge de 10^8 cellule /ml, chaque ligne contenait la différente dilution d'un extrait organique et une seule souche microbienne (Figure14).

Les puits de la colonne 7 sont conservés pour le control négatif (100µl milieu + 100µl suspension microbienne). En revanche les puits de A8 à E8 sont conservés pour le control positif des souches bactérienne (100µl milieu MH + 100 µl ATB Céphalosporine), alors que les puits G8 et H8 pour le control positif des souche fongiques (100µl milieu Sabouraud + 100 µl ATF Amphotéricine B).

Les microplaques sont incubées dans l'étuve pendant 24h à 37°C. Après 24h d'incubation, 40µl du révélateur de la croissance microbienne (INT) (0,2 mg/ml) a été ajouté dans chaque puit. Après 15 min un changement de couleur est observé dans les puits. L'apparition d'une coloration violette montre une croissance microbienne (Eloff, 1998).

Généralement, La CMI correspond à la concentration de puit sans couleur (limpide) qui existe juste avant le premier puit coloré.

Après avoir révélé la CMI, nous avons procédé à la détermination de la CMB. Cette dernière a été déterminée en repiquant les puits sans croissance visible à l'œil nu par ensemencement à l'aide d'une micropipette sur une boîte de Pétrie gélosée. Après incubation pendant 24 heures à 37°C., les boîtes où il n'avait pas une croissance microbienne correspondents aux concentrations des extraits qui représentent les CMB.

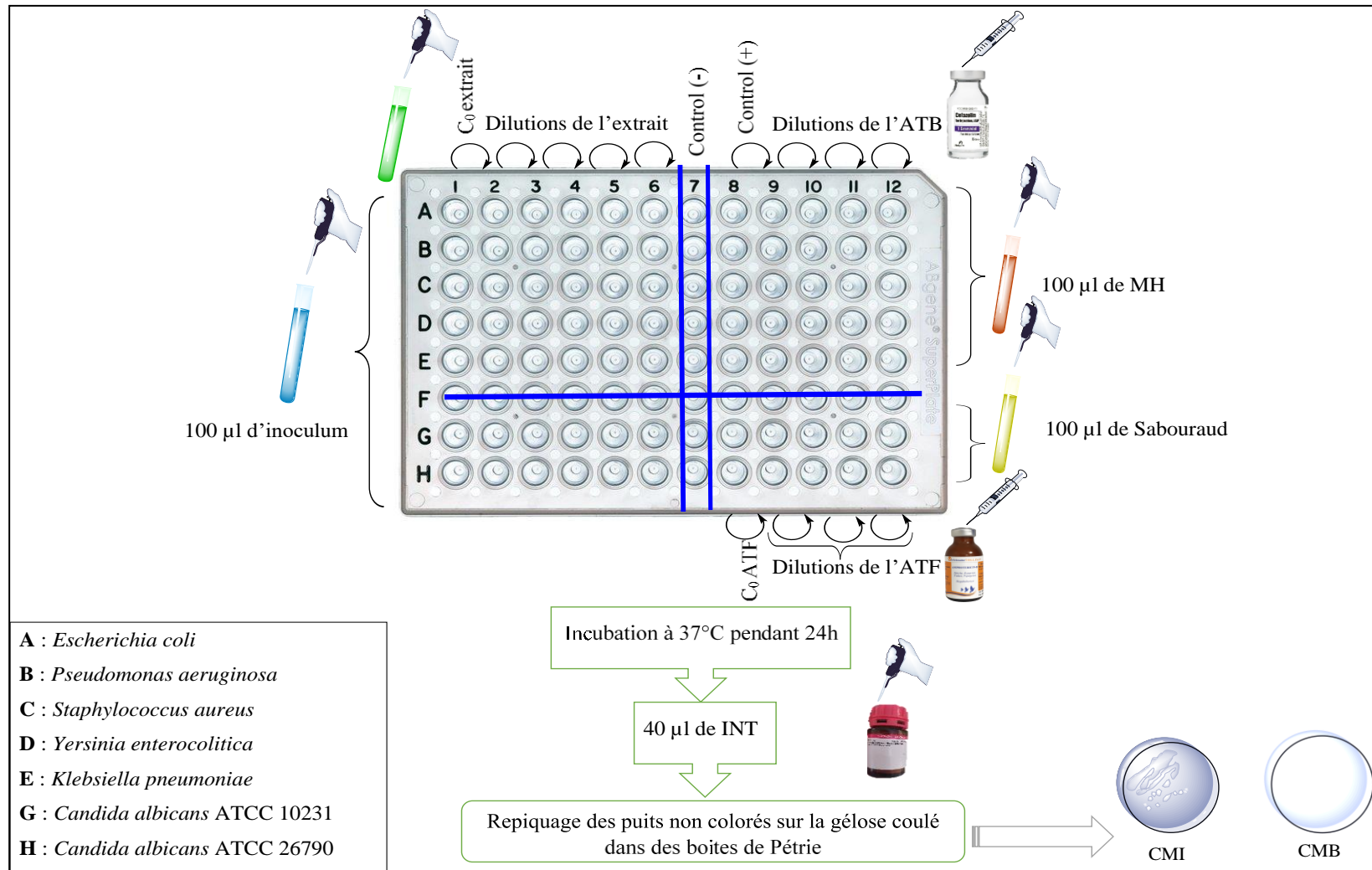


Figure 14: Schéma de la méthode de micro dilution sur milieu liquide.

Résultats et discussion

Partie III : Résultats et discussion

III.1. Rendement des extractions

Les rendements (%) et les propriétés (l'aspect et la couleur) des extraits étudiés, selon le solvant utilisé, sont présentés dans le tableau 07.

Tableau 7: Le Rendement (%), Aspect, et Couleur des différents extraits étudiés.

Plantes étudiées	Solvant	Aspect	Couleur	Rendement (%)
<i>Thymelaea virgata</i> (Desf.)	Hexane	Pâte collante	Vert foncé	0,69
	Acétate d'éthyle	Pâteux	Vert bouteille	3,72
	Méthanol	Pâteux	Vert militaire	1,48
<i>Nolletia chrysocomoides</i> cass	Hexane	Pâteux	Vert olive	1,39
	Acétate d'éthyle	Pâteux	Vert bouteille	1,34
	Méthanol	Pâteux	Vert militaire	1,91

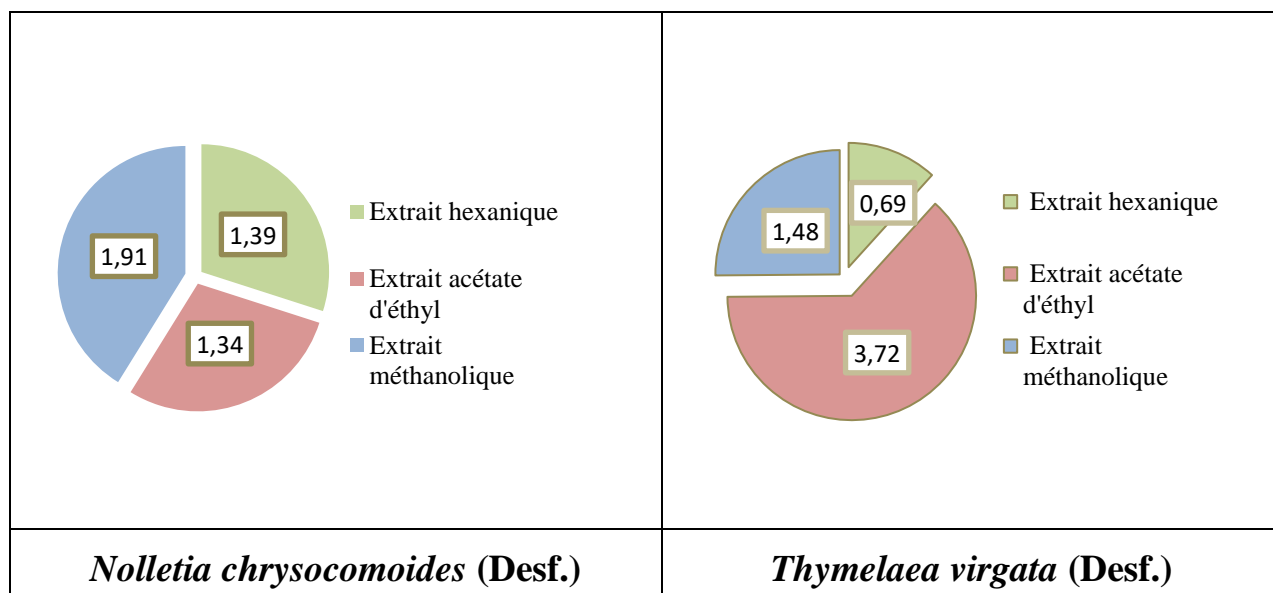


Figure 15: Comparaison entre les rendements en % des différents extraits.

Selon les résultats présentés dans le tableau 7, on remarque que la plupart de nos extraits ont un aspect pâteux avec une coloration verte (de claire au foncé).

Les résultats indiquent que les solvants utilisés ont donné des rendements variables entre 0,69% et 3,72, ainsi le rendement le plus élevé est celui de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Thymelaea virgata* (Desf.) (3,72%), suivi de l'extrait méthanolique de *Nolletia chrysocomoides* (Desf.) (1,91%). De plus, les deux extraits hexaniques et d'acétate d'éthyle de *Nolletia chrysocomoides* (Desf.) ont presque le même rendement. Tandis que l'extrait hexanique de *Thymelaea virgata* (Desf.) présente le rendement le plus faible (0,69%).

Le méthanol est un solvant alcoolique capable d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction. Dans ce travail, le méthanol a donné le rendement le plus élevé chez l'espèce *N. chrysocomoides*, alors que chez *T. virgata*, le rendement le plus important est celui de l'extrait d'acétate d'éthyle. Ce qui confirme que plus de l'effet de la polarité de solvant, plusieurs facteurs peuvent influencer le rendement d'extraction, tels que l'espèce végétale, l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, le contenu de chaque espèce en métabolites.

Nous avons constaté une différence de rendement entre l'extrait méthanolique de *Thymelaea virgata* obtenu dans ce travail (1.48%), avec celui obtenu par **Zeghmar et Ghoul 2019** sur espèce *Thymelaea hirsuta* **Endel** avec un rendement de 1,28% en utilisant l'extraction par macération.

III.2. Dosage des polyphénols

La teneur en polyphénol totaux des différents extraits est calculée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Figure 16), et les quantités des polyphénols ont été rapportées en mg équivalent d'acide gallique (EAG)/gramme d'extrait sec. Tous les essais ont été reproduits au moins trois fois.

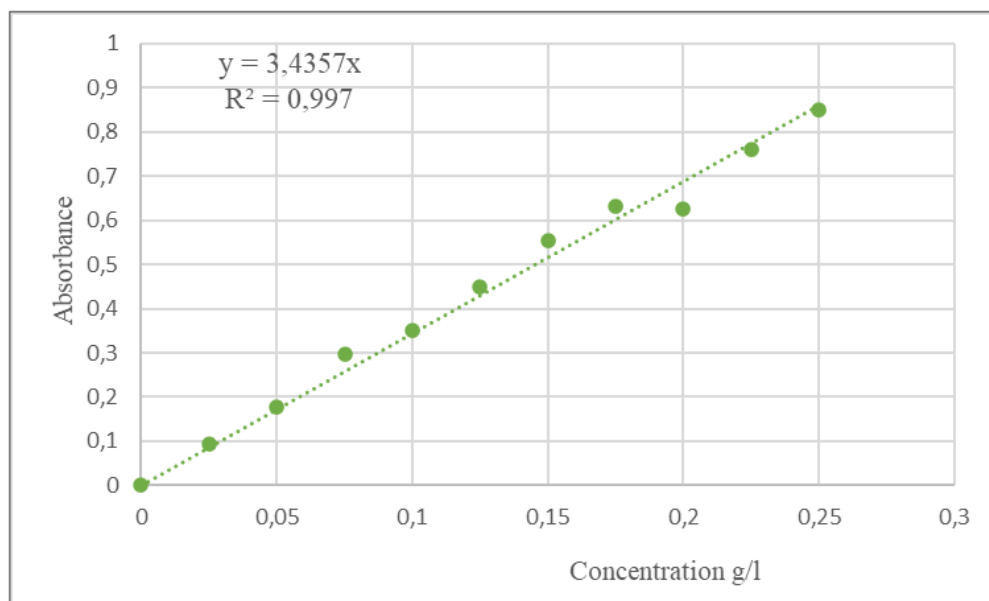


Figure 16: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Tableau 8: Teneurs en polyphénols totaux dans les différents extraits de *Thymelaea virgata* et *Nolletia chrysocomoides*.

Plantes étudiées	Fraction	Polyphénols totaux (mg EAG/g ES)
<i>Thymelaea virgata</i> (Desf.)	Acétate d'éthyle	12,632 ± 1,804
	Méthanol	110,215 ± 2,688
<i>Nolletia chrysocomoides</i> (Desf.)	Acétate d'éthyle	20,413 ± 0,654
	Méthanol	63,645 ± 5,108

Pour les deux espèces, les extraits méthanolique présente une teneur élevée en composés phénoliques. Ceci, pourrait être dû à la nature et la polarité des composés phénoliques présents dans la partie aérienne des deux plantes.

Selon les valeurs mentionnées dans le (Tableau 8), les teneurs en polyphénols totaux varient de 12,632 à 110,215 mg EAG/g ES suivant la polarité des solvants. Nous avons noté que l'extrait méthanolique de *Thymelaea virgata* (Desf.) été le plus riche avec un taux de **110,215** mg EAG/g ES, alors que l'extrait d'acétate d'éthyle de *Thymelaea virgata* (Desf.) avait la teneur la plus faible (12,632 mg EAG/g ES).

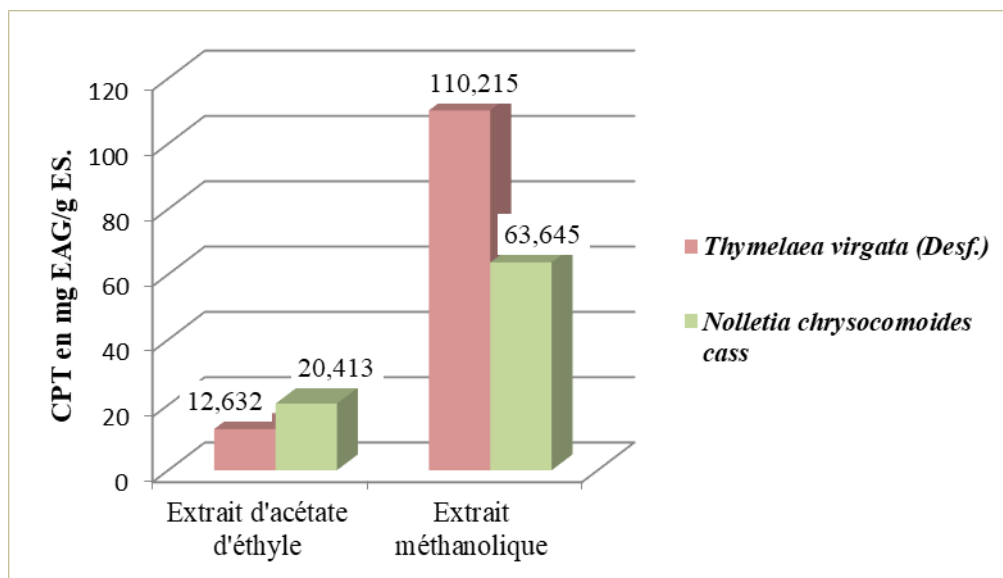


Figure 17 : Teneur en polyphénols totaux des échantillons.

De nombreuses études ont montré et justifié l'importance des solvants dans l'extraction des composés phénoliques. La récupération des polyphénols et d'autres composés antioxydants de la matière végétale dépend, considérablement, de la solubilité de ces composés dans un solvant donné, de la polarité des solvants et de la viscosité. Ainsi, les solvants tels que le méthanol et l'acétate d'éthyle sont connus par leur pouvoir extracteur des polyphénols. (Naczk et Shahidi, 2006).

Peu de données bibliographiques concernant la teneur en composés phénoliques des plantes choisies sont disponibles. Dans des travaux précédents, Zeghmar et Ghoul 2019, ont trouvé une teneur élevée en composé phénolique (132.92 EAG mg/g ES) dans la fraction d'acétate d'éthyle de *Thymelea hirsuta* Endel., obtenue par macération. Alors que, Kerboub, 2019 a trouvé une teneur de $43,05 \pm 2,11$ mg EAG/g ES dans l'extraits méthanolique de *Thymelaea hirsuta* Endel, et qui est une valeur très faible par rapport à nos extraits méthanoliques.

III.3. Dosage des tocophérols

Les teneurs en tocophérols des extraits hexaniques sont déterminées à partir de la courbe d'étalonnage de la vitamine E (Figure 18). Les valeurs sont exprimées en milligramme équivalent en α -tocophérol par gramme en extrait sec.

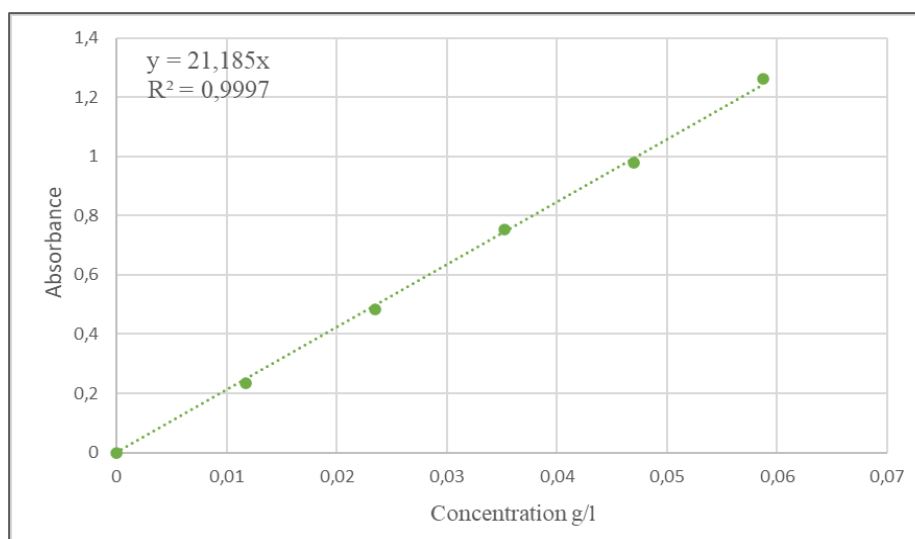


Figure 18: Courbe d'étalonnage de la vitamine E.

Tableau 9: Quantité des tocophérols dans les extraits hexaniques de *Thymelaea virgata* et *Nolletia chrysocomoides*.

Plantes étudiées	Extraits	Tocophérols totaux (mg EVE/g ES)
<i>Thymelaea virgata</i> (Desf.)	Hexanique	15,829 ±0,0008
<i>Nolletia chrysocomoides</i> (Desf.)	Hexanique	5,3987 ±0,0002

D'après les résultats du tableau 9, on déduit que la grande teneur est enregistrée pour *Thymelaea virgata* (Desf.) avec 15,829 mg EVE/g ES et la petite teneur pour *Nolletia chrysocomoides* (Desf.) avec 5,3987 mg EVE/g ES.

Mechraoui et Gellouza, 2020 ont trouvés des valeurs de quantité des tocophérols dans l'huile d'olive s'échelonnent entre 0,121 à 3,819 mg /g d'huile. Selon le mois de récolte, la teneur en tocophérols diminue tout le long de la maturation jusqu'à la dernière date d'échantillonnage

Les quantités en tocophérols sont sûrement estimées car la méthode colorimétrique utilisée pour le dosage est en corrélation avec d'autres composés qui réagissent avec le phénantroline, pour ce, une chromatographie en phase liquide à haute performance est nécessaire, pour obtenir des résultats plus précis, séparer et quantifier les isomères des tocophérols.

III.4. Étude des activités biologiques

III.4.1. Résultats du test du pouvoir antioxydant

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits des deux plantes a été réalisée par la technique chimique « le piégeage du radical libre DPPH », la mesure de l'absorbance été effectuée par spectrophotométrie à 517 nm. Cette activité est évaluée par rapport aux vitamines C et E, par l'utilisation des courbes de variation de pourcentage d'inhibition (PI %) du radical DPPH en fonction des concentrations (mg/ml) de ces deux vitamines (Figure 19). La capacité antioxydante des composés polaires est exprimée en mg équivalents en acide ascorbique (vitamine C) par g d'extrait sec (mg EVC/g ES) et celle des extraits lipidiques a été exprimé en mg équivalents en tocophérol (vitamine E) par g d'extrait sec (mg EVE /g ES).

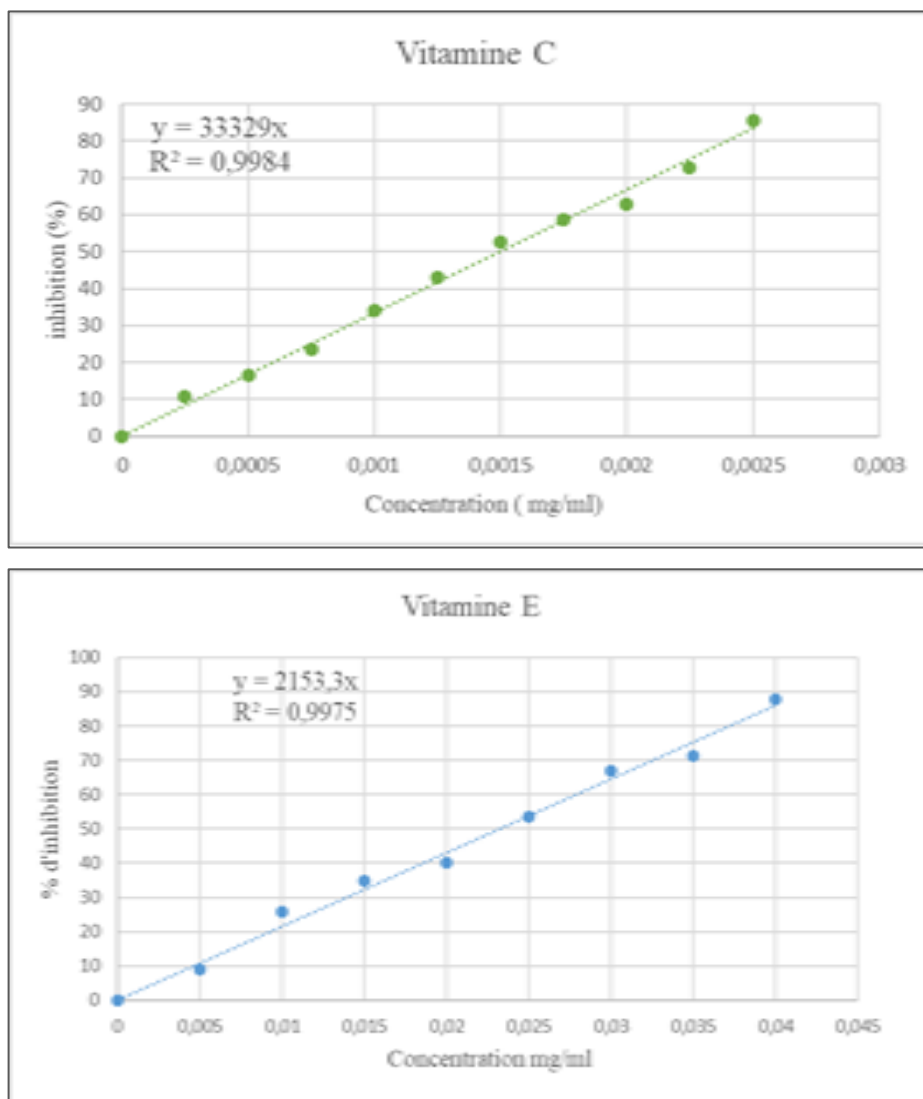


Figure 19: Le pouvoir antioxydant des standards, graphes représentant le pourcentage d'inhibition de radical libre (DPPH) en fonction de la concentration des standards en mg/ml.

Tableau 10: Les valeurs des VEEAC, VCEAC en (mg/g ES) et le rapport (C_E / C_{VE} ou C) des extraits hexanique, d'acétate d'éthyle et méthanolique.

Plantes étudiées	Extraits hexanique		Extraits d'acétate d'éthyle		Extraits Méthanolique	
	R (C_E / C_{VE})	VEEAC (mg/g ES)	R (C_E / C_{VC})	VCEAC (mg/g ES)	R (C_E / C_{VC})	VCEAC (mg/g ES)
<i>Thymelaea virgata</i> (Desf.)	162,0884	6,173168	14240,572	0,0778	121,088	8,258
<i>Nolletia chrysocomoides</i> (Desf.)	1237,817	0,809497	1793,892	0,573	249,512	4,007

Les résultats du tableau révèlent que plus le rapport de concentration est petit plus l'activité antioxydante est meilleure et plus les valeurs VCEAC ou VEEAC sont grandes plus l'extrait est un antioxydant puissant.

Nous avons observé que les extraits méthanoliques des deux plantes ont des capacités de piégeage des radicaux DPPH plus fortes que les extraits d'acétate d'éthyle (VCEAC = 8,258 mg/g ES pour *T. Virgata* et 4,007 mg/g ES pour *N. chrysocomoides*), et ces résultats sont proportionnels avec ceux trouvés dans le dosage des polyphénols totaux (Figure 20), une corrélation positive a été établie entre les extraits les plus riches en polyphénols et leurs activités antioxydante.

Ces résultats sont en accord avec ceux annoncés dans la littérature par plusieurs auteurs, qui mentionnent que le potentiel d'activité antioxydante d'un extrait dépend de sa teneur en composés phénoliques (Amri *et al.*, 2015 ; Stageos *et al.*, 2012 In (Bouchouka, 2016).

Au vu des résultats rassemblés dans le tableau 10, la capacité des extraits hexaniques, est en corrélation positive avec le taux des tocophérols (Figure 20), du fait que la plante la plus riche en tocophérols (*N. chrysocomoides*) possède l'activité antioxydante la plus puissante,

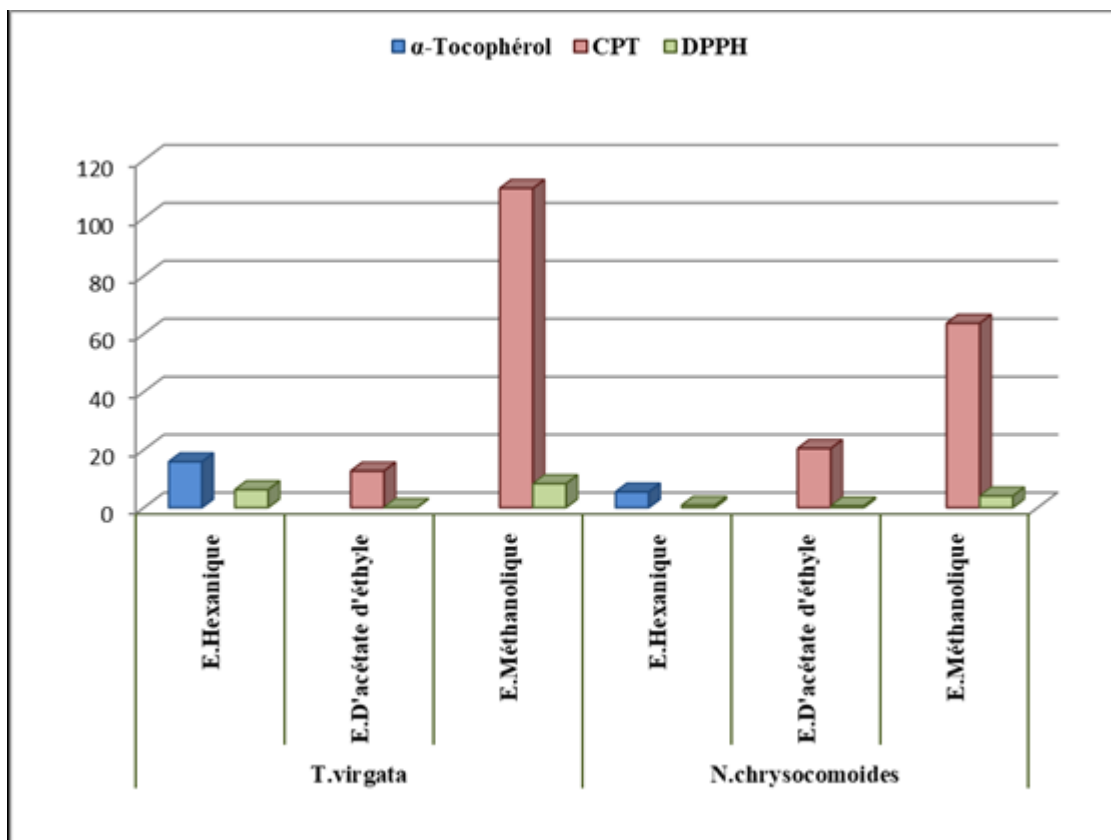


Figure 20: L'activité antioxydante, la teneur en composés phénoliques et le taux en tocophérols des différents extraits.

Puisqu'il n'y a pas de travaux antérieurs concernant l'étude du pouvoir antioxydant de ces deux espèces, nous avons comparés nos résultats avec ceux trouvés par nos collègues en utilisant la même procédure, dont **Boudellaa et Djadwal, 2022** ont trouvés que l'extrait hexanique des feuilles d'*Erysimum gramineum* pomel avait la meilleur capacité antioxydante avec une valeur de VEEAC de 18,08 mg/g ES.

III.4.2. Test du pouvoir antimicrobien

Dans notre étude, les extraits obtenus par des solvants de polarité croissante à partir de la partie aérienne des deux espèces étudiées, ont été testé contre des souches microbiennes. L'efficacité des extraits a été évaluée par la méthode de diffusion des disques sur milieu solide. Par la suite, la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été estimée, par la méthode de dilution sur milieu liquide.

➤ Control négatif

Si les extraits doivent être soumis à des essais biologiques, la toxicité du solvant doit également être évaluée car, même à l'état de traces, le solvant ne doit pas interférer avec le processus biologique. Il convient également de prêter attention aux interactions potentielles entre le solvant et les corps dissous pendant que le solvant peut interagir avec certains composés pour générer des complexes ou provoquer une décomposition, déshydratation, ou isomérisation de ces composés (Yrjöen, 2004). Les résultats de la figure 21, montrent que le DMSO est un solvant qui n'a aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes.

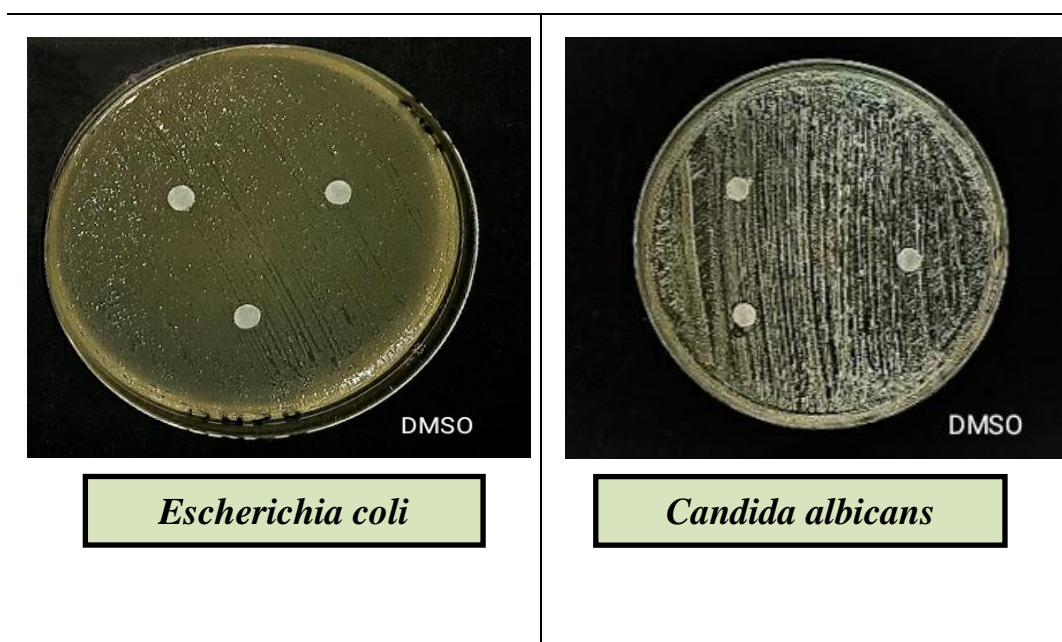


Figure 21: Effet de DMSO sur quelques souches étudiées.

➤ **Antibiogramme (contrôle positif)**

Les souches microbiennes ont montré des sensibilités différentes aux antibiotiques ou antifongiques standard testés (tableau 11) et (Figure 22), ce qui nous a permis de mettre en évidence différents niveaux d'activité de ces composés sur les souches bactérienne et les levures.

Tableau 11: Diamètre de zone d'inhibition en mm en présence de quelques antibiotiques.

Souches testées	Diamètre de la zone d'inhibition en (mm).				
	Antibiotiques				Antifongique
	GEN	Ak	DXT	SP	Amphotéricine b
<i>Escherichia coli</i>	22	25	-	-	
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	20	30	5	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	33	5	5	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	30	-	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	22	-	
<i>Candida albicans 10</i>					15
<i>Candida albicans 26</i>					20

(-) : Diamètres non déterminées



Klebsiella pneumoniae



Yersinia enterocolitica

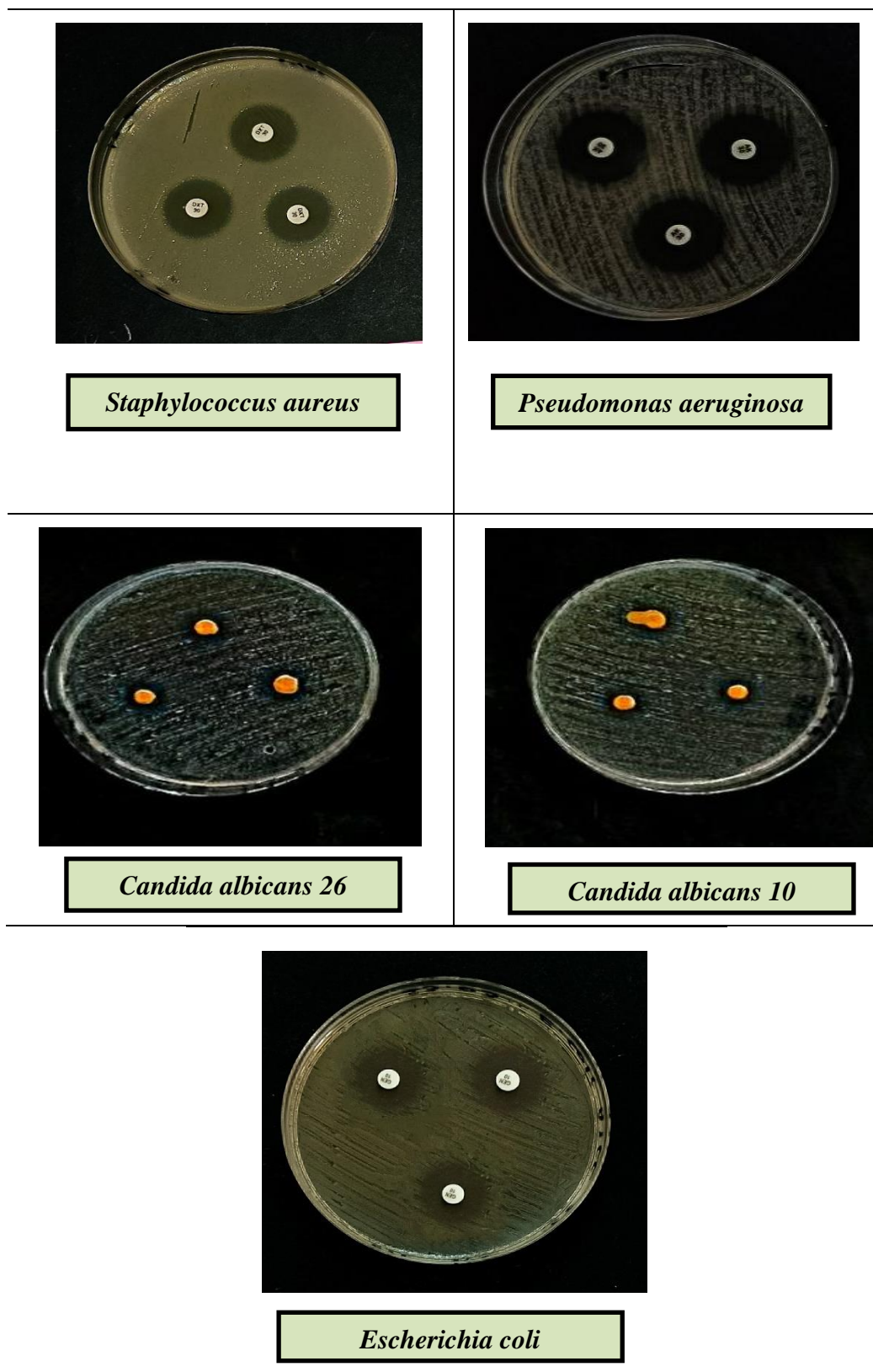


Figure 22: Effet des antibiotiques sur quelques souches étudiées

III.4.2.1. Résultats de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur gel

La méthode des disques a permis de déterminer l'action des extraits des plantes dissout dans le DMSO sur les différentes souches, celle-ci se traduit par l'apparition ou non d'une zone d'inhibition autour du disque de papier préalablement imprégné de l'extrait avec les concentrations C_0 et les deux dilutions (1/2 et 1/5).

L'activité antimicrobienne a été estimée selon trois niveaux :

- Fort ($D > 13$ mm), la souche est sensible ;
- Moyenne ($5\text{mm} < D < 13\text{mm}$), la souche est intermédiaire ;
- Faible ($D < 5\text{mm}$), la souche est résistante (**Billerbeck, 2007**).

Les résultats des zones d'inhibitions sont exprimés en mm comme indiqué dans les tableaux et les figures ci-dessous.

Tableau 12: Diamètre des zones d'inhibitions des extraits de *Thymelaea virgata* vis-à-vis des souches étudiées.

	Extraits	Diamètres de la zone d'inhibition en (mm)								
		Hexane			Acétate d'éthyle			Méthanol		
	Souches	C ₀	C _{1/2}	C _{1/5}	C ₀	C _{1/2}	C _{1/5}	C ₀	C _{1/2}	C _{1/5}
Bactéries	<i>Escherichia coli</i>	15±00	11,6±0,57	10,3±0,57	14,6±4,04	5,6±0,57	5±00	13±2,64	8±10	7±10
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,6±1,15	6±00	5±00	7±10	7±00	7±1,73	8,3±0,58	8±00	7±20
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	13,3±1,53	12±2,89	10,3±0,58	11±1,73	11±1	10,6±0,58	11,3±1,15	10,6±1,15	10,3±0,58
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13±1,73	11,3±0,57	8,6±2,15	8±20	7±1,73	6±00	9,6±0,58	7,3±0,58	5,6±0,58
	<i>Staphylococcus aureus</i>	9,3±0,58	7,3±1,15	6,6±0,58	8±20	5,3±0,58	5±00	7±00	6±00	5±00
Levures	<i>Candida albicans</i> 10	11,3±0,57	11±1,52	11±1,73	11±1,52	10,3±1,15	9±1,52	11,6±1,52	11,6±1,54	11±00
	<i>Candida albicans</i> 26	12,6±2,08	12±1,73	10±00	11±10	10,3±0,57	10,3±0,57	11±1,7	9,6±0,57	6±00

Tableau 13: Diamètre des zones d'inhibitions des extraits de *Nolletia chrysocomoide* vis-à-vis des souches étudiées.

	Extraits	Diamètres de la zone d'inhibition en (mm)								
		Hexane			Acétate d'éthyle			Méthanol		
	Souches	C ₀	C _{1/2}	C _{1/5}	C ₀	C _{1/2}	C _{1/5}	C ₀	C _{1/2}	C _{1/5}
Bactéries	<i>Escherichia coli</i>	14,33±2,51	10,6±1,52	10±1,73	16±4,35	14,3±2,51	14±2,64	12,3±1,52	11,3±2,30	6±0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8±1,73	6,3±0,58	6±00	6,3±2,30	5,6±0,58	5,3±0,58	6,6±0,58	6±10	5,3±0,58
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	11±10	9,6±0,57	8±10	12±10	10,3±0,58	9,6±0,57	10,3±0,5	9,6±0,57	8,3±0,57
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13±00	11±10	10±1,73	10,3±0,57	7,6±2,88	8±10	10,6±1,52	9±1,52	9,6±1,52
	<i>Staphylococcus aureus</i>	6,3±0,58	6±00	5±00	7,6±0,58	7±10	6,3±0,58	6,6±1,53	5,6±0,58	5,6±1,15
Levures	<i>Candida albicans</i> 10	13±10	11,3±0,57	11±0,57	12,3±1,52	11±2,64	11±1,15	22,6±3,05	19,3±2,08	15,6±0,57
	<i>Candida albicans</i> 26	14,6±2,30	14±0,57	13,3±2,30	15,6±2,08	14,3±1,52	14±20	26,3±1,62	18±20	16,6±1,52

D'après l'étude du pouvoir antimicrobien des extraits organiques des deux plantes, par la méthode des disques, on trouve que les diamètres des zones d'inhibitions allant de 5 à 26,3 mm pour les souches bactériennes et fongiques, en fonctions des concentrations (C_0 , $C_{1/2}$ et $C_{1/5}$).

Selon les tableaux ci-dessus, nos résultats montrent que la concentration initiale (C_0) est la plus fiable dans tous les extraits. Donc nos comparaisons sont par rapport à cette concentration. Les microorganismes testés n'ont pas exercé la même sensibilité vis-à-vis nos extraits

Les extraits de *T. virgata* et *N. chrysocomoides* ont présenté des diamètres de zones d'inhibitions allant de 5 à 15 m et de 5 à 26,3 mm respectivement. Les diamètres les plus élevés chez *N. chrysocomoides* ont été obtenu pour les deux souches fongiques *Candida albicans 10* de 22,6 mm et *Candida albicans 26* de 26,3mm dans l'extrait méthanolique, alors que *T. virgata* son effet inhibiteur le plus important a été observé avec *Escherichia coli* de 15mm dans l'extrait hexanique.

Nos résultats sont comparables à ceux trouvés par (Kerboub, 2017), ou l'extrait méthanolique de *Thymelaea hirsuta* Endl. enregistre une zone d'inhibition de 11mm vis-à-vis *Candidat albicans 10* et de 15mm vis-à-vis *Escherichia coli*.

Pour tous les extraits, une activité antibactérienne très faible sur les souches *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

El Abed *et al.* (2014) et Naili *et al.* (2010) ont montré un effet antibactérien significatif de l'extrait méthanolique de feuilles d'*Artemesea Campestris* de la famille des Asteraceae contre une large gamme de bactéries telles qu'*Escherichia coli* (17 et 10 mm) et *Staphylococcus aureus* (20 et 27 mm) qui est plus important par rapport à nos extraits. De plus, la fraction d'acétate d'éthyle de la partie aérienne présentait des niveaux significatifs d'inhibition contre *Escherichia coli* (13 mm) et *Staphylococcus aureus* (9 mm).

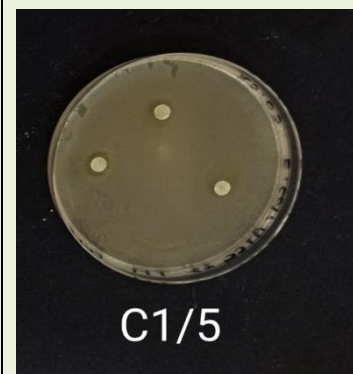
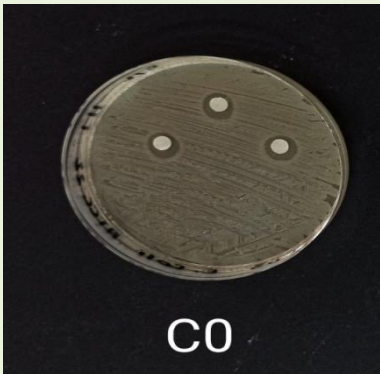
Yersinia enterocolitica et *Klebsiella pneumoniae* se comportent différemment avec des diamètres d'inhibitions de 8 à 13,3 mm.

Les figures ci-dessous montrent l'activité antibactérienne et antifongique des extraits hexanique, d'acétate d'éthyle et méthanolique des deux plantes contre quelques souches étudiées. Les autres activités inhibitrices sont mentionnées dans l'Annexe IV.

Thymelaea virgata

Extrait hexanique

Escherichia coli

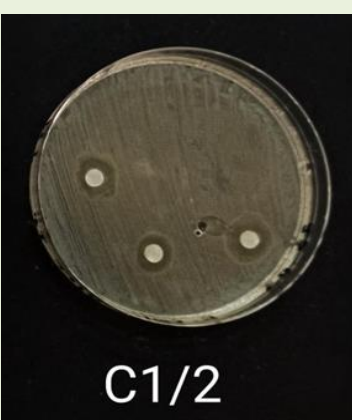


Candida albicans 10



Extrait méthanolique

Escherichia coli



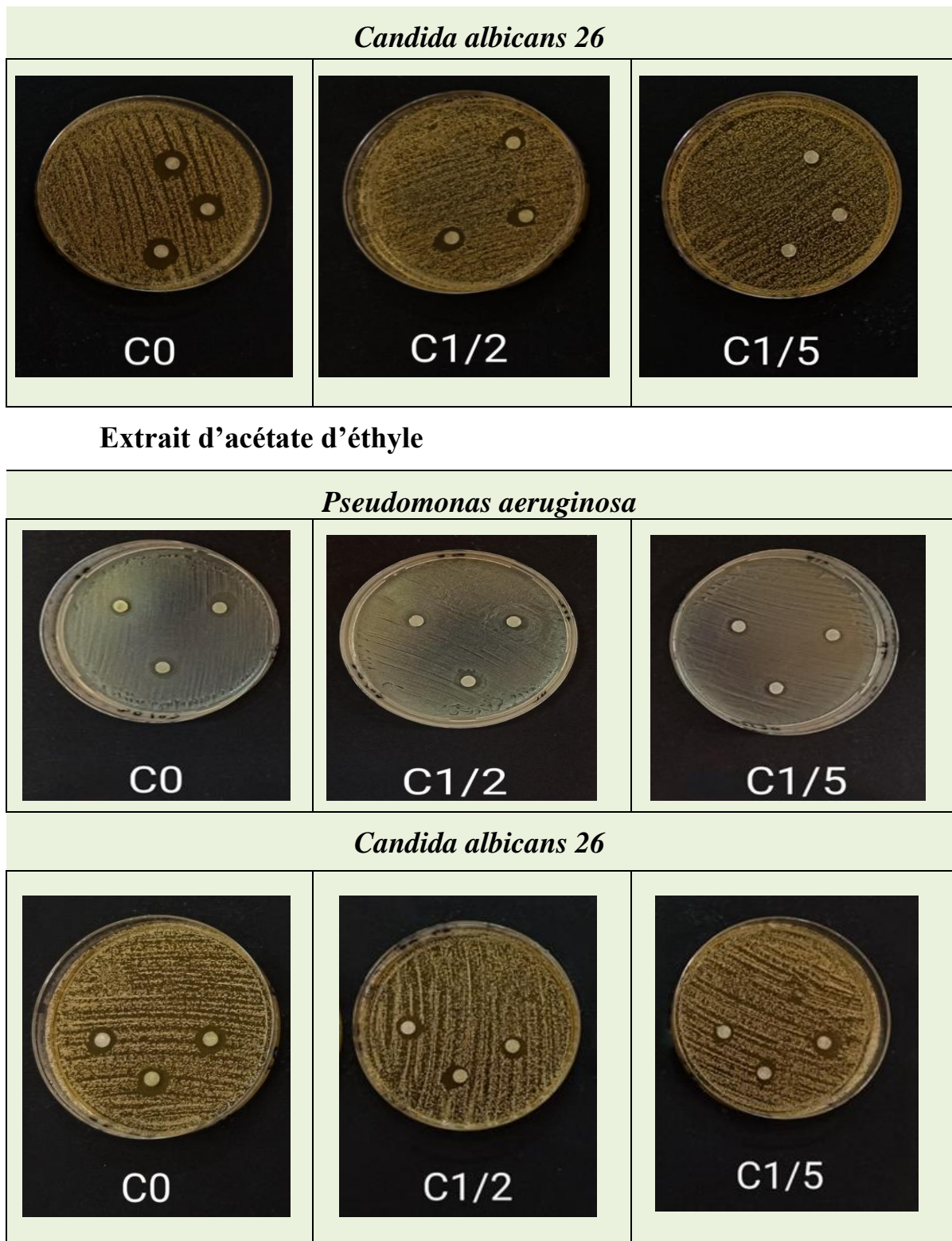


Figure 23: Effet de différents extraits organiques de *T. virgata* sur la croissance des souches microbiennes.

Nolletia chrysocomoides.

Extrait hexanique

Candida albicans 26



Staphylococcus aureus



Extrait d'acétate d'éthyle

Escherichia coli



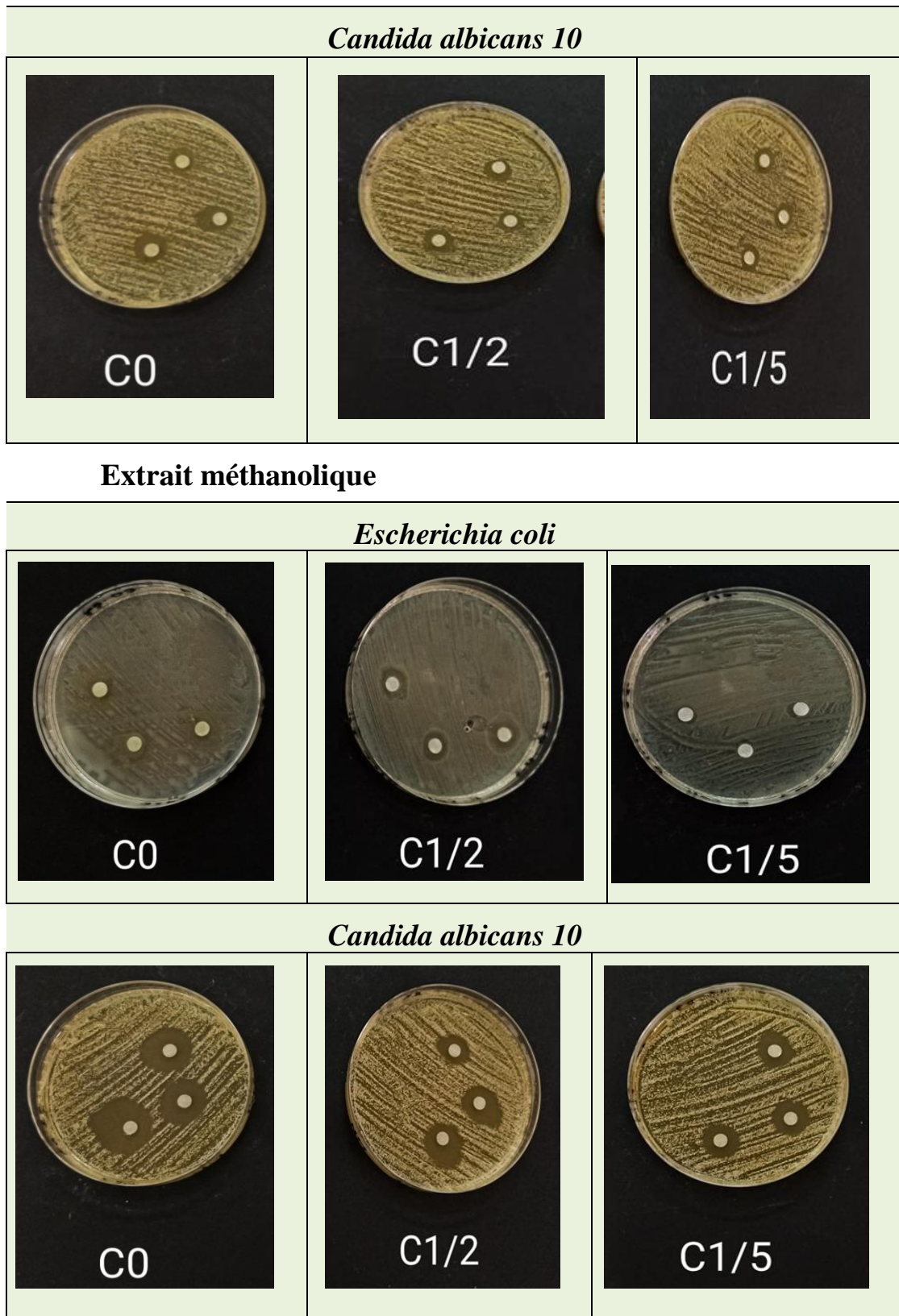


Figure 24: Effet de différents extraits organiques de *N. chrysocomoides* sur la croissance des souches microbiennes.

En effet, en comparant l'activité de *Nolletia chrysocomoides* avec celle de *Thymelaea virgata*, on déduit que les deux espèces ont un effet très faible sur *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, ces deux souches sont multirésistantes aux antibiotiques et responsables des infections nosocomiales. Pour les espèces fongiques *Nolletia chrysocomoides* a un effet très important par rapport à *Thymelaea virgata*. Le diamètre d'inhibition se diffère d'une souche à une autre selon la nature et la concentration utilisée de l'extrait.

Dans la littérature, Les bactéries à Gram (-) sont plus résistantes aux bactéries à Gram (+) à cause de ses structures complexes et de leur couche externe qui agit comme une barrière à la pénétration des agents antimicrobiens. Dans notre étude, nos extraits sont efficaces sur les bactéries à Gram (-) à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*, donc ces extraits ont la capacité de dépasser la couche externe de ces bactéries pour inhiber leur croissance (Dehimi, 2011).

La différence dans la sensibilité des souches aux extraits peut être expliquée par les composants extractible par les différents solvants. La majorité des composés végétaux ayant une activité antimicrobienne sont des polyphénols, mais l'activité de ces composés pourrait être aussi liée au degré d'oxydation, en effet les polyphénols sont des composés très susceptibles d'auto oxydation en présence de l'oxygène de l'air. Cette oxydation se traduit par polymérisation des monomères comme les monomères de flavonoïdes pour donner des polymères de poids moléculaires élevés. Cependant, le poids moléculaire des polyphénols est un facteur important dans l'activité antimicrobienne, les molécules à faibles poids moléculaires sont capables de traverser la paroi ou la membrane contrairement aux molécules avec un poids moléculaire élevés (Karou *et al.*, 2005).

III.4.2.2. Les résultats de la détermination de la CMI

Après avoir réalisé l'activité antimicrobienne de nos extraits par la méthode de diffusion sur gélose, nous avons essayé de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode de micro dilution en milieu liquide.

Ainsi, après la mise en évidence de la CMI, nous avons procédé à la détermination de la CMB (concentration minimale bactéricide) et la CMF (concentration minimale fongicide).

Les résultats des extraits de plantes sur les souches étudiées ont été alors déterminés et regroupées dans les deux tableaux 14 et 15.

Les figures 25 et 26 illustrent les effets antimicrobiens de nos extraits sur les souches étudiées.

Tableau 14: Les concentrations minimales inhibitrices et fongicides des extraits organiques en (mg/ml), de *Nolletia chrysocomoides*.

	Extraits	Hexane		Acétate d'éthyle		Méthanol	
	Souches	CMI (mg/ml)	CMF (mg/ml)	CMI (mg/ml)	CMF (mg/ml)	CMI (mg/ml)	CMF (mg/ml)
Bactéries	<i>Escherichia coli</i>	3,125		1,562		1,562	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,125		3,125		3,125	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	3,125		3,125		3,125	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	1,562		3,125		3,125	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,125		1,562		3,125	
Levures	<i>Candida albicans 10</i>	0,781	1,562	0,390	3,125	0,781	3,125
	<i>Candida albicans 26</i>	0,195	1,562	0,195	3,125	0,195	3,125

Tableau 15 : Les concentrations minimales inhibitrices et fongicides des extraits organiques de *Thymelaea virgata* en (mg/ml).

	Extraits	Hexane	Acétate d'éthyle	Méthanol
	Souches	CMI (mg/ml)	CMI (mg/ml)	CMI (mg/ml)
Bactéries	<i>Escherichia coli</i>	1,562	1,562	1,562
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,125	3,125	3,125
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,562	1,562	3,125
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	3,125	1,562	1,562
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,125	3,125	3,125
Levures	<i>Candida albicans 10</i>	0,781	0,195	0,195
	<i>Candida albicans 26</i>	0,195	0,195	0,195

Selon les tableaux 14 et 15, nous observons que les valeurs de CMI varient d'une souche à une autre et d'un extrait à un autre. Les CMI de *T. virgata* et *N. chrysocomoides* sont compris entre 0,195 et 3,125 mg/ml. Il existe une relation inverse entre CMI et pouvoir antimicrobien des substances dont les plus faibles CMI atteste de la richesse de ces échantillons en principes actifs antimicrobiens vis-à-vis les souches pathogènes cibles.

L'inhibition importante constatée chez les extraits des deux espèces est contre *Candida albicans 26* avec une CMI de 0,195 mg/ml. Par rapport aux extraits de *Thymelaea virgata*, les extraits de *Nolletia chrysocomoides* ont la meilleure activité antifongique avec des CMF allant de 1,562 à 3,125mg/ml.

L'effet antibactérien a été jugé bactéricide ou bactériostatique en fonction du rapport : CMB/CMI. En effet, si CMB/CMI = 1 à 2, l'effet est bactéricide et si CMB/CMI = 4 à 16, l'effet est bactériostatique (EL Amri *et al.*, 2014). Dans notre cas aucune CMB n'a été observée, mais elle a été estimée lorsqu'elle est supérieure à la CMI des différents extraits.

Candida albicans 26 a un rapport de CMF/CMI= 16,03 (Méthanol et acétate d'éthyle) et CMF/CMI=8,01 (hexane). Pour *Candidat albicans 10* CMF/CMI=4 dans les extraits hexanique et méthanolique et pour l'extrait acétate d'éthyle CMF/CMI=8.

En conséquence, les extraits de cette plante peuvent être classés comme un agent antifongique puissant pour lutter contre certaines maladies, car le rapport CMF / CMI varie entre 4 et 16. La sensibilité de ces germes à nos extraits pourrait être une étape importante vers la découverte d'un remède ou d'une méthode naturelle de lutte contre ces levures pathogènes.

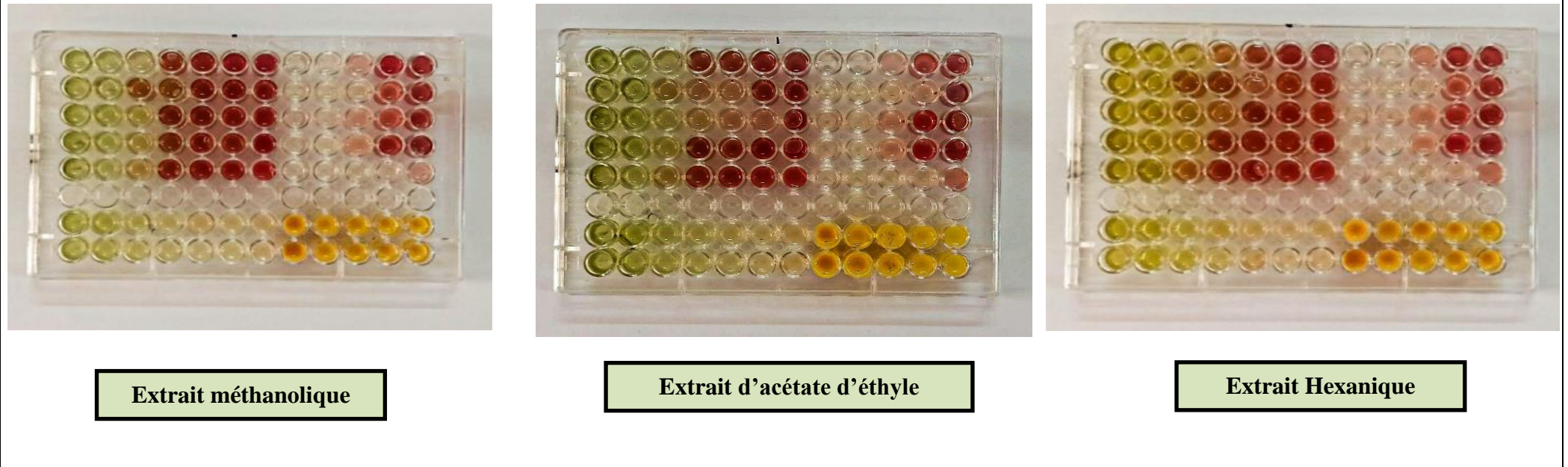
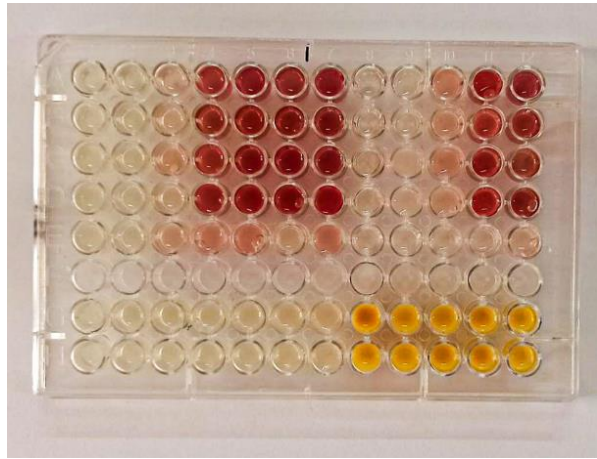
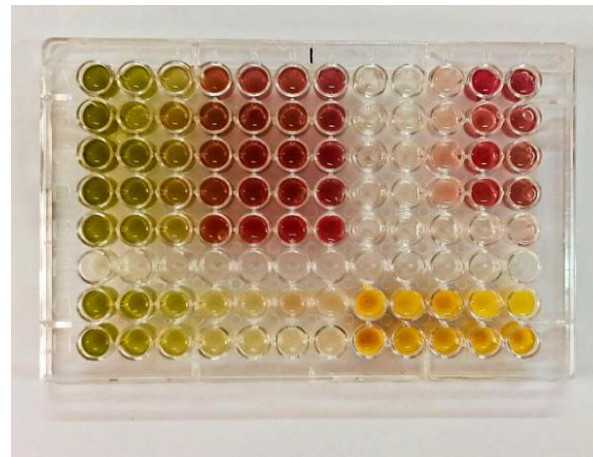
Thymelaea virgata (Desf.)

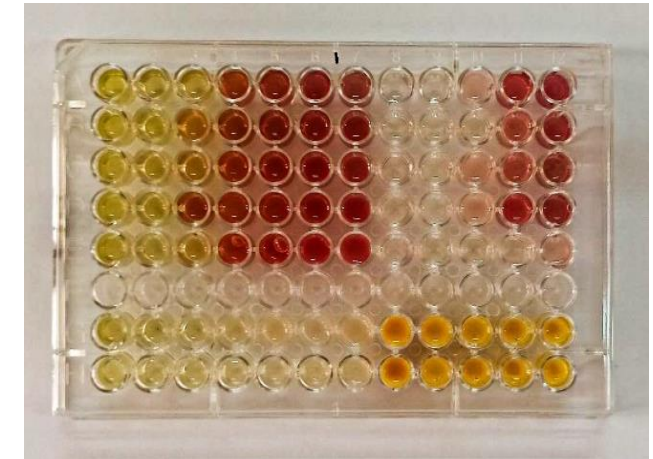
Figure 25: Détermination de la Concentration minimal inhibitrice des extraits organiques de *Thymelaea virgata* vis-à-vis des souches pathogènes par la méthode de micro-dilution.

Nolletia chrysocomoides (Desf.)

Extrait Hexanique



Extrait d'acétate d'éthyle



Extrait méthanolique

Figure 26: Détermination de la Concentration minimale inhibitrice des extraits organiques de *Nolletia chrysocomoides* vis-à-vis des souches pathogènes par la méthode de micro-dilution.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales restent toujours une source inépuisable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Notre travail est une contribution à l'étude des activités antioxydante et antimicrobienne des deux espèces *Thymelaea virgata* (Desf.) et *Nolletia chrysocomoides* (Desf.).

L'extraction de la partie aérienne des deux plantes a permis d'obtenir des rendements qui diffèrent en fonction des solvants utilisés. Les résultats obtenus ont montré que la rentabilité de l'extrait d'acétate d'éthyle de *T. virgata* est de (3,72%) et celle de l'extrait méthanolique de *N. chrysocomoides* est de (1,91%).

Quantitativement, l'évaluation du contenu des polyphénols totaux en adoptant la méthode de Singleton et Ross révèle la présence des quantités importante dans les extraits méthanoliques en polyphénols des deux plantes étudiées. De même nous avons dosé la teneur en tocophérols, ce qui nous mène à conclure que *T. virgata* contient une quantité considérable en tocophérols que *N. chrysocomoides*.

L'évaluation des propriétés antioxydantes des différents extraits a été déterminé par la méthode de DPPH, les résultats montrent que les extraits méthanoliques possèdent une bonne activité, cela pourrait être expliquer *in vitro* par la richesse de ces plantes en composés phénoliques, donc ces plantes contiennent des molécules qui sont considérées comme des agents antioxydants peuvent être utilisées pour des applications thérapeutiques.

Au cours de cette étude nous avons réalisé également l'effet antimicrobien de nos plantes vis-à-vis cinq bactéries (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*) et deux levure (*Candida albicans* 10, *Candida albicans*26). Par l'utilisation de deux méthodes différentes. La méthode de diffusion sur milieu gélosé a révélé une action inhibitrice contre la plupart des germes et l'activité la plus importante a été enregistrée sur les deux souches de *Candida albicans* par l'extrait méthanolique de *N. chrysocomoides*.

Les résultats de l'activité antimicrobienne par les tests de micro dilution sur milieu liquide, indiquent que dans la majorité des cas, nos extraits ont une action inhibitrice vis-à-vis des germes étudiés à des concentrations enregistrées entre 0,195 à 3,125 mg/ml.

Dans la perspective de ce travail, il serait intéressant :

- D'approfondie l'analyse de la composition chimique des différents extraits obtenus, afin d'identifier les espèces chimiques responsables de leurs activités biologiques ;
- Développer des médicaments antiradicalaires à base de plantes doués d'une activité antioxydante ;
- D'élargir l'éventail des espèces microbiennes testées (bactéries, levures et moisissures, hospitalières et de référence) ; pour voir d'éventuel effet synergique ;
- Isoler les molécules contenues dans les extraits des deux plantes responsables de l'activité antimicrobienne puis le tester *in vivo* sur différents modèles biologiques afin de trouver une application thérapeutique ou agroalimentaire ;
- Enfin d'autres activités biologiques peuvent également être évaluées aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (l'activité anti-inflammatoire, antidiabétique, antitumorale, cytotoxicité...)

*Références
bibliographiques*

Références

A

Amri, O., Elguiche, R., Tahrouch, S., Zekhnini, A., & Hatimi, A. (2015). Antifungal and antioxidant activities of some aromatic and medicinal plants from the southwest of Morocco. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(7), 672-678.

Arnaud. (s.d.). *Laboratoire DUMANI*. Consulté le Mai 6, 2022, sur <https://laboratoireidumani.fr/huiles-essentielles-antioxydantes/>

Astrid, N. (2016). Les propriétés antioxydantes du café. *CAIRN.INFO matières à réflexion*, 6(2).

B

Bakali, A. (2018, 09 18). *Plant Biodiversity of South-Western Morocco*. Consulté le Mai 10, 2022, sur <https://www.teline.fr/en/photos/thymelaeaceae/thymelaea-virgata-subsp.-broussonetii#photo-3>

Balasundram, N., Sandram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic Compounds in Plants and Agricultural By-Products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses. *Food Chemistry*, 99 .

Belkhir, F. (2009). activités antimicrobienne et antioxydante des extraits du umuscommunisL. *Mémoire pour obtention du grade du magister en microbiologie*.

Ben abdalla, R., Frikha, D., Maalej, S., & Sassi, S. (Février 2019). Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne et antifongique de quatre espèces algales marines. *Université de sfax-Tunisie*, 31, 39.

Benseguni, A. (2007). Etude théorique des métabolites secondaires des végétaux et des composés de synthèse sur le plan de l'activité biologique : simulation pardocking (arrimage) moléculaire sur la lipoxigénase et la cyclooxygénase. *Thèse de doctorat* . Constantine , Université d Mentouri .

Billerbeck, V. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Pharmacognosie phytothérapie.*, 5, 249-253.

Blama Aicha, M. F. (16 Novembre, 2013). Etude ethnobotanique des plantes médicinales et aromatiques dans le sud algérien : le Touat et le Tidikelt. *Le 5ème Symposium International des Plantes Aromatiques et Médicinales* (p. 19). Marrakech (Maroc): Unité mixte de recherche MOISA.

Blaylock, B., KE Riordan, DM Missiakas, & Schneewind, O. (2006). Caractérisation de la Yersinia enterocolitica Sécrétion de type III ATPase YscN et son régulateur, YscL. *Journal of Bacteriology*, 188(10).

- Boudelaa, R., & Djadwal, M.** (2022). Contribution à l'étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne des deux fractions feuilles, fruits et fleurs d'Erysimum gramineum pomel. *Mémoire de master*. Biologie, Université Amar teliji-Laghouat.
- Bousseboua, H.** (2002). Eléments de microbiologie générale. 160-167. universitaire Ali Mendjel-Constantine, Biotechnologie.
- Briemann, H., Setzer, W., Kaufman, P., Kirakosyan, A., & CsekeLJ, P.** (2006). The chemical components of plants. *Plants*, 1-50.

C

- Candan, D., & Aksöz, N.** (2015). Klebsiella pneumoniae: caractéristiques de la résistance aux carbapénèmes et facteurs de virulence. *Acta Biochimica Polonica*.
- Causse, C.** (2005). *Le secrets de santé des antioxydants*. France: ALPEN.
- Cavalier, C., Dupriez, C., Huret, J., Ar Lauriane, L., Nebon, D., Mence, L., . . . Morin, C.** (2014). La phytothérapie ou (l'art de soigner par les plantes).
- Chen, C., Weng, M., Wu, C., & Lin, J.** (2004). Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells. *Food chemistry*, 1(2), 175/185.
- Crozier, A., Clifford, M., & Ashihara, H.** (2008). *Plant secondary metabolites : occurrence, structure and role in the human diet*. John Wiley & Sons.

D

- Dehimi, K.** (2011). Etude de quelques propriétés des extraits de Thymelaea microphylla Coss. et Dur. *Mémoire de magister*. Biotechnologie, Biskra: Université Mohamed Khider.
- Djermane, N.** (2014). Extraction des métabolites secondaires de plantes médicinales: Pulicaria arabica (L.) Cass. et Rhanterium adpressum Coss. & Durieu. Et évaluation de leurs propriétés bioactives. DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE.

E

- El Abed, N., Guesmi, F., Mejri, M., Marzouki, M., & Ben Hadj Ahmed, S.** (2014). Phytochemical screening and assessment of antioxidant, antibacterial and cytotoxicity activities of five Tunisian medicinal plants. *Int J Pharm Res Biosci*, 3, 770-789.
- El amri, J., Elbadaoui, K., Zair, T., bouharb, H., chakir, S., & Alaoui, T.** (2014). Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de Teucrium capitatum L et l'extrait de Silène vulgaris sur différentes souches testées. *Journal of Applied Biosciences*, 82, 7481–7492.

Eloff, J. N. (1998). A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. *Planta Medica*, 64.

F

Filleul, E. (2018, Novembre 1). Les Astéracées : description botanique, biologique et étude de plantes médicinales et toxiques. *Thèse de doctorat*. Faculté de Pharmacie, Université de Limoges.

H

Haji, H., Tallal, L., Maafa, L., Bentata, F., El alaoui, F., Abdennebi, E., & El aissami, A. (2016). Evaluation in vitro de l'activité antifongique de quatre plantes médicinales marocaines sur cinq champignons phytopathogènes. *Revue marocaine de protection des plantes*, 10, 58.

Hallimi. (2004). les plantes médicinales en Algérie. 42. Algérie: Berti.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. (1999). *Radicaux libre en biologie et médecine*. (éd. 3^{ème}). Oxford: Oxford university press.

Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals : Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68, 2831-2846.

I

Iserin, P. (2001). *Encyclopedie des Plantes Médicinales (identification, preparation, soin) 2nd Edition*. Londres: Larousse.

J

Jean-Yves, C. (2010). Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Science pharmaceutique, Université de LORRAINE.

Judd, W., Campbell, C., Kellog, E., Stevens, P., & Donghue, M. (2002). *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. Sunderland Massachusetts: Sinauer Associates.

K

Karou, D., Dicko, M., Simporé, J., Yameogo, S., Sanon, S., & Traoré, A. (2005). Activités antioxydantes et antimicrobiennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. CRSBAN, Université Ouagadougou.

Kerbab, K. (2017). Validation scientifique de l'utilisation traditionnelle des plantes médicinales algérienne, *Halimium halimifolium* (L.) Wilk et *Thymelaea microphylla* Coss et Dur., composition chimique et activité biologique. *Thèse de doctorat*. Département de chimie, Constantine : Université des frères Mentouri.

- Kerboub, H.** (2017). Valorisation de certaines plantessauvages : *Thymelaea hirsta* Endl. (Metnane) et *Haloxylon scoparium* Pomel. Bioactivité et caractérisation des composés phénoliques. *Mémoire de magister*. Bilogie, Mascara: Université Mustapa Stambouli .
- Koskinen , A.** (1993). *Asymmetric syntesis of natural products* (Vol. 106). England: John Wiley & Sons.
- Krief , S.** (2003). MÉTABOLITES SECONDAIRES DES PLANTES ET COMPORTEMENT ANIMAL : SURVEILLANCE SANITAIRE ET OBSERVATIONS DE L'ALIMENTATION DE CHIMPANZÉS (*Pan troglodytes schweinfurthii*) EN OUGANDA ACTIVITÉS BIOLOGIQUES ET ÉTUDE CHIMIQUE DE PLANTES CONSOMMÉES. Museum national, Écologie et chimie des substances naturelles .
- Krishnaiah , D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R.** (2010). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species . *Food and Bio products Processing* , 17.

L

- Léophonte, P., Guérin, C., Lebas, F., Liar, F., & Boulanger, P.** (2006, May). Stress oxydatif et BPCO. Rôle des infections. Prévention . *ELSEVIER* , 36(5), 245-252.

M

- Macheix , Anine Fleuriet, & Christian Jay-allemant .** (2005). *Les composés phénoliques des végétaux* . Presses polytechniques et universitaires romandes .
- Martini , M.** (2011). *Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie*. (éd. 3). France: Clude Bernard : Lavoisier.
- Marvin, E.** (2009, Janvier). Anti-oxydants, controverses et perspectives : comment expliquer l'échec des études cliniques utilisant des anti-oxydants. *Journal de la Société de Biologie*, 46(1).
- MECHRAOUI , I., & GUELLOUZA, R.** (2020). Influence de la date de récolte sur la composition chimique et l'activité antiradicalaire des extraitslipidiques et phénoliques des olives (Laghouat). *Mémoir de master*. Sciences de la Matière: UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT.
- Medjekal, S., Saker, I., Ghadbane, M., Benderradji, L., & Bousseboua, H.** (2016, Décembre). Etude phytochimique et activités biologiques d'une plante médicinale de la région de m'sila *Mentha pulegium* L. *Revue des Régions Arides*(43). Tunisie.
- Mergham, R.** (2009). *Eléments de biochimie vegetale* . Algérie : Bahaeddine Editions .
- Morikawa , K., Takemura , A., Inose, Y., Tsai, M., Nguyen Thi, L., Ohta, T., & Msadek , T.** (2012). L'expression d'un gène cryptique du facteur Sigma secondaire dévoile une compétence naturelle pour la transformation de l'ADN chez *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog*, 8(11).

N

- Naczik, M., & Shahidi, F.** (2006). Phenolics in Cereals, Fruits and Vegetables: Occurrence, Extraction and Analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523-1542.
- Naili, M., Alghazeer, O., Saleh, N., & Al-Najjar, A.** (2010). Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Arab.J.Chem.*, 3, 79-84.

O

- Obame, L., & Engonga, C.** (2009, 02 26). Etude phytochimique, Activité Antumicrobiennes et antioxydantes de quelques Plantes Aromatiques et Médicinales Africaines. *Thèse de Doctorat*. Université de Ouagadougou, Biologie.
- Ossa, A., Echeverri, M., Santos, Z., Garcia, M., Agudelo, Y., Ramirez, F., & Ospino, S.** (2014). Facteurs de risque d'infection par *Pseudomonas aeruginosa* multi-résistante dans un hôpital très complexe. *Journal chilien d'infectologie*, 31(4).
- Ozenda, P.** (2004). *Flore et végétation du Sahara* (éd. 3e). CNRS Editions.

P

- PELTIER, J.** (s.d.). *Flor du Maroc*. Consulté le Mai 10, 2022, sur <https://www.floramarocana.fr/nolletia-chrysocomoides.html?fbclid=IwAR2Xskaf9s-6UR1KYY7U4M3g2h6uCuTG3AfwEv4pinmwsilZQNDuFIrml24>
- Perry, J., Staley, J., & Lory, S.** (2002). Microbiologie. Cours et questions de révision. . *Dunod*, 159-160.
- Pichard, A., Harari, A., & Bernier, J.-C.** (2017). LA CHIMIE DES PLANTES, AVENIR DE LA COSMÉTIQUE. *Mediachimie*, 2 .
- Poisson, C.** (2013). Role du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique. *Thèse de doctorat*. Université Paris Sud.

Q

- Quézel, P., & Santa, S.** (1963). *Nouvele flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales* (Vol. 2). Paris: CNRS.

R

- Ranjha, M., Irfan, S., Lorenzo, J., Shafique, B., Kanwal, R., Pateiro, M., . . . Aadil, R.** (2021). Sonication, a Potential Technique for Extraction of Phytoconstituents: A Systematic Review. *MPDI*, 9(1406).

Regnault-roger, C., Vincent, C., & Thor Arnason, J. (2012). Essential oils in insect control: low-risk products in a highstakes world. *ANNUAL REVIEW OF ENTOMOLOGY*, 57, 405-424

S

Smallfield , Y. (2001). Introductionto growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Research*, 45, 4.

Souchard, J., Arnal, J., & Rochette, L. (2002). *Les radicaux Libres et le Stress Oxydatif Radicalaire. Techniques permettant la mise en évidence d'un stress oxydatif en biologie* In "Biologie et Pathologie du Coeur et des Vaisseaux". Flammarion.

Stagos, D., Portesis, N., Spanou, C., Mossialos, D., Aligiannis, N., & Chaita, E. (2012). Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 4115-4124.

Steven, P., Rachel , C., Martha , E., Paul , H., Jane , S., & Peter , W. (2004). *Microbiology of Waterborne Diseases*. Elsevier Academic Press .

T

Teisseiri , P. (1991). *Chimie de substance odorantes*. Paris: Tec & Doc.

V

Van der Graaf, C., Netea, M., Verschueren, I., van der Meer, J., & Kullberg, B. (2005). Production différentielle de cytokines et voies de signalisation des récepteurs de type Toll par la blastoconidie et les hyphes de *Candida albicans*. *Infection et immunité*, 73(11).

Vernon, H., Heywood, R., Brumitt, A., & Sebreg, O. (2007). *Flowering Plant Families of the world*. Ontario, Canada: Firefly Books.

Y

Yrjöen, T. (2004). Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural Products. 76. Faculty of Pharmacy, the University of Helsinki.

Z

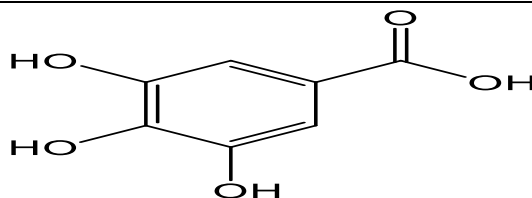
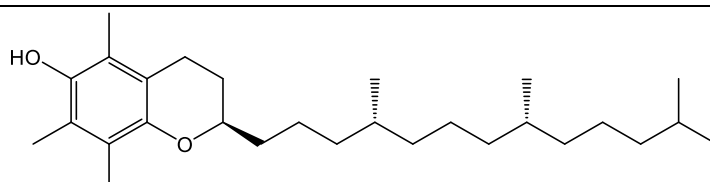
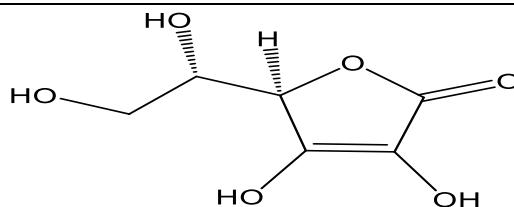
Zbadi, R., Mohti, H., & Moussaoui, F. (2018). Stress oxydatif : évaluation du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales. *Médecine translationnelle*, 24(2), 135.

Zeghmar , S., & Ghoul, K. (2019). Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne des extraits des plantes *Mentha pulegium* L et *Thymelaea hirsuta* Endel. *Master en chimie*. chimie pharmaceutique, Université Larbi Ben M'Hidi Oum El-Bouaghi.

Annexes

Annexe I

Les réactifs et les produits chimiques utilisés
Hexane
Acétate d'éthyle
Méthanol
Ethanol
Folin-Ciocalteu
Phénantroline
Tocophérol
Acide ascorbique
DMSO
INT

Annexe II**Formules des composés standards****Acide gallique****Tocophérol (Vitamine E)****Acide ascorbique (Vitamine C)**

Annexe III

Préparation des milieux de culture (MH/Sabouraud) solide et liquide.

1. Milieu Muller Hinton gélose

65g de la poudre du milieu de culture a été dissout dans 1L d'eau distillé. Chauffer en agitant jusqu'à dissolution complète. Le milieu ainsi préparé est stérilisé à l'autoclave à la température 120°C pendant 20min.

2. Milieu Sabouraud gélose

38g de la poudre du milieu de culture a été dissout dans 1L d'eau distillé. Chauffer en agitant jusqu'à dissolution complète. Le milieu ainsi préparé est stérilisé à l'autoclave à la température 120°C pendant 20min.

3. Milieu Muller Hinton bouillon

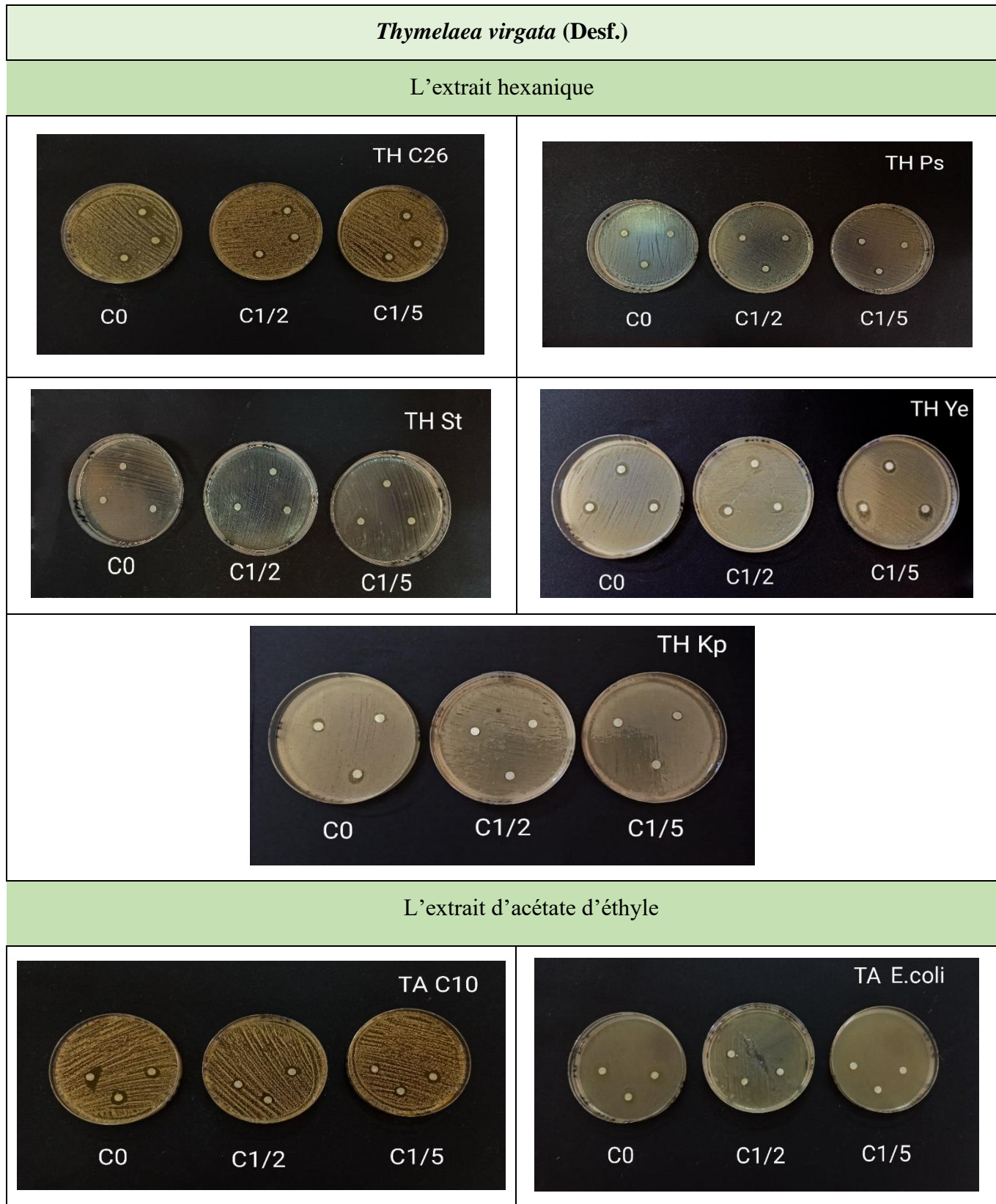
65g de la poudre du milieu de culture a été dissout dans 1L d'eau distillé. Chauffer en agitant jusqu'à dissolution complète. Le milieu ainsi préparé est stérilisé à l'autoclave à la température 120°C pendant 20min.

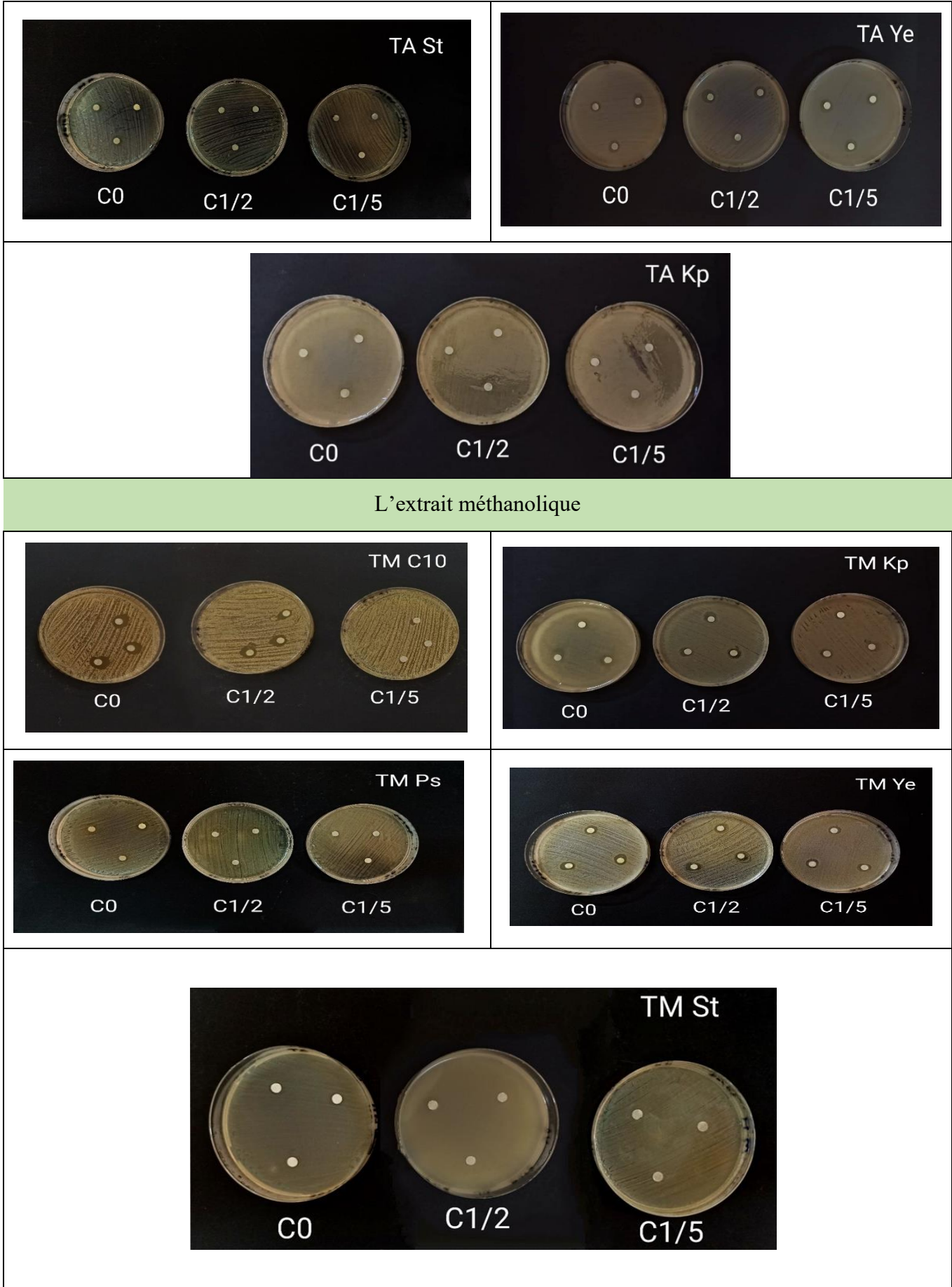
4. Milieu Sabouraud bouillon

65g de la poudre du milieu de culture a été dissout dans 1L d'eau distillé. Chauffer en agitant jusqu'à dissolution complète. Le milieu ainsi préparé est stérilisé à l'autoclave à la température 120°C pendant 20min.

Annexe IV

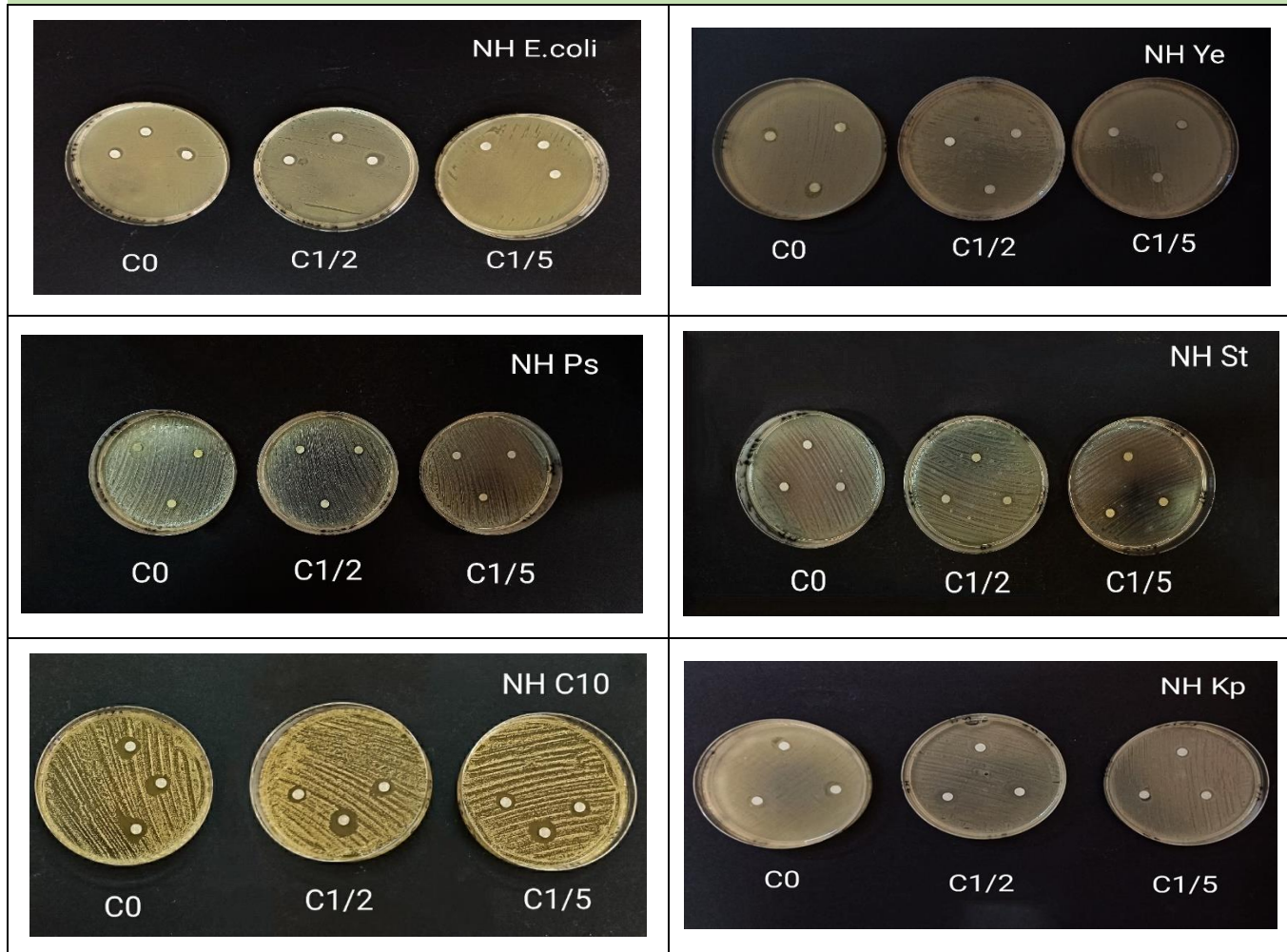
Effet de différents extraits des plantes étudiées vis à vis de la croissance des souches microbiennes





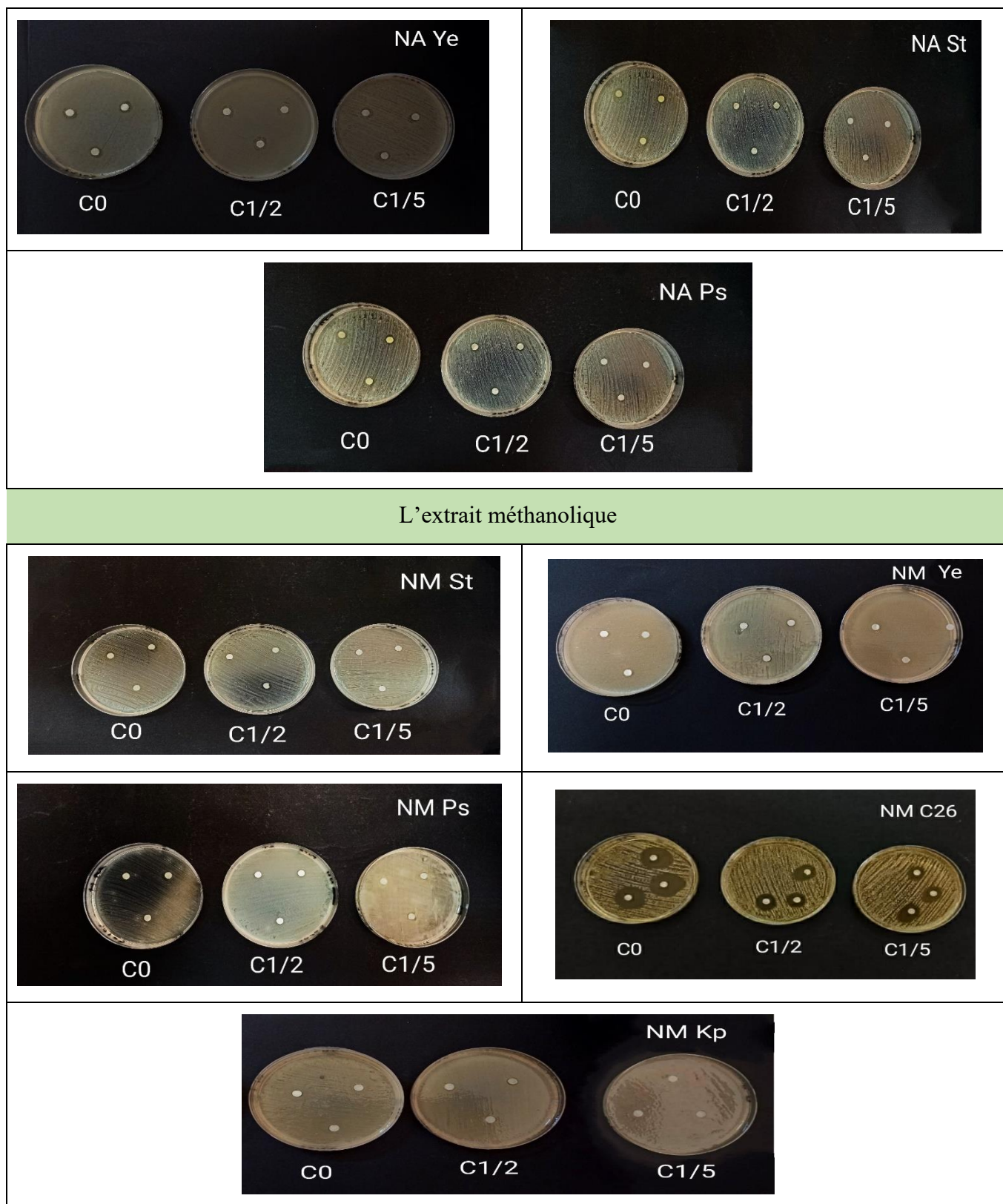
Nolletia chrysocomoides (Desf.)

L'extrait hexanique



L'extrait d'acétate d'éthyle





1

¹ E. coli : *Escherichia coli*, St : *Staphylococcus aureus*, Ps : *Pseudomonas aeruginosa*, Ye : *Yersinia enterocolitica*, Kp : *Klebsiella pneumoniae*, C10 : *Candida albicans* 10, C26 : *Candida albicans* 26.
 TH : *T. virgata* hexane, TA : *T. virgata* acétate d'éthyle, TH : *T. virgata* méthanol.
 NH : *N. chrysocomoides* hexane, NA : *N. chrysocomoides* Acétate d'éthyle, NM : *N. chrysocomoides* méthanol.