

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة عمار تليجي 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

Thème

Contribution à l'étude de l'effet antimicrobien des extraits méthanolique et acétate d'éthyle d'origine végétale

Présenté par :

- SELLAH Hafida
- ZEKKAD Fadoua

Devant le jury composé de :

M. SIFI Ibrahim	MCA (Université Amar TELIDJI, Laghouat)	Président
Mlle. ZAKHROUF Zohra	MAA (Université Amar TELIDJI, Laghouat)	Examinatrice
Mme. NEBEG Halima	MCB (Université Amar TELIDJI, Laghouat)	Promoteur
Mme. ELHOUITI Fatiha	MCA (Université Amar TELIDJI, Laghouat)	Co-Promoteur

Soutenu publiquement le : 25/06/2024

Résumé

Thymelaea microphylla et *Thymelaea hirsuta* sont des plantes médicinales appartenant à la famille des Thymelaeaceae, elles sont largement répandues en Algérie, dans les zones arides et désertiques. Cette famille compte jusqu'à 1 200 espèces, réparties en 67 genres, dont le genre *Thymelaea* qui comporte une trentaine d'espèces. Dans la présente étude, tous les extraits ont été obtenus à l'aide d'un Soxhlet. L'activité antimicrobienne des extraits d'acétate d'éthyle et de méthanol des parties aériennes de *Thymelaea microphylla* (collectée dans la région de Laghouat) et de *Thymelaea hirsuta* (collectée dans la région de Tiaret) est réalisée par deux méthodes (méthode de diffusion sur disque et méthode de microdillution). Trois souches bactériennes ont été testées pour déterminer les propriétés antibactériennes des extraits (*Y. enterocolitica*, *S. enteritidis* et *K. pneumoniae*) et une souche de levure (*C. albicans* ATCC26790). Selon la méthode de diffusion du disque, les résultats ont montré une variation significative des diamètres de la zone d'inhibition, allant de 6 à 10 mm. Les valeurs de CMI sont comprises entre 4,16 et 8,33 mg/ml pour les souches bactériennes et entre 2,08 et 8,33 mg/ml pour *C. albicans*. Une CMB a été observée pour l'extrait d'acétate d'éthyle de *Thymelaea microphylla* contre *K. pneumoniae*.

Mots clé : *Thymelaea hirsuta*, *Thymelaea microphylla*, composés phénoliques, activité antimicrobienne, CMI.

Abstract

Thymelaea microphylla and *Thymelaea hirsuta* are medicinal plants belongs to the Thymelaeaceae family, they are widely distributed in Algeria, in the arid and desert zones. There are up to 1,200 species in this family, divided into 67 genera, including the Thymelaea genus with around 30 species. In the current study, all the extracts were obtained using Soxhlet. The antimicrobial activity of ethyl acetate and methanol extracts from aerial parts of *Thymelaea microphylla* (collected from region of Laghouat) and *Thymelaea hirsuta* (collected from region of Tiaret) is performed by two methods (Disc diffusion and microdilution method). Three bacterial strains were tested to determine the extracts' antibacterial properties (*Y. enterocolitica*, *S. enteritidis* and *K. pneumoniae*) and a yeast strain (*C. albicans* ATCC26790). Depending on the disc diffusion method, the results showed a significant variation in the inhibition zone diameters, ranging from 6 to 10 mm. While MIC values are ranging from (4.16 to 8.33 mg/ml) for bacterial strains, and from (2.08 to 8.33 mg/ml) for *C. albicans*. An MBC was observed for ethyl acetate extract from *Thymelaea microphylla* against *K. pneumoniae*.

Keywords: *Thymelaea hirsuta*, *Thymelaea microphylla*, phenolic compounds, antimicrobial activity, MIC.

المخلص

الثيملايا ميكروفيلا والثيملايا هيرسوتا نباتان طبيان ينتميان إلى الفصيلة الثيملائية وينتشران في الجزائر في المناطق القاحلة والصحراوية. تضم هذه الفصيلة ما يصل إلى 1200 نوع، مقسمة إلى 67 جنساً، بما في ذلك جنس الثيملايا الذي يضم حوالي ثلاثين نوعاً. في هذه الدراسة، تم الحصول على جميع المستخلصات باستخدام جهاز Soxhlet. تم إجراء اختبار النشاط المضاد للميكروبات لمستخلصات أسيتات الإيثيل والميثانول من الأجزاء الهوائية من الثيملايا الميكروفيلا (التي جُمعت في منطقة الأغواط) والثيملايا هيرسوتا (التي جُمعت في منطقة تيارت) باستخدام طريقتين (طريقة الانتشار القرصي وطريقة التخفيف الدقيق). تم اختبار ثلاث سلالات بكتيرية لتحديد خصائص المستخلصات المضادة للبكتيريا (*Y. enterocolitica*، *S. enteritidis*، و *K. pneumoniae*) وسلالة خميرة واحدة (*C. albicans* ATCC26790). باستخدام طريقة الانتشار القرصي، أظهرت النتائج تبايناً كبيراً في أقطار منطقة التثبيط التي تراوحت بين 6 و10 ملم. وتراوحت قيم التركيز CMI من 4.16 إلى 8.33 ملغم/مل للسلالات البكتيرية ومن 2.08 إلى 8.33 ملغم/مل للسلالة البكتيرية. كما لوحظ وجود تركيز CMB لمستخلصات أسيتات الإيثيل لنبات الثيملايا ميكروفيلا ضد بكتيريا *K. pneumoniae*.

الكلمات المفتاحية: *Thymelaea microphylla*، *Thymelaea hirsuta*، المركبات الفينولية، النشاط المضاد للميكروبات، CMI.



Dédicace

À l'âme de ma très chère mère « **Adjeb khaira** »

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier

Comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force Pour affronter les différents obstacles.

À mon très cher père « **Sellah Mohamed** »

Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager.

Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

À l'âme précieuse de mon frère « **Masoude** », Qui a partagé mon enfance et

A rempli mes journées de joie et de bonheur, Qui était la personne

La plus gentille et la plus compatissante que j'aie jamais connue.

On bonheur et ma second maman et ma chère sœur « **Karima** »

À mes chers frères "Ahmade ", "Houssine ", "Sofiane " et Mon héros " Hayo".

À mes belles sœurs "Hadjira ", " Khadija"

À mes petits enfants" Inass", "Hossam", "Hanin", Mouade", "Illine" et "Masoude".

En leurs souhaitant le bonheur, la santé et toute la réussite dans la vie.

À mon cher binôme " **Zakkad fadoua**" Merci d'avoir été là pour me soutenir à tout moment.

À mes chères amies proches ou loin, à tous les gens que je sais, et que j'aime :

Afofa, Zahera, Brahimi Ahlam, Hudjo,

Adjeb maria, Fatima, kaouthar ,Salsabil et Habiba.

HAIEDA



Dédicace

Je dédie mon travail à la plus chère femme au monde " ma mère" **Benchouia Malika "**

*P*our " l'âme chère à mon cœur mon père "**Zekkad ahmed "**

*M*a sœur "**Zekkad Hanna"**

*P*our mes beaux-parents "**Hechaichi Dalila**" et "**Djabaallah Abedrrahmane**"

Que dieu le garde.

Je dédie mon marie "**Djaballah Belouafi**"

*M*erci pour son soutien

Je dédie a mon frère **Zekkad Said** ,ma sœur **boudjemaa Imane** et ses chères enfants :**Mayar,Razane,Iness**

Sans oublier mon petit frère :**Oussama**

Je dédie se travail à mes chères enfants :

"Rahal Taha", "Djaballah Maram" ,"Rahal Alaa Rahmain"

Djaballah",«Ali Abedrrahmane"et" Rahal Sofia"

FADOUA



Remerciement

Avant tout nous remercions ALLAH, le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Tous d'abord, notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à notre encadrant **Dr. NEBEG Halima** pour avoir encadré et dirigé ce travail, sa patience, ses judicieux conseils et ses précieuses orientations, et elle a été présente à tout moment surtout pendant le travail pratique.

Nos sincères remerciements vont aussi à la Co-encadrant **Dr. El-HOUITI Fatiha** pour sa gentillesse, pour son grand aide durant la réalisation de ce travail, surtout coté matériels et besoins. Elle n'a pas cessé de nous encourager tout au long de cette épreuve.

Elle nous a orientées vers le succès avec ses connaissances. Un grand merci pour le directeur du laboratoire des Sciences Fondamentales le professeur **YOUSFI Mohamed**, de nous accepter dans son laboratoire de recherche durant la réalisation de notre projet de fin d'étude.

Grands et respectueux remerciements vont à tous les enseignants du département

De Biologie de l'université de Laghouat (M. BOUBRIMA Y, M. GUENANE H, M.OUINTEN M, M. SIFI I, Mlle. ZEKHROUF Z, Mme. KRAZA L, Mme. TAKHI D, Mme. BENAROUSS K, M. LINANI A, Mme. BOUSSOUSSA H, M. GOUZI H, M.ZAROUK S, M. BICHEUR M, Mme. TALEB et M. BOUKEROUIS D)

Pour leurs aides et leurs dévouements à leurs missions académiques

Nos sincères remerciements aux ingénieurs de laboratoire, à Mlle. **Zegrir Anfal** et **Aissaoui Abir** pour leurs précieux aide ainsi leurs gentillesse,

Et à toutes personnes qui nous a aidés de proche ou loin lors de la réalisation de cette initiation à la recherche.

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction	1
Partie I : Etude bibliographique	3
I.1 Les plantes médicinales	3
I.1.1. Les métabolites.....	4
I.1.1.1 Les métabolites primaires	4
I.1.1.2. Les métabolites secondaires	4
I.1.1.2.1.Les composées phénoliques.....	5
I.1.1.2.2.Les terpènes.....	6
I.1.1.2.3.Les alcaloïdes.....	7
I.2. Importance des plantes médicinales.....	8
I.3. Activité antimicrobienne des extraits des plantes	9
I.3.1. Activité antimicrobienne des extraits des plantes.....	9
I.3.2. Activité antimicrobienne des polyphénols	9
Partie II : Matériel et Méthodes.....	11
II.1. Matériel biologique	11
II.1.1. Matériel végétal.....	11
II.1.1.1.Famille des Thymelaeaceae	11
A. Morphologie.....	11
B. Propriétés phytochimiques	12
C. Intérêts thérapeutiques.....	12
II.1.1. 2.Le genre Thymelaea	12
II.1.1.3. Description botanique des espèces étudiées.....	13
A. <i>Thymelaea microphylla</i>	13
B. <i>Thymelaea hirsuta</i>	15
II.1.1.4. Systématiques des plantes étudiées	17
II.1.2. Description des souches microbiennes utilisées.....	18
II.2.Méthode experimental.....	23
II.2.3. Étude des activités biologiques	23
II.2.3.1. Étude de l'activité antimicrobienne	23

II.2.3.1.1 Technique de diffusion sur milieu solide (sur disque disposée sur gélose)	26
II.2.3.1.2 Technique de diffusion sur milieu liquide.....	27
Partie III : Résultats et discussion.....	31
III.1. Étude des activités biologiques	31
III.1.1. Test du pouvoir antimicrobien	31
III.1.1. 1. Résultats de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur gélose.....	34
III.4.2.2. Les résultats de la détermination de la CMI	42
Conclusion	48
Références bibliographiques.....	49

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Les espèces végétales employées dans notre étude.....	11
Tableau 2 : Classification systématique de <i>T. microphylla</i> et <i>T. hirsuta</i>	18
Tableau 3 : Liste des microorganismes analysés dans notre étude.	22
Tableau 4 : Propriétés et préparation des milieux de culture.	24
Tableau 5 : Les antibiotiques et les antifongiques utilisés.	25
Tableau 6 : Les dilutions des extraits et leurs positions dans la microplaque.....	28
Tableau 7 : Diamètres moyens en (mm) des zones d'inhibition des cultures microbiennes.	32
Tableau 8 : Diamètres moyens en (mm) des zones d'inhibition des cultures microbiennes incubés avec des extraits de <i>Thymelaea hirsuta</i>	34
Tableau 9 : Diamètres moyens en (mm) des zones d'inhibition des cultures microbiennes incubés avec des extraits de <i>Thymelaea microphylla</i>	36
Tableau 10 : Les concentrations minimales inhibitrices et fongicides des extraits organiques de <i>Thymelaea hirsuta</i> en (mg/ml).	43
Tableau 11 : Les concentrations minimales inhibitrices et fongicides des extraits organiques de <i>Thymelaea Microphylla</i> en (mg/ml).....	43

Liste des Figures

Figure 1 : Les différentes classes des composés phénoliques.	5
Figure 2: Structure chimique des certains Monoterpènes, Sesquiterpènes et Composes aromatique.	7
Figure 3: Répartition géographique du genre <i>Thymelaea</i>	13
Figure 4: Photo illustrant l'espèce <i>Thymelaea microphylla</i>	14
Figure 5 : <i>Thymelaea hirsuta</i> (Linné) Endlicher (Photos originales). A- feuilles cotonneuses. B- fleurs mâles. C- fleurs femelles.....	16
Figure 6 : Image générée par ordinateur 3D de <i>Yersinia enterocolita</i>	19
Figure 7: Image en microscopie électronique (fond noir) d'une <i>Salmonella enteritidis</i> flagellée.	20
Figure 8: Isolat de <i>Klebsiella pneumoniae</i> par Microscope électronique à balayage.	21
Figure 9: Les cellules de <i>Candida albicans</i> par microscope électronique à balayage.	21
Figure 10: Schéma représentative du plan de travail suivi.....	23
Figure 11 : Schéma simplifié du principe de la méthode de diffusion sur milieu solide. ..	26
Figure 12 : Schéma de la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques.	27
Figure 13 : Schéma représentatif d'une microplaque de 96puits.	28
Figure 14 : Schéma représentatif de la série des dilutions.	29
Figure 15: Photo originale et la structure chimique d'INT.	30
Figure 16: Impact de DMSO sur certaines souches analysées.	32
Figure 17: Effet des ATB sur les souches bactériennes étudiées et l'effet de l'ATF sur <i>Candida albicans</i>	33
Figure 18: Les diamètres des zones d'inhibition obtenus suite à l'effet des deux extraits de <i>Thymelaea hirsuta</i> sur les quatre souches microbiennes.....	35
Figure 19 : Les diamètres des zones d'inhibition obtenus suite à l'effet des deux extraits de <i>Thymelaea microphylla</i> sur les quatre souches microbiennes.	36
Figure 20 : Effet d'extrait d'acétate d'éthyle de <i>Thymelaea hirsuta</i> sur la croissance des souches microbiennes.	38

Figure 21 : Effet d'extrait méthanolique de <i>Thymelaea hirsuta</i> sur la croissance des souches microbiennes.	39
Figure 22 : Effet d'extrait d'acétate d'éthyle de <i>Thymelaea microphylla</i> sur la croissance des souches microbiennes.....	40
Figure 23 : Effet d'extrait méthanolique de <i>Thymelaea microphylla</i> sur la croissance des souches microbiennes.	41
Figure 24 : Comparaison des valeurs de CMI entre les extraits d'Acétate d'éthyle et Méthanol de <i>Thymelaea hirsuta</i>	44
Figure 25 : Comparaison des valeurs de CMI entre les extraits d'Acétate d'éthyle et Méthanol de <i>Thymelaea microphylla</i>	44
Figure 26 : Détermination de la Concentration minimale inhibitrice des extraits organiques de <i>Thymelaea hirsuta</i> vis-à-vis des souches pathogènes par la méthode de micro-dilution.	46
Figure 27 : Détermination de la Concentration minimale inhibitrice des extraits organiques de <i>Thymelaea microphylla</i> vis-à-vis des souches pathogènes par la méthode de micro-dilution.	46
Figure 28 : Photo illustrant l'absence de croissance bactérienne de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (CMB) suite à l'action de l'extrait d'acétate d'éthyle de <i>T. microphylla</i>	47

Lise des Abréviations

A

Al : alcaloïdes

AINS : anti-inflammatoire non stéroïdiens

ATF : antifongique.

ATB : antibiotique.

C

CP : composé phénolique.

CO : composé organique.

COX : cyclo oxygénase

D

DMSO : Diméthyle sulfoxyde

H

HE : huile essentiel

E

EtOH : éthanol

M

MV : matière végétale

MeOH : méthanol

MH : Mueller Hinton agar

MHB : Mueller Hinton Broth

T

T : Thymelaea

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Introduction

Depuis des siècles, l'humanité a pu faire appel à la nature pour répondre à ses besoins essentiels, tels que la nourriture, les abris, les vêtements et même les besoins médicaux. Dans nos jours, l'utilisation des plantes pour le traitement de toutes les maladies, que ce soit en médecine douce ou en phytothérapie, est largement répandue. Elle a joué un rôle crucial et essentiel dans le traitement de nombreuses affections humaines. **(Svoboda, 2000)**. Le règne végétal a été la seule source de médecine pour l'humanité, et il demeure l'une des principales sources de drogues et de médicaments, en particulier dans la médecine alternative, pour les Grecs, les Égyptiens, les Chinois, les Indiens. Auparavant, plus de 20 000 espèces de plantes ont été reconnues. Les plantes médicinales utilisées dans les traitements traditionnels sont abondantes en Inde **(Agrawal, 2009)**.

La phytothérapie est largement utilisée en Afrique, en Asie en particulier. Selon des enquêtes, 80 % des populations rurales des pays en développement et 85 % des populations au sud du Sahara utilisent les plantes médicinales comme principale méthode de traitement **(Nadjaa et al., 2011)**.

De nombreuses d'espèces bactériennes et fongiques ont été évolués et acquise une résistance vis- vis les médicaments actuels, et représentent une menace pour les êtres humains. L'exposition à certains d'entre eux peut provoquer la mort par infection. **(Caumes, 2008)**.

Les plantes médicinales ou la phytothérapie ont joué un rôle essentiel dans la lutte contre les infections et les bactéries, ce qui a permis de sauver des vies et de soulager les souffrances de millions de personnes depuis des années jusqu'à nos jours. La multiplication et la propagation des germes multi résistants nécessitent un suivi et un développement de la médecine verte, des études scientifiques approfondies sont nécessaires à fin d'évaluer les propriétés thérapeutique des substances d'origine végétales. **(Agrawal, 2009)**.

Les antibiotiques sont connus pour être employés dans le traitement de ces maladies. Ils ont pour effet de tuer les bactéries ou tout simplement de les empêcher de se reproduire et de se répandre. Les antibiotiques se distinguent par leur efficacité dans le traitement de diverses bactéries **(Barbut.F, 2014)**. L'utilisation excessive des antibiotiques a entraîné l'apparition de souches résistantes, ce qui a poussé l'homme à chercher des molécules biologiques ayant des propriétés bactéricides et ne présentant aucun symptôme pouvant être dangereux pour les cellules humaines jusqu'à présent. Depuis toujours, le monde végétal a

été une source fascinante qui n'a pas été nécessaire en tant que source de nourriture et de traitement, car la majorité des plantes renferment diverses biomolécules qui ont de multiples activités biologiques.

Toutefois, des tests sont indispensables pour identifier ces molécules et étudier leurs effets. Dans cette étude, notre objectif est d'évaluer l'efficacité antimicrobienne de certains extraits végétaux. Les extraits de *Thymelaea hirsuta* et *Thymelaea microphylla* ont été sélectionnés. Les deux espèces sont endémiques d'Algérie. Ces extraits (obtenus avec divers solvants) ont été testés sur trois espèces bactériennes : *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enteritidis* et *Klebsiella pneumoniae*. Et un champignon particulier : *Candida albicans*. En employant les deux techniques, à savoir la méthode de diffusion solide sur gélose et la microdillution sur milieu liquide.

Au début de ce document, nous présentons un aperçu bibliographique des plantes médicinales, des métabolites secondaires et des propriétés thérapeutiques des plantes sélectionnées.

Dans la section suivante du document, nous exposerons les techniques employées pour préparer les extraits végétaux ainsi que les protocoles appliqués pour évaluer leur activité antimicrobienne. La dernière partie présentera et commentera les résultats obtenus.

Etude Bibliographique

Etude Bibliographique

Partie I : Etude bibliographique

I.1 Les plantes médicinales

Selon la Pharmacopée française, la Xème édition, les plantes médicinales « sont des drogues végétales au sens de la Pharmacopée européenne dont au moins une partie présente des propriétés médicamenteuses ». Les utilisations de ces plantes médicinales peuvent aussi être alimentaires, condimentaires ou hygiéniques. **(Debuigne, 1974)** Il s'agit de plantes qui renferment une ou plusieurs substances susceptibles d'être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la fabrication de drogues bénéfiques. **(Lewis, 1981)**

Il s'agit d'une plante médicinale qui renferme, dans un ou plusieurs de ses organes ou leurs modifications, une ou plusieurs substances chimiques en faible ou forte concentration, connues sous le nom de substance active, qui ont la capacité physiologique de traiter une maladie particulière. Selon l'encyclopédie médicale, il est rare qu'une plante particulière soit médicalement incurable, ce qui signifie qu'elle peut être réduite ou incluse dans le règne végétal (99%) ou plus. **(Abdallah et al., 2017)**

Le groupe consultatif de l'OMS qui a formulé cette définition affirme également qu'une telle description permet de distinguer les plantes médicinales dont les propriétés thérapeutiques et les composants ont été établis scientifiquement des plantes considérées comme médicinales. Il est peut être utilisée à des fins thérapeutiques ou des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles

C'est plantes sont utilisée par des personnes spécialisée nom Herboriste, ce terme décrit un guérisseur traditionnel spécialisée de l'utilisation des plantes médicinales pour traiter diverses maladies il y'a des connaissances sur l'efficacité, toxicité, et du dosage et de préparation des plantes en **(OMS, 1978)**

Contrairement à une plante "classique", une plante médicinale contient des composés actifs qui ont une action thérapeutique, mais qui peuvent également entraîner des effets indésirables tels que la toxicité, tout comme les médicaments chimiques. **(Anne, 2018)**

Les plantes médicinales sont des espèces botaniques utilisées pour soigner diverses affections en utilisant des méthodes telles que l'infusion, la macération et les tisanes. Ces plantes renferment de nombreux métabolites qui présentent un intérêt étendu en pharmacologie, en industrie alimentaire et en cosmologie. **(Alain et al., 2018)**

I.1.1. Les métabolites

Ce sont des substances organiques. En général, ce terme est utilisé pour désigner les petites molécules qui transforment un corps organique au sein d'une cellule. Les actions qui découlent de ces composés chimiques, qu'ils soient des métabolites primaires ou secondaires, possèdent des fonctionnalités médicamenteuses. À l'heure actuelle, grâce aux avancées scientifiques significatives réalisées depuis la fin du XIX^e siècle, la thérapeutique a enduré de nombreuses évaluations avant d'atteindre sa forme actuelle qui utilise des plantes comme matière première (**Cartier *et al.*, 2004**) (aspirine, antibiotiques, cortisone, etc.). Cependant, depuis les années 1970, notamment en raison des effets secondaires des médicaments de synthèse, les individus réorientent leur attention vers les plantes médicinales. L'augmentation de leur popularité a incité les scientifiques à lancer de nouvelles études (**Blandin, 2010**). (Généralement comme cofacteur d'une enzyme), leur protection et leurs interactions avec d'autres organismes. Les végétaux produisent une large gamme de composés organiques variés et variés. Deux catégories de métabolites sont identifiées : les métabolites primaires et les métabolites secondaires.

I.1.1.1 Les métabolites primaires

Il s'agit d'un métabolite qui joue un rôle direct dans la croissance, le développement et la reproduction. En général, il joue un rôle physiologique dans l'organisme. Il s'agit de substances nécessaires à la survie de la cellule. Les glucides et les lipides sont impliqués dans les principales voies du métabolisme basal de celle-ci. Les acides aminés sont essentiels pour la formation des protéines. Parmi les métabolites primaires les plus courants, on peut citer l'acide lactique et certains acides aminés. Il est important de souligner que les métabolites primaires n'ont aucun effet ou action pharmacologique. (**El-Kolli, 2017**).

I.1.1.2. Les métabolites secondaires

Les plantes génèrent une variété de composés organiques qui ne jouent pas un rôle dans la croissance et le développement de la plante. Ces substances, connues sous le nom de métabolites secondaires, sont classées dans différents groupes taxonomiques, mais leur fonction demeure largement inconnue. Selon Goldberg (2003), les métabolites secondaires sont classés en quatre grands groupes : les composés phénoliques, les composés poly phénoliques, les alcaloïdes, les terpénoides et les composés soufrés. Les plantes génèrent une variété de produits. Les composés biologiques des plantes Un large éventail d'activité

biologique a été observé parmi de nombreux composés naturels isolés à partir des plantes, classés généralement en fonction de leurs voies de biosynthèse. On distingue généralement trois grandes familles de molécules : les composés phénoliques, les terpènes, les stéroïdes et les alcaloïdes. (Tiwari *et* Rana., 2015)

I.1.1.2.1. Les composées phénoliques

Les constituants de cette importante catégorie de métabolites secondaires végétaux sont identifiés par la présence d'un ou plusieurs groupes hydroxyles, modifiés ou non, liés à une structure aromatique. Les glucosides sont fréquemment associés aux composés phénoliques (Richter, 1993).

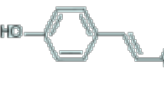
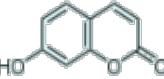
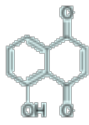
COMPOSES PHENOLIQUES				
Squelette carboné	Classe	Exemple	Formule	Origine
C6	Phénols simples	Hydroquinone		Busserole
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	acide p-hydroxybenzoïque		Epices, fraises
	Acides hydroxycinnamiques	acide p-coumarique		Tomates, ail
C6-C3	Coumarines	Ombelliférone		Carottes, coriandre
C6-C4	Juglone		Noix	

Figure 1 : Les différentes classes des composés phénoliques. (Bakkali *et al.*., 2008)

➤ **Activité thérapeutique du composé phénolique**

Certaines substances phénoliques ont une grande importance pharmacologique, car elles agissent en synergie avec les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) afin d'inhiber l'activité des médiateurs pro-inflammatoires ou l'expression des gènes, en particulier la cyclooxygénase(COX).

Les (CP), qui sont perçus comme des antioxydants, ont la capacité de diminuer le risque de diverses maladies liées au stress oxydatif. Le potentiel antioxydant des cancers, du diabète et des maladies cardiovasculaires varie en fonction du nombre et de la position du groupe hydroxyle dans un composé phénolique spécifique. Au cours des dernières années, on a constaté une augmentation significative de l'utilisation de ces composés phénoliques, tels que les flavonoïdes, les hydroxycinnamates, les coumarines, les xanthones, les chalcones, les stillbénes, les lignines et les lignane, ainsi que leurs voies métaboliques et leurs dérivés, dans le traitement du cancer.ainsi que la prévention dans les lignées de cellules tumorales. (Marcio *et al.*, 2013)

I.1.1.2.2.Les terpènes

Ces composés sont les plus fréquents dans les produits naturels, et ils forment un ensemble de métabolites secondaires importants présents dans les plantes de différentes structures. Les terpènes, également appelées HE, sont employées dans le domaine de la conservation en raison de leurs propriétés antimicrobiennes et antioxydantes. Ces substances naturelles permettent de diminuer ou de substituer les agents de conservation chimiques ou synthétiques (El-houiti ,2020). Dans le domaine de l'aromathérapie et de la pharmacie, on peut citer différentes huiles de massage, des produits cosmétiques, des huiles antioxydantes telles que le girofle, le basilic et l'origan, des huiles antibactériennes telles que le carvacrol thymol, des graines de Nigella, des aldéhydes terpéniques, etc.

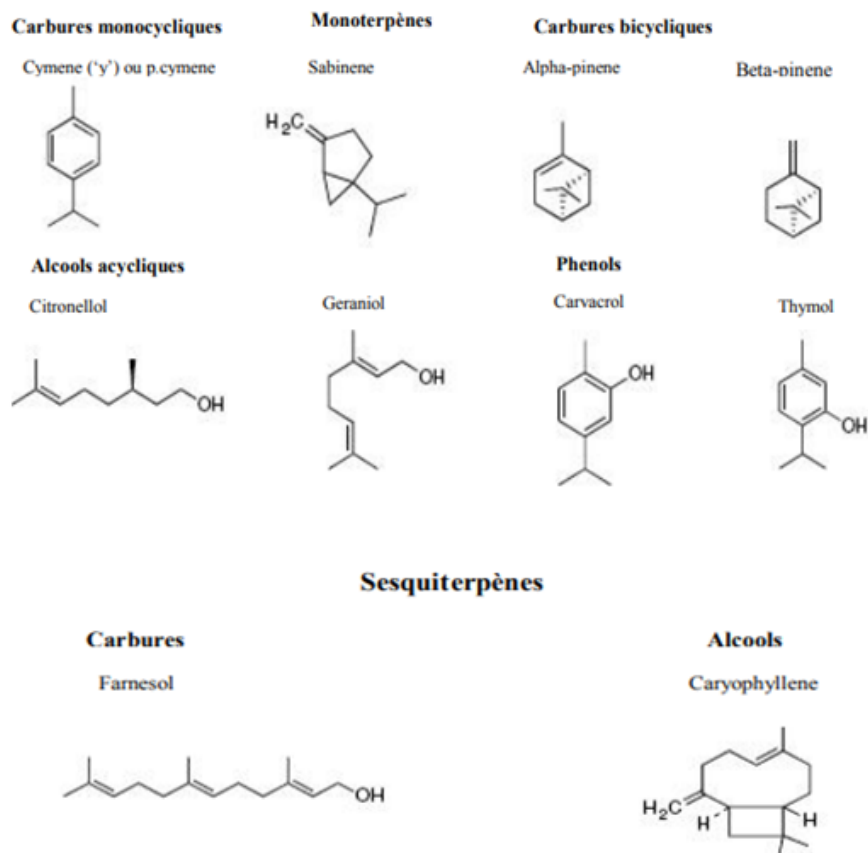


Figure 2: Structure chimique des certains Monoterpènes, Sesquiterpènes et Composés aromatique. (Bakkali *et al.* , 2008)

I.1.1.2.3.Les alcaloïdes

Sont les produits naturels qui contiennent de l'azote ,habituellement comme étant un élément d'un système cyclique ,sont très facilement oxydés à l'air en N-oxydes, c'est pourquoi sont conservés sous forme de sels (citrate ou tartrates) sont incolores une plante peut avoir plus de 100 alcaloïdes ,plusieurs médicaments connus sont à base d'alcaloïdes: les exemples relativement doux incluent la caféine, la quinine, et la nicotine les exemples plus efficaces incluent la cocaïne, la morphine, la strychnine. (Benarous , 2022).

I.2. Importance des plantes médicinales

Ces plantes n'ont pas été abandonnées par l'homme dans la pratique de toutes les cultures comme moyen de nourriture et de traitement.

Le recours aux remèdes naturels et aux préparations à base d'herbes est une pratique répandue qui remonte à des temps aussi anciens que la Bible. **(Hota,2007)** De nos jours, l'usage des plantes médicinales est devenu répandu et se retrouve même dans les sociétés industrialisées. Plusieurs médicaments et traitements chimiques ont été d'abord créés à partir des extraits obtenus à partir de ces plantes. De plus, dans ces sociétés, les remèdes naturels sont devenus plus prisés pour traiter les maladies mineures, en particulier en raison de l'augmentation des frais de soins par les médicaments classiques. La pratique de la médecine traditionnelle est largement répandue en Chine, en Inde, au Japon, au Pakistan, au Sri Lanka et en Thaïlande.

En Chine, les médicaments classiques représentent environ 40 % de la consommation totale de médicaments. Cette tendance est plus prononcée au Japon où les produits pharmaceutiques sont moins populaires que les préparations médicinales à base de plantes. **(Iqbal Ahmad, 2006).**

Il est évident que près de 80 % de la population mondiale, y compris les pays en développement, se basent principalement sur les produits à base de plantes pour leur soins de santé. Selon Miller (2001), des plantes comme le pavot à opium, qui est le plus célèbre pour sa production de composés addictifs, nous offrent des modèles sur lesquels il est possible d'utiliser plusieurs analgésiques opioïdes avec un potentiel pharmaceutique considérable. **(Miller, 2001).**

I.3. Activité antimicrobienne des extraits des plantes

I.3.1. Activité antimicrobienne des extraits des plantes

Alors que la découverte et l'utilisation des antibiotiques ont été les plus grands succès de la médecine, l'apparition et la propagation des bactéries multi résistantes dans les populations humaines sont devenues des problèmes de santé publique extrêmement préoccupants. **(Toty *et al.*, 2013).**

En raison de l'évolution de la multi-résistance et de l'absence de véritables opportunités de découverte de nouveaux antibiotiques dans les années à venir, nous avons décidé d'analyser l'efficacité des plantes à vertus thérapeutiques pour en extraire les principes actifs. **(Toty *et al.*, 2013).**

Ces derniers doivent être plus efficaces que les drogues synthétiques d'une part et être bien accueillis par l'organisme d'autre part (sans avoir des effets néfastes sur la santé humaine). **(García-Ruiz *et al.*, 2008).**

De nombreuses études ont examiné l'effet antimicrobien des extraits de plantes médicinales comme le fenel (*Foeniculum vulgare*), le peppermint (*Mentha piperita*) et le thyme (*Thymus vulgaris*). Ils ont constaté que ces extraits sont efficaces non seulement contre les bactéries, mais également contre les champignons, les levures et les virus. **(Jürgen *et al.*, 2009).**

I.3.2. Activité antimicrobienne des polyphénols

L'antibiothérapie est principalement utilisée pour traiter les infections bactériennes. La prescription massive et parfois inappropriée de ces agents peut conduire à la sélection de souches multi résistantes, ce qui rend essentiel de guider les patients.

Des recherches visant à trouver de nouvelles approches qui sont à l'origine de nouveaux médicaments à base de plantes. **(Billing *et Sherman*, 1998).**

Les composés phénoliques ont été confirmés par de nombreuses études *in vitro* comme agents antimicrobiens contre de nombreux microorganismes pathogènes, avec des spectres d'activités variés. **(Scalbert, 1991)**.

Les polyphénols possèdent des activités antimicrobiennes significatives et variées, sans doute en raison de leur diversité structurale. On suppose que les sites et le nombre de groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont liés à leur toxicité relative.

En ce qui concerne les microorganismes, il est clair que le taux d'hydroxylation est directement lié à la toxicité. **(Cowan, 1999)**.

Le potentiel antibactérien des flavonoïdes, parmi les composés phénoliques, est très élevé, avec les flavones, flavonols, flavonones, flavonones 3-oles, flavanes 3,4 dioles et anthocyanidines.

En utilisant des composants des parois qui inhibent la croissance, on peut se complexer.

En altérant leurs métabolismes énergétiques, les microbes sont perturbés. De plus, les tanins sont très réputés pour leurs propriétés inhibitrices des microorganismes et des enzymes, car ils peuvent former des complexes stables avec les protéines et les précipiter. Leur action antibactérienne se manifeste par leur interaction avec la membrane cellulaire, ce qui entraîne une modification morphologique de la bactérie en inhibant l'activité des protéases, des protéines de transport et des adhésines. **(Djenadi, 2011)**

Matériel et Méthodes

Partie II : Matériel et Méthodes

Notre intérêt par ces recherches est l'évaluation des propriétés antimicrobiennes des extraits des espèces *Thymelaea hirsuta* et *Thymelaea microphylla*, en suivant ces étapes au niveau du laboratoire des sciences fondamentales de l'université Amar TELEDJI de Laghouat :

- Préparation de la matière végétale
- Extraction par Soxhlet.
- L'étude de l'activité antibactérienne des différents extraits.

II.1. Matériel biologique

II.1.1. Matériel végétal

Thymelaea microphylla et *Thymelaea hirsuta* appartenant à la famille de Thymelaeaceae font l'objet de notre étude. Les propriétés médicinales de ces deux espèces endémiques sont largement répandues dans la flore algérienne. (**Tableau 1**)

Tableau 1 : Les espèces végétales employées dans notre étude.

Nom scientifique	Synonyme	Famille	Région	L'année de récolte
<i>Thymelaea hirsuta</i>	<i>Passerine hérissée</i>	Thymelaeaceae	Tiaret	2023
<i>Thymelaea microphylla</i>	<i>Passerina microphylla</i> Coss & Dur		Laghouat	2023

II.1.1.1. Famille des Thymelaeaceae

A. Morphologie

La famille des plantes Thymelaeaceae comprend des arbustes et sous-arbustes qui poussent dans les climats tropicaux et tempérés. Cette famille compte jusqu'à 1200 espèces réparties en 67 genres.

Ces espèces de dicotylédones sont à feuilles persistantes, alternes et coriaces. Les fleurs sont hermaphrodites, à calice tubulaire, à fruits monospermes secs ou drupacés, dioïques ou polygames (quatre à cinq paires de mères). Un périanthe soudé à la base qui présente souvent une apparence corallienne tirant vers le jaune ou le vert. Il y a deux rangées d'endurance (8 à 10) ajoutées. (Quezel *et* Santa, 1962 ; Borris *et al.*, 1988).

B. Propriétés phytochimiques

De nombreux produits chimiques en ce qui concerne la composition phytochimique ont été identifiés à partir de plantes de cette famille. Les huiles essentielles et les monoterpènes sont deux des groupes de composants connus qui confèrent à ces plantes leurs qualités odorantes, Parmi les groupes chimiques les plus importants de cette famille figurent les diterpènes, souvent dérivés du tigliane et du daphnane.

La famille des Thymelaeaceae contient des coumarines sous diverses formes, notamment des coumarines simples comme l'ombelliférone et la daphnéline, des bis-coumarines comme la daphnorétine et des tricoumarines comme l'edgeworoside. Ces plantes comprennent une grande variété de groupes flavonoïdes, tels que les glycosylflavones, les biflavonoïdes, la genkwanine, l'apigénine et la lutéoline. Les flavonoïdes les plus reconnus sont le kaempférol, la quercétine, l'apigénine et la lutéoline. Des lignanes ont également été trouvées dans cette famille, libre ou couplées. (Heywood, 1996 ; Julien, 2002)

C. Intérêts thérapeutiques

Les plantes de la famille des Thymelaeaceae sont largement utilisées en médecine traditionnelle pour traiter un large éventail de maladies. Les préparations à base de ces plantes sont utilisées comme diurétiques, vomitifs, purgatifs, dépuratifs et traitements des affections cutanées et des rhumatismes chroniques (Fournier, 1999). Il a été constaté que de nombreux membres de cette famille sont des plantes dangereuses. Comme nous l'avons déjà noté, l'une des substances les plus courantes chez les membres de la famille des Thymelaeaceae et la cause de leurs effets toxiques sont les diterpènes, connus pour leurs qualités toxiques. (Borris *et al.*, 1988)

II.1.1. 2.Le genre Thymelaea

Le genre Thymelaea comporte environ 30 espèces, ce genre est représenté par 8 espèces répondues principalement en Algérie, plus précisément l'espèce *Thymelaea hirsuta* localisée dans les dunes stabilisées. (Beaumont *et al.*., 2001). Dans ce genre, il existe 31 espèces

d'arbustes et d'herbes xérophylls annuelles à feuilles minuscules et à fleurs jaunâtres ou verdâtres (Kabbaj *et al.*, 2013).



Figure 3: Répartition géographique du genre *Thymelaea*. (Beaumont *et al.*, 2001)

Les plantes de ce genre contiennent une grande quantité de flavonoïdes, d'acides phénoliques, de coumarines et de lignanes (*T. microphylla*, *T. hirsuta*, *T. passerina*, *T. velutina*, *T. virgata*, *T. nitida*, *T. virescens* et *T. tartonraira*) (Trigui *et al.*, 2013 ; Ghanem *et al.*, 2014 ; Kerbab *et al.*, 2015). Les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anticancéreuses et hypoglycémiques de plusieurs de ces espèces sont bien établies (Diogo *et al.*, 2009 ; Elamrani *et al.*, 2009 ; Benhammou *et al.*, 2009).

II.1.1.3. Description botanique des espèces étudiées

A. *Thymelaea microphylla*

❖ Morphologie

Thymelaea microphylla est une sous arbuste annuelle. Les feuilles sont ovoïdes, dispersées, très espacées et minuscules (1/4 mm) sur les branches. Les fleurs ont un aspect jaunâtre et sont dioïques, formant des glomérules (2–5) . Selon Quezel et Santa (1963), les branches sont canescentes et fines. *T. microphylla* est endémique du Sahara et largement distribué dans les régions désertiques et sèches.



Figure 4: Photo illustrant l'espèce *Thymelaea microphylla*. (site web)

❖ Composition chimique

Très peu d'études ont été publiées dans la littérature sur la composition phytochimique de *Thymelaea microphylla*. Dans une étude menée par Cheriti et Sekkoum en 1995, l'acide oléanique, -sitosterol et 3-O-D-glucopyranosyl-sitosterol ont été identifiés dans les parties aériennes de la plante (Dohou *et al.*, 2003). D'autres études récentes ont été publiées sur des composés isolés de cette espèce. Parmi eux, une étude a permis l'extraction de deux spiro-lactone glycosides ainsi que de cinq biflavonoids (neochamaejasmin A, neochamaejasmin B, daphnodorin B, genkwanol A et stelleranol), d'un bis-coumarine (daphnoretin), de deux lignans (pinoresinol et matairesinol), d'un flavonoïde glucoside (tiliroside) et d'un sinapyl alcool glucoside (syringing), tous issus d'extraits d'acétate d'éthyle des parties aériennes et des racines de la plante (Ghanem *et al.*, 2014).

L'étude des composés solubles en chloroforme et en d'acétate d'éthyle de l'extrait aqueux-éthanol de parties aériennes de *T. microphylla* a conduit à l'identification de six composés : vanillin, syringaresinol, daphnoretin, (Z)-8-hydroxylinalool, chrysoeriol et luteolin (Mekhelfi et al., 2014).

Deux autres études (Kerbab et al., 2015 ; Noman et al., 2017) ont révélé la présence de glucoses mono terpéniques, de dérivés de l'acide phénolique (protocatechuic acid, chlorogenic acid butyl ester et éthyle gallate), de glucoses phenylpropanoïdes, de flavonoïdes (yuankanin, derivative de Kaempferol et stenopalustroside A), de lignans (matairesinol et prestegane B) et de coumarine (umbelliferone et daphnoretin) dans ces extraits de cette espèce.

D'autre étude vise à identifier la composition chimique des huiles essentielles de *Thymelaea microphylla*. L'analyse par GC/MS a permis l'identification de 30 composés. Le tridécanal est le composant majeur de la composition chimique, bien que l'étude ait identifié les autres produits naturels comme composants mineurs (Bounab et al., 2018).

❖ Utilisation Traditionnelle

Thymelaea microphylla est employé dans la médecine traditionnelle en raison de ses propriétés anti-inflammatoires, anti-cancéreuses et antidiabétiques. On utilise des décoctions et des compresses naturelles préparées à partir d'éléments aériens de cette espèce pour traiter l'abcès, maladies de la peau, douleurs abdominales et rhumatisme ; cette plante est également utilisée comme antihelminthique (Boukef , 1986 ; Benhammou et al., 2009).

B. *Thymelaea hirsuta*

❖ Morphologie

Thymelaea hirsuta est une plante vivace dont la hauteur ne dépasse pas un mètre (Batanouny ,2005). Elle présente une couche ligneuse, robuste et a de nombreux rameaux tombants (Pausas et al., 2006), garnis de nombreuses petites feuilles d'environ 6 mm, ovales presque imbriquées, épaisses, brillantes au-dessus et cotonneuses en dessous (Jeanmonod et Gamisans , 2007) (Figure 5). Si le climat est favorable, la floraison commence en octobre et se prolonge jusqu'en avril (Jeanmonod et Gamisans, 2007). La plante possède des pieds variés, avec des fleurs unisexuées ou hermaphrodites. (Dommée, 1995 ; Renner, 2001).

Cette plante présente des fleurs à 2 à 5 périanthes jaunâtres à l'intérieur, blanches, soyeuses et pubescentes à l'extérieur (Beniston, 1984 ; Somon, 1987).



Figure 5 : *Thymelaea hirsuta* (Linné) Endlicher (Photos originales : site web)

❖ Traditionnelle utilisations

La plante *Thymelaea hirsuta* est employée dans la médecine traditionnelle arabe pour traiter :

- ✚ les ascaris,
- ✚ les oxyures,
- ✚ feuilles séchées broyées ont été utilisés pour traiter les infections de la peau et de l'écorce de contribuer à la guérison des plaies,
- ✚ la suppression des dents pourries où bouillir les feuilles dans l'eau et le rinçage de la bouche sont ensuite lui crachait avec des dents pourries,
- ✚ prévenir les avortements chez les chameaux.

Selon **Rizk (1974)**, les chercheurs ont réussi à isoler le stigmastérol de *Thymelaea hirsuta* qui est un stéroïde qui est utilisé pour produire la progestérone, une hormone utilisée dans le traitement des fausses couches à répétition chez les femmes.

❖ **Composition chimique**

la composition chimique était dominée par la présence de sesquiterpènes d'hydrocarbures (26,91%) avec la germacrène D (12,98%) comme composant majeur ,tandis que les sesquiterpènes et monoterpènes oxygénés représentaient respectivement 13,82 et 13,29 . le huile essentiel a démontré un potentiel antioxydant qui peut être considéré comme un agent puissant dans la conservation des aliment et la découverte de médicaments.(**African journal of biotechnology 10(15),2930-2935,2011**).I

La plante *Thymelaea hirsuta* est la source de composés naturels qui inhibent la croissance et l'invasion cellulaire et induisent l'arrêt du cycle cellulaire du cancer. une analyse plus approfondie permettra d'identifier les composés actif et de confirmer leur rôle dans le traitement chimiothérapeutique

Grace aux radicaux 1,1-diphényl -2-picrylhyorazyl et des activités de la tyrosinase l'espèce *T.hirsuta* possèdent des activités antioxydante et antifongique. (**Natural product communications 16 (2) ,2021**).

II.1.1.4. Systématiques des plantes étudiées

Les noms vernaculaires des *Thymelaea microphylla*, *Thymelaea hirsuta* sont « (Methnan) (*Thymelaea microphylla*),(Azaz)(*Thymelaea hirsuta* »). La classification des deux espèces est représentée dans le tableau 3.

Tableau 2 : Classification systématique de *T. microphylla* et *T. hirsuta*. (Denelle. N ; Puech .S, 1985) et (APG, 1998).

Règne	Plante	
Embranchement	Spermatophyta	
Sous Embranchement	Angiospermae	
Classe	Eudicots	
Ordre	Malvales	
Famille	Thymelaeaceae	
Genre	Thymelaea	
Espèce	<i>Thymelaea microphylla</i>	<i>Thymelaea hirsuta</i>

II.1.2. Description des souches microbiennes utilisées

❖ *Yersinia enterocolitica*

Yersinia enterocolitica est un agent pathogène majeur d'origine alimentaire, bien que des souches pathogènes aient été isolées dans les aliments avec une rareté. La PCR a permis d'obtenir des taux de détection plus élevés dans l'étude de la viande de porc crue que les méthodes de culture.

En tant qu'agent pathogène zoonotique majeur d'origine alimentaire, *Yersinia enterocolitica* peut entraîner une infection par la Yersinia chez l'homme et l'animal. La diarrhée est le symptôme principal chez l'homme, surtout chez les jeunes enfants. (Bottone, 1999). Il n'est pas rare de rencontrer des séquelles secondaires d'origine immunologique, Gram négatives ou Gram variables, bâtonnets ou coccoïdes de 0,5 à 0,8 µm de largeur et 1 à 3 µm de longueur bien que des souches pathogènes aient été isolées dans les aliments avec une rareté. La PCR a permis d'obtenir des taux de détection plus élevés dans l'étude de la viande de porc crue que les méthodes de culture. (Figure 6)



Figure 6 : Image générée par ordinateur 3D de *Yersinia enterocolita*

Source : <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=21923>

❖ *Salmonella enteritidis*

Salmonella enteritidis est une bactérie anaérobie facultative de Gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae, présente dans l'environnement. (Steve Yan *et al.*, 2004).

Les espèces de *Salmonella* se rencontrent dans de nombreux endroits dans l'environnement, mais le tractus intestinal des animaux est le principal habitat de ces bactéries. (Ellermeier *et al.*, 2006). Dès le milieu des années 1970, les maladies humaines causées par l'infection de *salmonella enteritidis* ont connu une augmentation à l'échelle mondiale (Figure 7) (Baumler *et al.*, 2000).

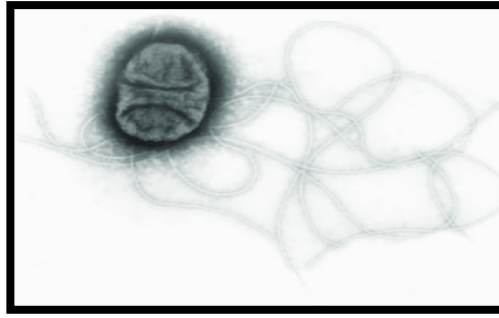


Figure 7: Image en microscopie électronique (fond noir) d'une *Salmonella Enteritidis* flagellée.

Source : https://www.researchgate.net/figure/Image-en-microscopie-electronique-fond-noir-dune-Salmonella-Enteritidis-flagellee-A_fig1_340973434

❖ *Klebsiella pneumoniae*

C'est une espèce des bactéries de la famille des Enterobacteriaceae, dont les genres *Salmonella* et *Escherichia* sont bien connus. (Adeolu *et al.*, 2016). *Klebsiella pneumoniae* est un agent pathogène depuis longtemps (il a été décrit pour la première fois comme étant une cause de pneumonie par Carl Friedländer en (1882) et demeure l'un des agents pathogènes nosocomiaux les plus fréquents à l'échelle mondiale. (Pendleton *et al.*, 2013). En plus d'être un agent pathogène nosocomial important, *Klebsiella pneumoniae* peut se reproduire dans de nombreuses niches environnementales et liées à l'hôte. (Bagley, 1985).

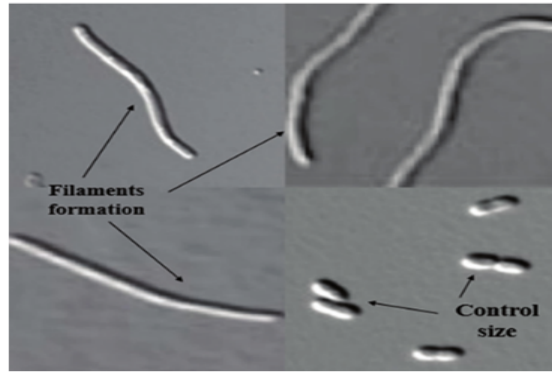


Figure 8: Isolat de *Klebsiella pneumoniae* par Microscope électronique à balayage.

Source : https://www.researchgate.net/figure/a-Scanning-electron-microscope-b-light-microscope-100-magnification-filament-of_fig3_365405265

❖ *Candida albicans*

Candida albicans fait partie du microbiote humain normal qui se développe sans symptômes dans diverses zones de l'organisme, telles que le tractus gastro-intestinal, le tractus génital féminin, la cavité buccale et la peau. (Fox & Nobile, 2013). Cependant, lorsqu'il y a un compromis des mécanismes de défense de l'hôte, ils peuvent être pathogènes. (Niewerth et Kortling, 2002)

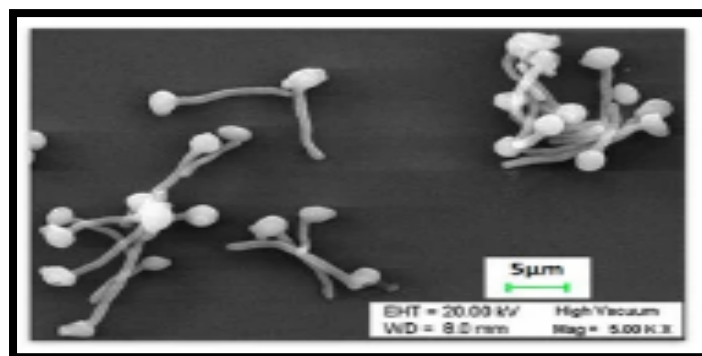
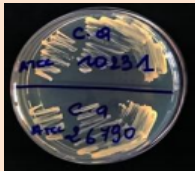


Figure 9: Les cellules de *Candida albicans* par microscope électronique à balayage.

Source : <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/24/17227>

Les différentes souches microbiennes utilisées étaient des souches de référence obtenues auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC), provenant de familles et de catégories différentes, comme indiqué dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3: Liste des microorganismes analysés dans notre étude.

	Bactéries Gram (-)	Levure
Souches bactériennes	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Candida albicans</i> 26
Référence	ATCC 9610 ATCC 70603 ATCC 10376	ATCC 26790
Observation macroscopique	 	

II.2.Méthode experimental

Les différentes étapes de cette étude sont présentées dans l'organigramme ci-dessous :



Figure 10: Schéma représentative du plan de travail suivi.

II.2.3. Étude des activités biologiques

II.2.3.1. Étude de l'activité antimicrobienne

Le principal but de notre étude est l'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits de *Thymelaea microphylla* et *Thymelaea hirsuta*.

Deux méthodes ont été employées :

- La méthode de diffusion sur milieu solide.
- La méthode de diffusion sur milieu liquide.

❖ Préparation de milieu de culture

la méthode de préparation du milieu de culture est indiquée dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Propriétés et préparation des milieux de culture.

Milieu de culture	Propriétés	Préparation
Mueller-Hinton	MH Solide	38g dans 1L d'eau distillée
	MH Liquide	21g dans 1L 1L d'eau distillée
Sabouraud	SB Solide	65g dans 1L d'eau distillée
	SB Liquide	28g dans 1L d'eau distillée

Les milieux préparés doivent être autoclaver à 120 °C pendant 20 min avant l'utilisation.

❖ préparation de disque : le papier wattman N° 3 a été utilisé pour la préparation du disque de 5mm de diamètre à l'aide de l'emporte-pièce équivalente du disque d'antibiotique commercialisés.

❖ Activation et préparation des souches stockées

Pour obtenir l'inoculum, une suspension est préparée en prélevant quelques colonies jeunes et en les repiquant tous les 24 heures. Notez que les souches repiquées sont prélevées à l'aide d'un écouvillon pendant la phase exponentielle. Quelques colonies de la souche testée ont été préalablement diluées dans l'eau physiologique stérile afin d'atteindre une densité optique de 0,08 à 0,1 lu à 625 nm équivalent de 10^8 cellules/ml.

❖ Préparation des dilutions des extraits

Afin d'obtenir des différentes concentrations de l'extrait végétal, on prend :

Pour $[C_0]$: une masse de 100 mg de chaque extraits + 3 ml de DMSO

Pour $[C_{1/2}]$: 1 volume de $[C_0]$ $\longrightarrow$ + 1 volume de DMSO

Pour $[C_{1/5}]$: 1 volume de $[C_0]$ $\longrightarrow$ +4 volume de DMSO.

❖ Disques d'antibiotiques et d'antifongiques utilisés

Les disques ont été sélectionnés en fonction des souches choisies et de leur disponibilité, nous avons opté pour les ATB et les ATF présentés dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Les antibiotiques et les antifongiques utilisés.

Antibiotique	Le code	La dose
Cefoxitin	Fox-30	30 μ g
Imipenem	IPM-10	10 μ g
Ciprofloxacine	CIP-5	5 μ g
Cefazal	Céfazoline	1 g
Antifongique		
MYTRICINE		40 ml 10%
FLUMIKOZ	Fluconazole	200 mg 100 ml

Le test de sensibilité des souches microbiennes a été réalisé afin de tester leur sensibilité aux ATB ou aux ATF et de les comparer à celle de nos extraits.

II.2.3.1.1 Technique de diffusion sur milieu solide (sur disque disposée sur gélose)

Cette méthode vise pour tester l'efficacité des extraits utilisés déposés sur les disques pour déterminer la sensibilité des souches utilisées contre l'activité antimicrobienne de ses extraits (Selka *et al.*, 2016).

L'objectif de cette méthode est de placer un disque stérile sur un tapis bactérien ou fongique, afin d'évaluer l'inhibition de la croissance des différentes souches utilisées : (souche sensible ou souche résistante).

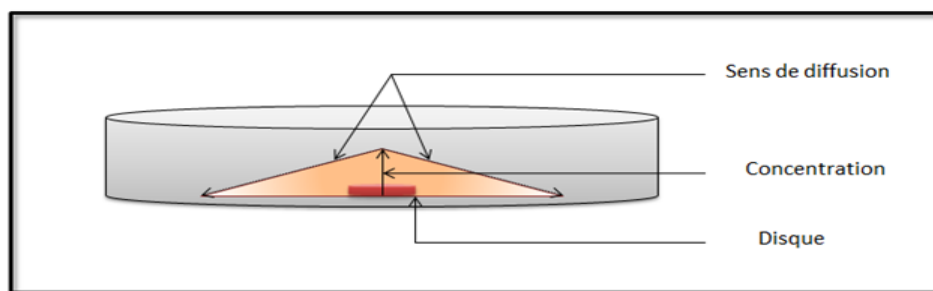


Figure 11 : Schéma simplifié du principe de la méthode de diffusion sur milieu solide.

❖ Mode opératoire

L'activité antimicrobienne des différents extraits des deux plantes a été analysée par diffusion sur gélose contre une seule souche fongique (la levure *Candida albicans*) et trois souches bactériennes (*Yersinia enterocolitica* ; *Klebsiella pneumoniae* ; *Salmonella enteritidis*).

Un inoculum est prélevé dans l'eau physiologique à partir de cultures jeunes incubées pendant 18 heures à 24 heures à 37°C afin de préparer une suspension appropriée à une concentration de 10^8 cellules/ml. Les écouvillons stériles ont été utilisés pour l'ensemencement en surface du milieu gélosé MH, tandis que le milieu Sabouraud a été utilisé pour la levure. Les disques de Wattman N° 3 (5 mm de diamètre) sont disposés en raison de 3 disques pour chaque concentration.

On insère les extraits avec 10 µl de chaque concentration ($C_0 = 33,33\text{mg/ml}$), $C_{1/2} = 16,66\text{mg/ml}$, $C_{1/5} = 6,67\text{mg/ml}$) à l'aide d'une pince stérile sur la gélose inoculée.

Les boîtes de pétri sont ensuite refermées et laissées s'écouler à température ambiante, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Dans les boîtes de contrôle, les disques trempés de DMSO sont utilisés comme contrôle négatif et les disques normatifs d'antibiotiques sont utilisés comme contrôle positif. (Figure 12).

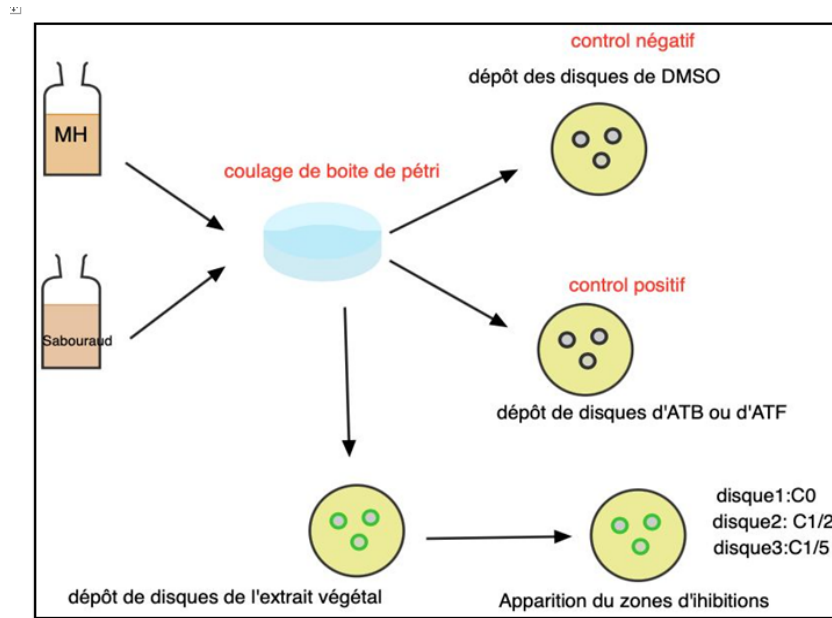


Figure 12 : Schéma de la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques.

II.2.3.1.2 Technique de diffusion sur milieu liquide

Nous utilisons une méthode basée sur la micro-dilution sur les microplaques pour évaluer l'activité antimicrobienne de notre extrait végétal. Le principe de cette méthode est le suivant :

Afin de déterminer :

- La concentration minimale inhibitrice (CMI). Selon Rios et al. (1988),
 - La concentration minimale bactéricide (CMB) pour toutes les souches bactériennes.
 - La concentration minimale fongicide (CMF pour les souches de Candida. (Sauteur et al, 1999).
-
- CMI : la plus faible concentration qui inhibe la croissance des souches étudiées.
 - CMB : la plus faible concentration qui tue les souches bactérienne.

- CMF : la plus faible concentration qui tue les souches virales. (Canillac *et* Mourey, 2001)

❖ Mode opératoire

Afin d'évaluer de manière précise le CMI, il est utilisé des microplaques de 96 puits (Figure 13).

Figure 13 : Schéma représentatif d'une microplaque de 96 puits.

Les étapes de la microdillution sont les suivantes :

- **Première étape :** on verse dans le premier puit 100ul du milieu de culture dans toutes les puits (MH= pour les bactéries) et (SB=pour les levures).
- **deuxième étape :** 100 µl de la solution mère de concentration ($C_0 = 33,33 \text{ mg/ml}$) a été ajouté dans les puits de la première colonne de (A à C) pour (Extrait acétate éthyle) et (E à G) pour (Extrait méthanolique) pour les souches bactériennes, (D et

H) pour (Extrait d'acétate d'éthyle et Extrait méthanolique) par ordre pour la souche fongique.

Faite de la colonne 1 à 6 en utilisant le milieu de culture liquide comme diluant. Afin de garder un volume fixe de 100 μ l dans chaque puits, l'excédent dans la dernière concentration (100 μ l a été jeté). Pour obtenir les dilutions (1/2,1/4,1/8,1/16,1/32,1/64) (**Tableau 6**). Le protocole établi est illustré dans le schéma suivant :

Tableau 6: Les dilutions des extraits et leurs positions dans la microplaque.

	C0	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Concentration mg/ml	33,33	16,67	8,33	4,17	2,08	1,04	0,52
Position (puits)		01	02	03	04	05	06

Les colonnes de 8 à 12 des rangées A, B, C et E, F, G ont été réservées pour le contrôle positif (Antibiotique pour les bactéries) et D, H (Antifongique pour la levure). 100 μ l d'antibiotique est ajouté dans les puits de la colonne 8 (A, B, C, E, F, G) et 100 μ l d'antifongique dans les rangée D et H, puis diluée en série jusqu'à les puits de la colonne 12 (on jette 100 μ l du dernier puits).

Figure 14 : Schéma représentatif de la série des dilutions.

- **La troisième étape :** on a ajouté 100 µl de suspensions microbiennes ajustées avec une concentration de 108 UFC/ml dans tous les puits préalablement chargés. Chaque puits possède un volume total de 200 µl. Les puits des rangées A, B, C, E, F, G, D et H sont utilisés comme des témoins négatifs. Ils renferment 100 µl de milieu de culture liquide avec 100 µl de suspension microbienne sans extrait. Ensuite, la microplaque de culture a été placée dans l'étuve à une température de 37°C pendant une durée de 24 heures. Après 24 heures à une température de 37°C, 40 µl de la solution d'iodonitrotétrazolium chloride à une concentration de 0,2 mg/ml ont été ajoutés à chaque puits.

Pendant une période de 5 à 30 minutes, l'INT réagit avec les cellules microbiennes. La fonction de l'INT est de déterminer la viabilité des cellules microbiennes. Selon la Figure 15, il s'agit d'un réactif coloré qui agit comme un accepteur d'électrons. Des micro-organismes viables réduisent la couleur jaune du tétrazolium, ce qui lui donne une teinte rose/violette. Si aucune modification de couleur n'est observée, cela suggère une inhibition de la croissance des microbes (Mfengwana et Mashele, 2016).



Figure 15: Photo originale et la structure chimique d'INT.

Afin de distinguer le CMI du CMB ou du CMF, les puits de coloration clair sont repiqués sur un milieu gélosé vierge.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

Partie III : Résultats et discussion

III.1. Étude des activités biologiques

Dans le but d'évaluer l'activité antimicrobienne de *Thymelaea microphylla* et *Thymelaea hirsuta*. Notre objectif est de comprendre le pouvoir thérapeutique ou médical de ces plantes. Nous avons effectué des expériences et des comparaisons pour chaque échantillon.

III.1.1. Test du pouvoir antimicrobien

Dans le cadre de cette étude, nous avons effectué des tests sur des souches microbiennes en utilisant des solvants de polarité croissante provenant de la partie aérienne des deux espèces étudiées. Les extraits ont été évalués à l'aide de la technique de diffusion des disques sur milieu solide. La concentration minimale inhibitrice (CMI) a ensuite été calculée en utilisant la méthode de dilution sur un milieu liquide.



Control négatif

Il est également essentiel d'évaluer la toxicité du solvant lorsqu'il s'agit de réaliser des essais biologiques sur les extraits, car même à l'état de traces, il est crucial que le solvant ne perturbe pas le processus biologique.

Selon Yrjöen (2004), le solvant peut former des complexes avec certains composés ou provoquer leur décomposition, leur déshydratation ou leur isomérisation. Le DMSO est un solvant qui ne perturbe pas la croissance normale des souches microbiennes, comme le montre la figure 15. C'est la raison pour laquelle il est employé en tant que contrôle négatif.

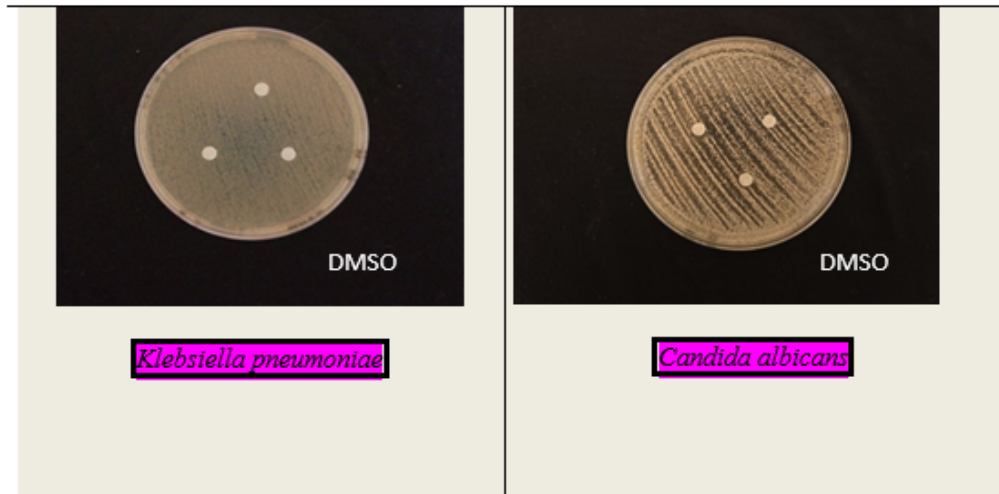


Figure 16: Impact de DMSO sur certaines souches analysées.

Antibiogramme (contrôle positif)

Tableau 7: Diamètres moyens en (mm) des zones d'inhibition des cultures microbiennes.

Souches testées	Antibiotiques			Antifongique
	Ciprofloxacine CIP 5µg	Imipenem IPM 10µg	Cefoxitin FOX 30µg	Myrticine
<i>Salmonella enteritidis</i>	36	20	30	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	34	12	17	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	31	26	22	
<i>Candida albicans</i>				14

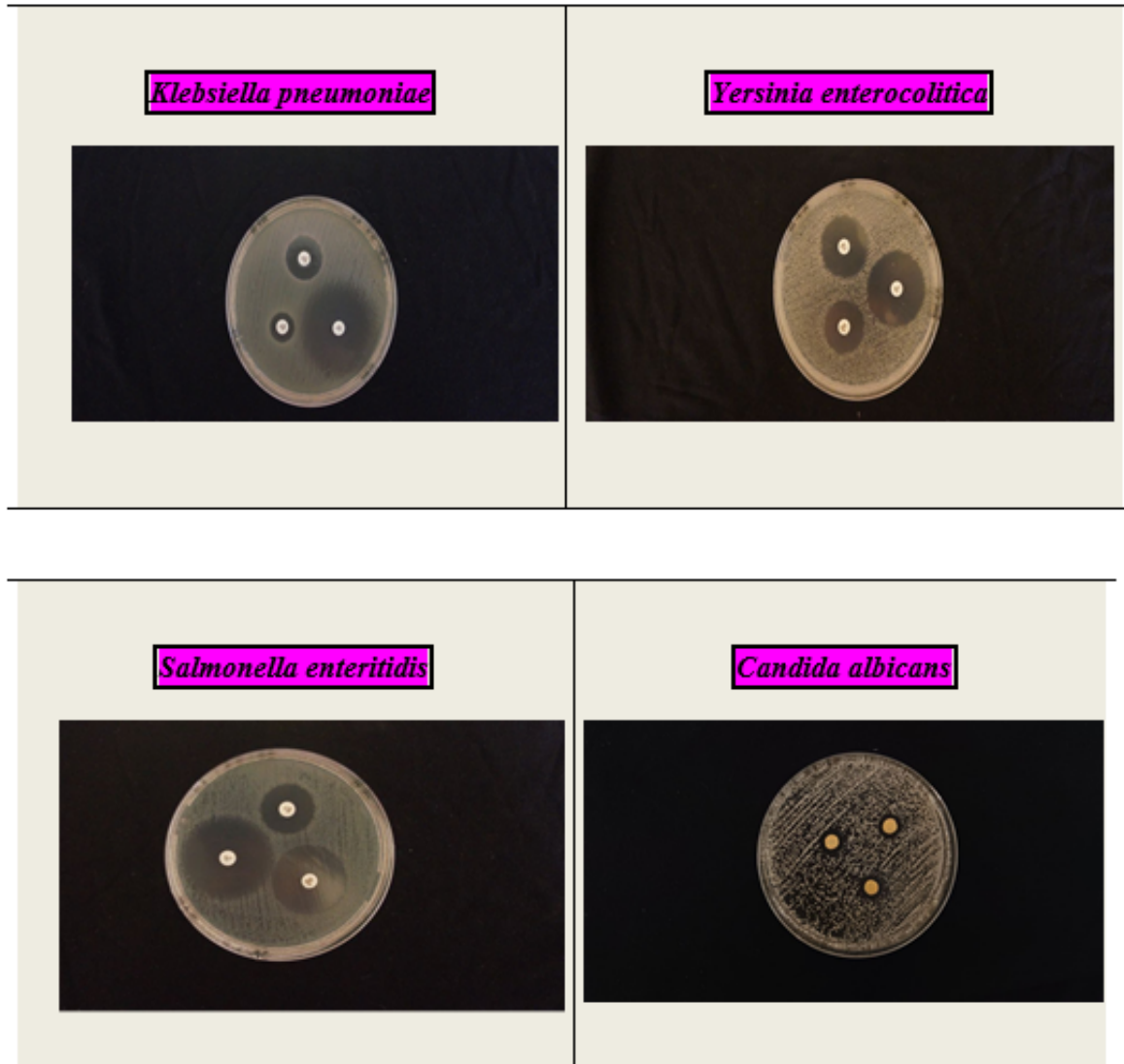


Figure 17: Effet des ATB sur les souches bactériennes étudiées et l’effet de l’ATF sur *Candida albicans*.

Les diverses souches microbiennes ont montré une sensibilité différente aux antibiotiques ou antifongiques classiques testés.

III.1.1. 1. Résultats de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur gélose

Dans le cadre de cette étude, nous avons réalisé des tests sur des souches microbiennes en utilisant des solvants de polarité croissante, les extraits sont issus de la partie aérienne des deux espèces étudiées, puis dissous dans du DMSO. La présence ou non d'une zone d'inhibition autour du disque de papier préalablement imprégné de l'extrait varie en fonction des concentrations (C_0 , $C_{1/2}$, $C_{1/5}$).

Les niveaux d'activité antimicrobienne ont été évalués en fonction de trois critères :

- Fort ($D > 9$ mm), la souche est sensible ;
- Moyenne ($6 \text{ mm} < D < 9$ mm), la souche est intermédiaire.
- La souche est résistante, même si elle est faible ($D < 6$ mm) (Billerbeck, 2007).

Les données concernant les zones d'inhibition sont représentées en millimètres (mm), comme illustré dans les tableaux, les figures et les histogrammes suivants :

Tableau 8: Diamètres moyens en (mm) des zones d'inhibition des cultures microbiennes incubés avec des extraits de *Thymelaea hirsuta*.

Extraits	Diamètres de la zone d'inhibition en (mm)					
	Acétate d'éthyle			Méthanol		
Souches	C_0	$C_{1/2}$	$C_{1/5}$	C_0	$C_{1/2}$	$C_{1/5}$
<i>Yersinia enterocolitica</i>	9±00	9±00	8 ±0,33	9±0,33	9±00	8±0,67
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8±00	7 ±0,33	7 ±0,33	7±0,67	7 ±0,33	7 ±0,33
<i>Salmonella enteritidis</i>	9±0,33	8 ±0,33	8±0,33	8±00	8+00	7±0,67
<i>Candida albicans</i> 26	9±0,33	9±0,33	8 ±0,33	8±0,67	8±0,33	8±0,33

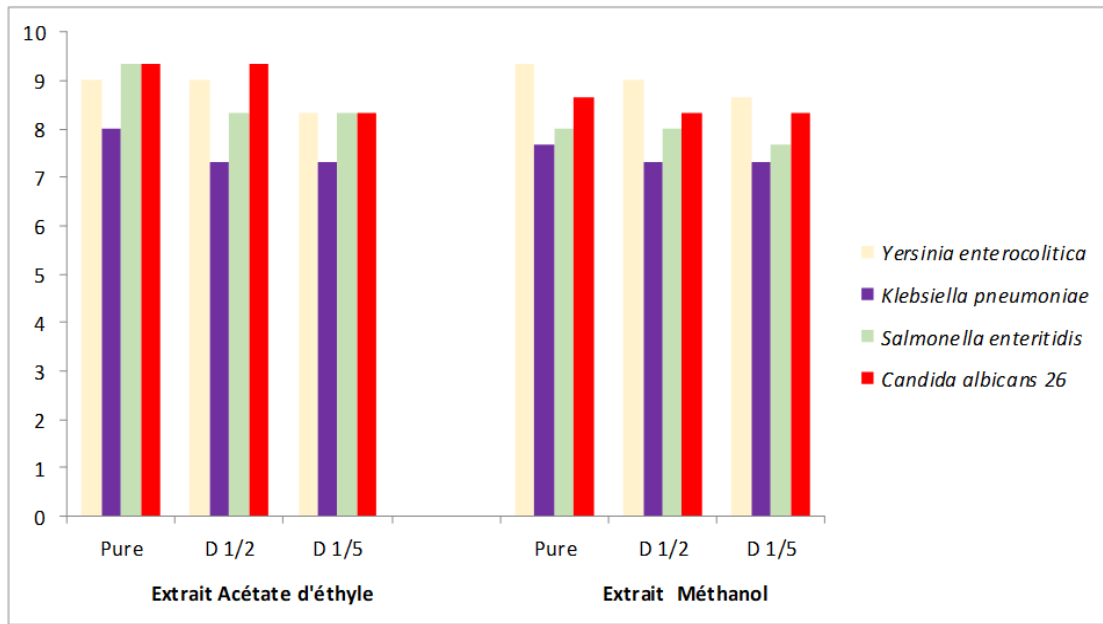


Figure 18: Les diamètres des zones d'inhibition obtenus suite à l'effet des deux extraits de *Thymelaea hirsuta* sur les quatre souches microbiennes.

Les deux extraits organiques (acétate d'éthyle et méthanolique) de *Thymelaea hirsuta* ont un effet antimicrobien qui se manifeste par une variation moyenne des diamètres des zones d'inhibition, allant de 7 à 9 mm.

La bactérie de Gram négatif (*Yersinia enterocolitica*) présente une sensibilité surtout à l'extrait méthanolique, tandis que la levure (*Candida albicans 26*) présente une activité antifongique légèrement plus élevée dans l'extrait d'acétate d'éthyle, en particulier à la concentration pure (C_0) et ($C_{1/2}$).

Le diamètre de la zone d'inhibition varie de 7 à 8 mm pour la bactérie (*Salmonella enteritidis*), à l'exception de l'extrait d'acétate d'éthyle à concentration pure, où le diamètre est supérieur à 9 mm.

Finalement, nous avons observé une résistance aux deux concentrations ($1/2$) et ($1/5$) pour la bactérie (*Klebsiella pneumoniae*), ainsi qu'une sensibilité à la concentration pure pour les deux extraits.

Tableau 9: Diamètres moyens en (mm) des zones d'inhibition des cultures microbiennes incubés avec des extraits de *Thymelaea microphylla*.

Extraits	Diamètres de la zone d'inhibition en (mm)					
	Acétate d'éthyle			Méthanol		
Souches	C ₀	C _{1/2}	C _{1/5}	C ₀	C _{1/2}	C _{1/5}
<i>Yersinia enterocolitica</i>	10±0,33	9±,67	7±0,33	10 ±00	8±0,67	6±00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9±00	9±00	6±,67	10±00	10 ±00	8±00
<i>Salmonella enteritidis</i>	9±00	9±00	8±00	9±0,67	9±00	8±00
<i>Candida albicans</i> 26	9±0,67	9±0,33	9±00	9±,33	9±00	8±0,33

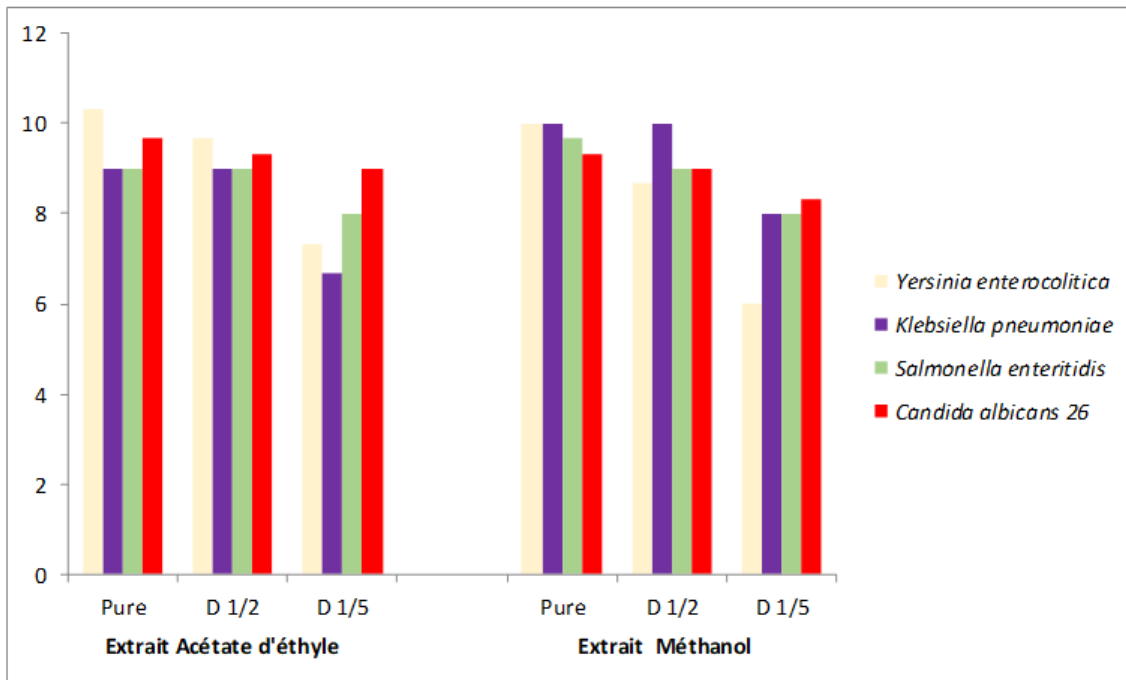


Figure 19 : Les diamètres des zones d'inhibition obtenus suite à l'effet des deux extraits de *Thymelaea microphylla* sur les quatre souches microbiennes.

Concernant l'activité antimicrobienne de (*Thymelaea microphylla*), on a observé que :

Pour la concentration pure (C_0), les quatre souches microbiennes ont une sensibilité élevée dans l'extrait méthanolique. Par contre pour l'extrait acétate d'éthyle les souches bactériennes *Klebsiella pneumoniae* et *Salmonella enteritidis* ont un diamètre de zone d'inhibition de 9 mm, moins que les souches microbiennes *Yersinia enterocolitica* et *Candida albicans* 26, qui ont un diamètre allant de 9 à 10 mm.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne pour la dilution ($C_{1/2}$) se déroule de la manière suivante : des diamètres de zone d'inhibition proche pour les souches microbiennes *Candida albicans* 26, *Salmonella enteritidis* et *Yersinia enterocolitica*, est plus sensible pour *Klebsiella pneumoniae*. Pour l'extrait d'acétate d'éthyle, les quatre souches ont une activité antimicrobienne très similaire.

De plus, pour la dilution ($1/5$), la souche *Yersinia enterocolitica* présente une faible activité antimicrobienne dans les deux extraits, tandis que les souches *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* et *Candida albicans* 26 ont été observées comme étant plus sensibles.

En concluant, les extraits de *Thymelaea microphylla* et *Thymelaea hirsuta* ont nettement influencé sur les diamètres des zones d'inhibition, qui varient de 6 à 10 mm. Les diamètres élevés ont été obtenus par les extraits de *Thymelaea microphylla* contre la souche fongique de *Candida albicans*, suivi par *Yersinia enterocolitica*. Toutefois, les résultats sont plus faibles pour les souches bactériennes *Klebsiella pneumoniae* et *Salmonella enteritidis*, dans les deux extraits d'acétate d'éthyle et de MeOH respectivement.

Les résultats indiquent que leur effet est presque similaire et que l'extrait obtenu par l'acétate d'éthyle est légèrement plus élevé que celui obtenu par MeOH.

Selon tous les résultats obtenus, il est possible de conclure que la comparaison des deux extraits de *Thymelaea microphylla* révèle une activité supérieure à celle de *Thymelaea hirsuta*.

Une caractéristique supplémentaire de l'huile essentielle de *T. microphylla* était son activité antibactérienne importante contre *B. subtilis*, *E. coli*, *E. faecalis* et son absence d'effet contre *P. aeruginosa* et *S. aureus* (Bounab et al., 2018).

Les figures suivantes illustrent l'efficacité antibactérienne et antifongique des extraits étudiés, qu'ils soient d'acétate d'éthyle ou de méthanol, provenant des deux espèces, ainsi que leur impact sur les souches bactériennes (*Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis*) et la souche fongique *Candida albicans* 26.

Thymelaea hirsuta

Extrait d'acétate d'éthyle

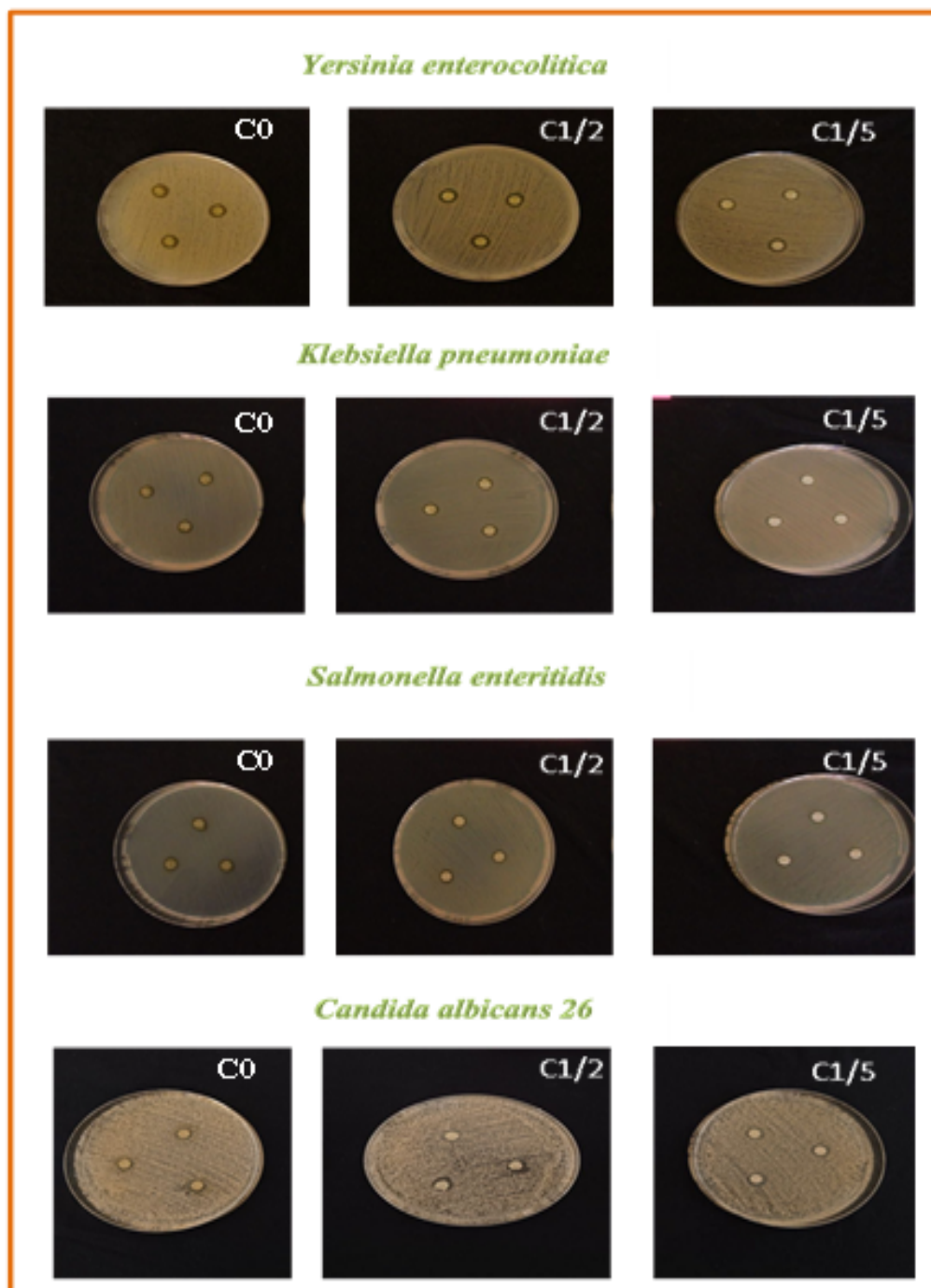


Figure 20 : Effet d'extrait d'acétate d'éthyle de *Thymelaea hirsuta* sur la croissance des souches microbiennes.

Thymelaea hirsuta

Extrait méthanolique

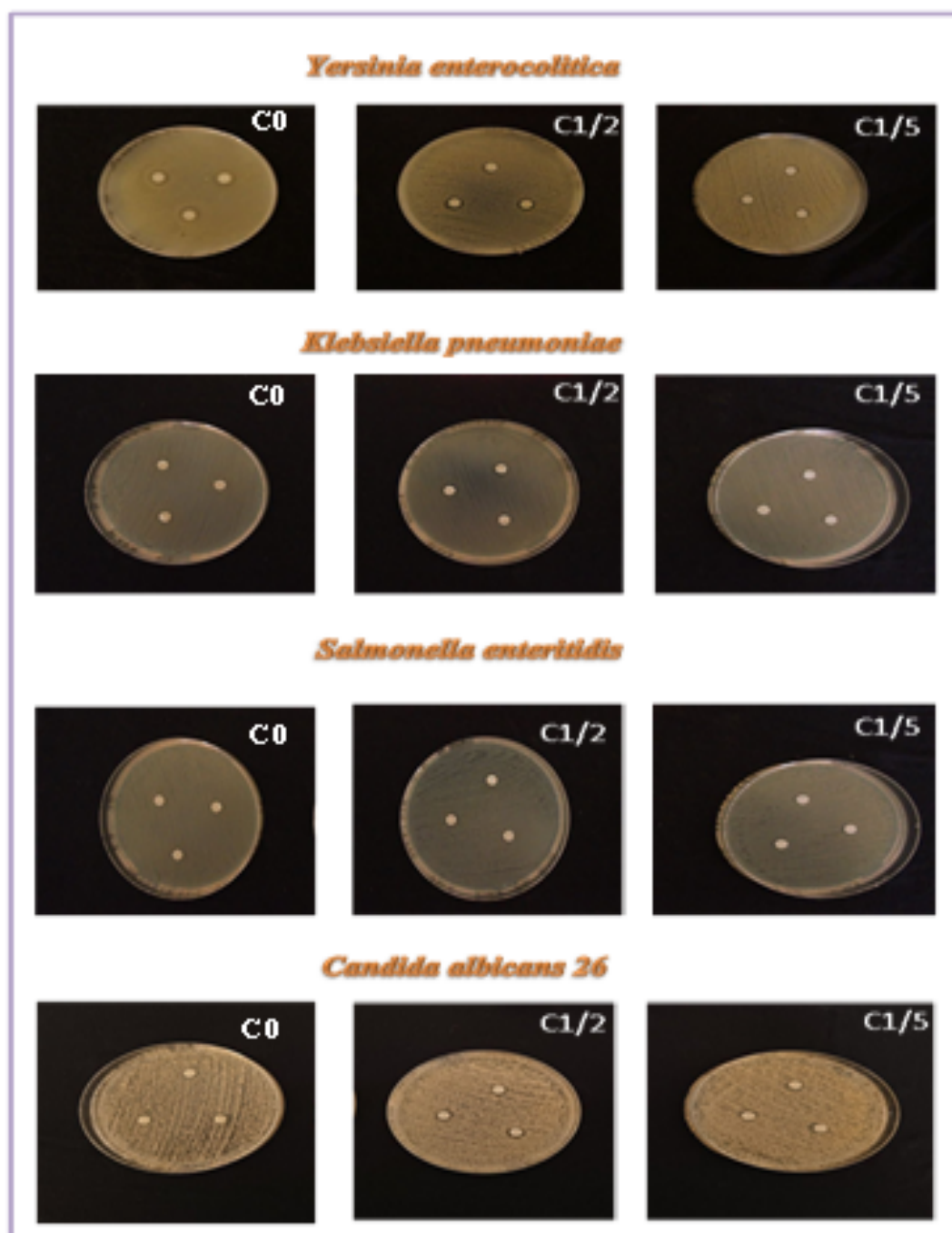


Figure 21 : Effet d'extrait méthanolique de *Thymelaea hirsuta* sur la croissance des souches microbiennes.

Thymelaea microphylla

Extrait d'acétate d'éthyle

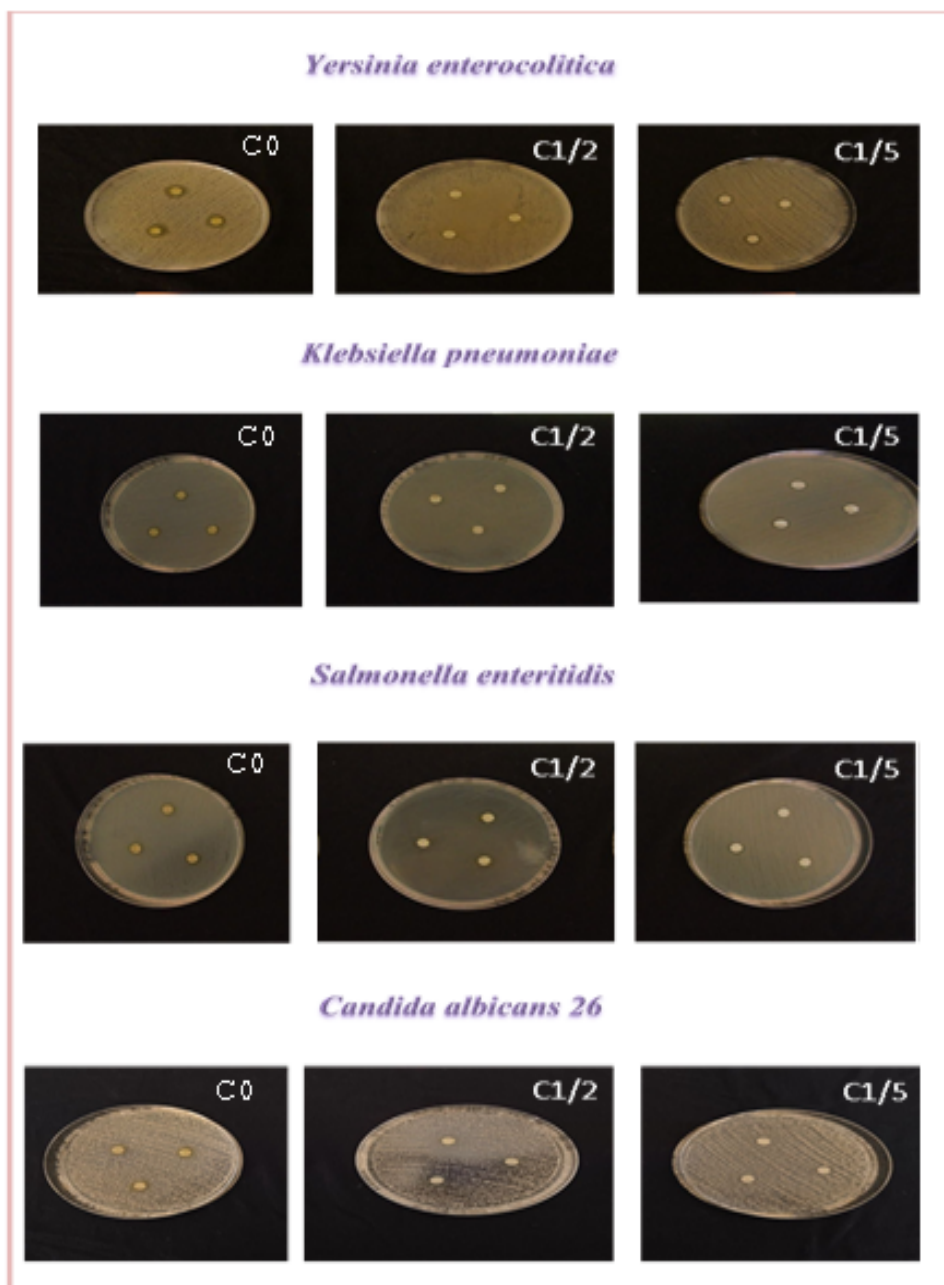


Figure 22 : Effet d'extrait d'acétate d'éthyle de *Thymelaea microphylla* sur la croissance des souches microbiennes.

Thymelaea Microphylla

Extrait méthanolique

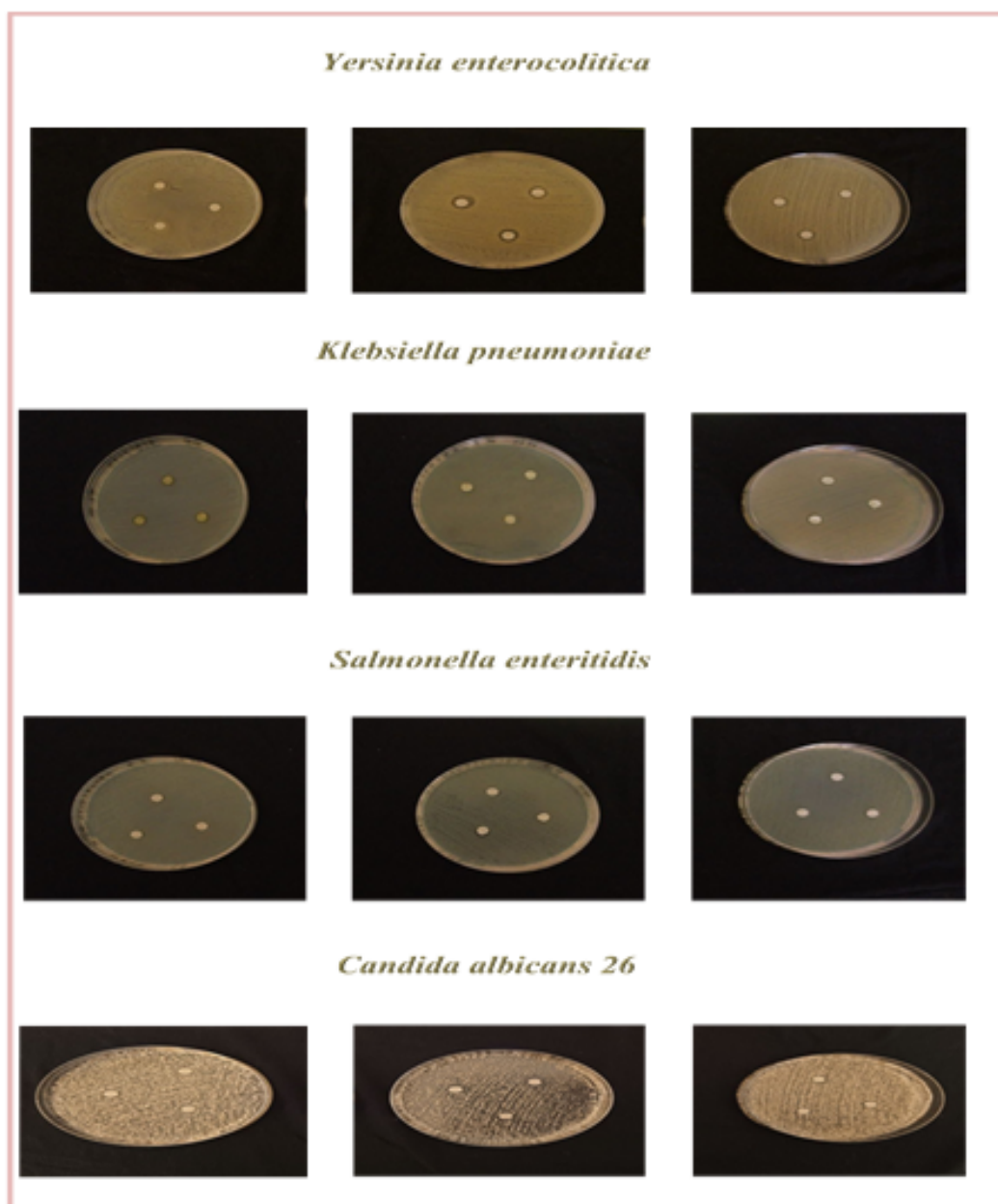


Figure 23 : Effet d'extrait méthanolique de *Thymelaea microphylla* sur la croissance des souches microbiennes.

D'une autre part, l'évaluation de l'activité antifongique des extraits de *T. hirsuta* de la Tunisie contre les espèces *F. graminearum* et *A. alternata* a révélé que seul l'extrait à l'acétate d'éthyle était actif. La meilleure activité a été détectée contre ces deux souche avec une zone d'inhibition de 13 et 15 mm, respectivement. Par conséquent, *T. hirsuta* a montré des activités antibactériennes et antifongiques élevées et pourrait être considérée comme l'une des sources d'antibiotiques naturels à usage médical et d'agents anti-empoisonnements alimentaires contre les agents pathogènes opportunistes (Trigui et al., 2013)

Selon les études, les bactéries Gram (-) présentent une plus grande résistance par rapport aux bactéries Gram (+), en raison de leurs structures complexes et de leur couche externe qui agit comme une barrière contre la pénétration des agents antimicrobiens. Selon (Dehimi, 2011). Nos extraits ont une efficacité sur les bactéries à Gram (-), ce qui signifie qu'ils peuvent dépasser la couche externe de ces bactéries et les inhiber dans leur croissance.

La variabilité de la sensibilité des souches aux extraits peut être attribuée aux différents composants extraits par les divers solvants. Les polyphénols sont la plupart des composés végétaux qui ont une activité antimicrobienne. En ce qui concerne le degré d'oxydation, les polyphénols sont des substances très susceptibles d'auto-oxydation en présence d'oxygène de l'air. Les monomères de flavonoïdes, sont polymérisés lors de cette oxydation, ce qui donne des polymères de poids moléculaire élevé. Toutefois, le poids moléculaire des polyphénols joue un rôle crucial dans leur activité antimicrobienne. Les molécules à faible poids moléculaire ont la capacité de traverser la paroi ou la membrane, contrairement aux molécules à poids moléculaire volumineux. (Karou et al., 2005)

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

Suite à l'analyse de l'activité antimicrobienne de nos extraits par diffusion sur gélose, nous avons tenté de calculer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) en utilisant la méthode de microdilution en milieu liquide.

Une fois la CMI est identifiée, nous avons mesuré la CMB (concentration minimale bactéricide) et la CMF (concentration minimale fongicide) afin d'obtenir les résultats des extraits de plantes sur les souches étudiées et les avons regroupés dans les tableaux et les histogrammes qui suivent.

La relation est inverse entre l'activité antimicrobienne et la valeur de CMI. Plus les valeurs de CMI sont petites, plus les microorganismes sont sensibles et l'extrait est qualifié

comme efficace. En revanche, plus les valeurs de CMI sont élevées, les microorganismes sont résistants, alors l'extrait est considéré comme faible.

Tableau 10: Les concentrations minimales inhibitrices et fongicides des extraits organiques de *Thymelaea hirsuta* en (mg/ml).

	Extraits	Acétate d'éthyle	Méthanol
	Souches	CMI (mg/ml)	
Bactéries	<i>Salmonella enteritidis</i>	8 ,33	8 ,33
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8 ,33	8 ,33
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	8 ,33	8 ,33
Levure	<i>Candida albicans 26</i>	8 ,33	4 ,16

Tableau 11 : Les concentrations minimales inhibitrices et fongicides des extraits organiques de *Thymelaea Microphylla* en (mg/ml).

	Extraits	Acétate d'éthyle	Méthanol
	Souches	CMI (mg/ml)	
Bactéries	<i>Salmonella enteritidis</i>	4 ,16	8 ,33
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4 ,16	8 ,33
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	4 ,16	4 ,16
Levure	<i>Candida albicans 26</i>	2,08	2,08

Figure 24 : Comparaison des valeurs de CMI entre les extraits d'Acétate d'éthyle et Méthanol de *Thymelaea hirsuta*.

Figure 25 : Comparaison des valeurs de CMI entre les extraits d'Acétate d'éthyle et Méthanol de *Thymelaea microphylla*.

D'après les résultats, les concentrations de CMI obtenues diffèrent principalement pour l'extrait méthanolique et l'acétate d'éthyle de l'espèce *Thymelaea microphylla*, avec des valeurs de CMI allant de 2,08 à 8,33 mg/ml.

Pour les souches traitées par les extraits de *T. microphylla*, le pouvoir antimicrobien est fort pour l'extrait d'acétate d'éthyle avec une CMI de 4,16 mg/ml pour toutes les souches bactériennes, et une CMI de 2,08 mg/ml pour la souche *Candida albicans*. La CMI de l'extrait méthanolique est de 2,08 mg/ml pour la souche de *Candida albicans*, et tandis que pour *Klebsiella pneumoniae* et *Salmonella enteritidis*, elle est de 8,33 mg/ml. Pour la souche *Yersinia enterocolitica*, la CMI est de 4,16 mg/ml.

Concernant l'espèce *T. hirsuta*, les souches bactériennes *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae* et *Yersinia enterocolitica* ont une même valeur de CMI (8,33 mg/ml) pour les deux extraits. Ces résultats expriment la résistance de ces souches. Par ailleurs la souche fongique *Candida albicans* 26 a une CMI de 4,16 mg/ml de l'extrait méthanolique, par contre elle a une CMI de 8,33 mg/ml pour l'extrait d'acétate d'éthyle.

En conséquence, nos extraits des espèces *Thymelaea microphylla* et *Thymelaea hirsuta* ont un pouvoir fongique plus qu'antibactérien, vu les faibles valeurs de CMI.

La présence de composés actifs ayant des propriétés antimicrobiennes dans nos échantillons peut expliquer les valeurs différentes observées. Ces valeurs sont généralement influencées par nombreux facteurs tel que : la souche étudiée, les espèces végétales utilisées et la nature des extraits (nature des solvants extracteurs).

Les illustrations ci-dessous présentent les microplaquesensemencées après l'ajout du révélateur INT.

Thymelaea hirsuta

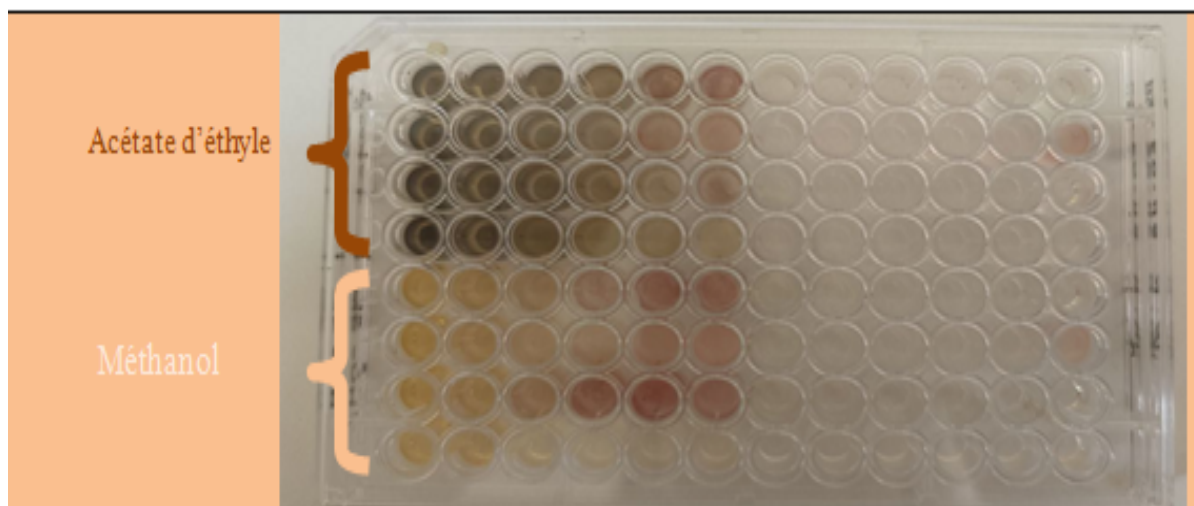


Figure 26 : Détermination de la Concentration minimale inhibitrice des extraits organiques de *Thymelaea hirsuta* vis-à-vis des souches pathogènes par la méthode de micro-dilution.

Thymelaea Microphylla

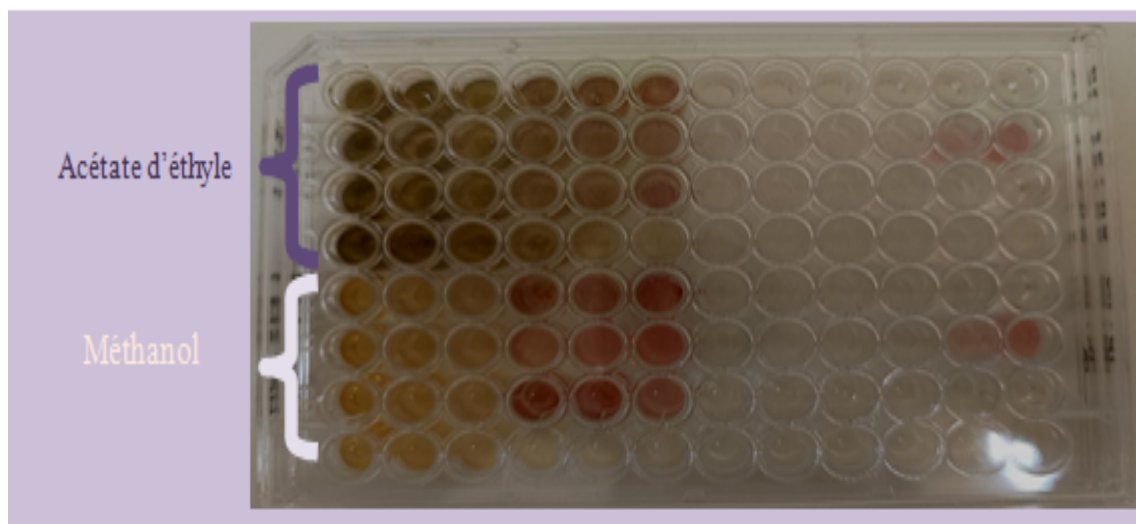


Figure 27 : Détermination de la Concentration minimale inhibitrice des extraits organiques de *Thymelaea microphylla* vis-à-vis des souches pathogènes par la méthode de micro-dilution.

❖ Détermination de CMB

Une valeur de 16.66 mg/ml a été enregistrée pour l'extrait d'acétate d'éthyle de *Thymelaea microphylla* contre la souche *Klebsiella pneumoniae*. On l'a constaté après le repiquage du puit B1. La figure suivante montre une absence de croissance bactérienne.

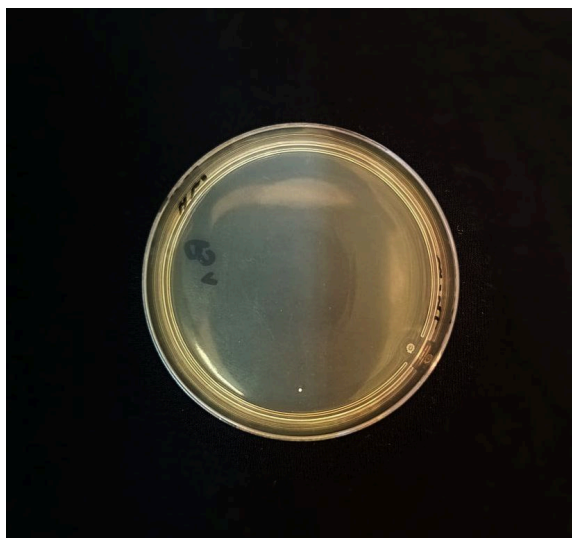


Figure 28 : Photo illustrant l'absence de croissance bactérienne de *Klebsiella pneumoniae* (CMB) suite à l'action de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Thymelaea. microphylla*.

Conclusion
CONCLUSION

Conclusion

La plante médicinale ou aromatique est une plante thérapeutique qui renferme, dans un ou plusieurs de ses organes, une ou plusieurs substances chimiques en faible ou forte concentration, connues sous le nom de substances actives. Ces substances ont la capacité physiologique de soigner une maladie spécifique. Ainsi, elle revêt une grande importance aujourd'hui. Notre travail nous aide à évaluer cette importance grâce à nos plantes récoltées dans les régions arides (*Thymelaea microphylla* de Tiaret, *Thymelaea. hirsuta* de Laghouat).

Après avoir utilisé la technique de l'extraction par Soxhlet avec des solvants de polarité croissante (acétate d'éthyle, méthanol). Les résultats sont plus faibles pour les souches bactériennes *Klebsiella pneumoniae* et *Salmonella enteritidis*. L'espèce de *Thymelaea hirsuta* a un faible effet sur les souches (*Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae* et *Yersinia enterocolitica*), mais il est moyenne pour la souche fongique *Candida albicans* 26. En concluant, les germes examinés présentent une résistance aux déférents extraits de *Thymelaea hirsuta*. En d'autre terme, la comparaison des deux espèces, nous permet de déduire que les extraits de *Thymelaea microphylla* est plus puissante que celui de *Thymelaea hirsuta*.

Les résultats montrent que les extraits de *Thymelaea microphylla* ont une activité antifongique contre *Candida albicans* 26, avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 2,08 mg/ml. Cet extrait d'acétate d'éthyle a également une activité antibactérienne moyenne, avec des CMI de 4,16 mg/ml contre *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae* et *Yersinia enterocolitica*. L'extrait méthanolique a une activité antibactérienne moyenne, avec des CMI allant de 4,16 mg/ml à 8,33 mg/ml contre les mêmes bactéries. Une CMB de valeur 16,66 mg/ml a été observée pour l'extrait d'acétate d'éthyle de *Thymelaea microphylla* contre *Klebsiella. pneumoniae*.

Les résultats obtenus in vitro ne sont qu'un premier pas dans la recherche de substances biologiquement actives d'origine naturelle. , il serait intéressant d'approfondir des études sur *Thymelaea hirsuta* et *Thymelaea microphylla*. D'autres recherches seront nécessaires pour déterminer les molécules responsables de cette activité. Outre la recherche d'un antimicrobien, il est également essentiel de se concentrer sur l'étude de l'activité anticancéreuse, antioxydante et anti-inflammatoire de ces deux plantes, ce qui permet de mettre en valeur les plantes médicinales présentes dans le sud de l'Algérie

Références bibliographique

Références bibliographique

Références bibliographiques

A

1. **Abdullah Sabar Abboud.** (2017). The importance of medicinal plants and their uses in ancient civilizations magazine Al-Adab / Numéro 321 (décembre). PAGE 328.
2. **Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S., & S. Gupta, R.** (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 66(12), 5575-5599.
3. **Agrawal, S.** (2009). Advances in medicinal plants. Oxford Book Company.
4. **Ahmad, I., Aqil, F., & Owais, M. (Eds.).** (2006). Modern phytomedicine: Turning medicinal plants into drugs. John Wiley & Sons.
5. **Alain, K. Y., Cokou, A. D. P., Diane, B., Reine, B. S., Alain, A. G., Felicien, A., & Dominique, S. C. K.** (2018). Métabolites secondaires et activités biologiques des extraits de l'écorce de tronc de *Khaya senegalensis*, une plante à usage vétérinaire récoltée au Bénin. International Journal of Innovation and Applied Studies, 23(4), 441-450.

B

6. **Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M.** (2008). Biological effects of essential oils. Food and Chemical Toxicology, 46: 446-475.
7. **Barbut, F., Guery, B., & Eckert, C.** (2014). Comment traiter une infection digestive à *Clostridium difficile* en 2014?. Médecine Intensive Réanimation, 23(3), 284-297.
8. **Batanoumy, K.** (2005). *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl. Thymelaeaceae. A guide to medicinal plant in north africa. publié par ilucn international malaga, Spain.
9. **Bäumler, A. J., Hargis, B. M., & Tsois, R. M.** (2000). Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. Science, 287(5450), 50-52.
10. **Beaumont, A. J., Edwards, T. J., & Smith, F. R.** (2001). Leaf and bract diversity in Gnidiaceae (Thymelaeaceae): patterns and taxonomic value. Systematics and Geography of Plants, 399-418.
11. **Benhammou, N., Bekkara, F. A., & Coustard, J. M.** (2009). Antioxidant activity of methanolic and water extracts from *Marrubium deserti* (De Noë) and *Thymelaea microphylla* from Algerian Sahara. Advances in Food Sciences, 31(4), 194.
12. **Beniston, M.** (1984). A numerical study of atmospheric mesoscale cellular convection. Dynamics of atmospheres and oceans, 8(3-4), 223-242.

13. **Beniston, W. S. (1984).** Fleurs d'Algérie, édition entreprise nationale de livre.
14. **Bessis, D., & Caumes, É. (2008).** Infections bactériennes systémiques. Manifestations dermatologiques des maladies infectieuses, métaboliques et toxiques: Dermatologie et médecine, vol. 2, 1-8.
15. **Billing J., Sherman P. W. (1998).**Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot. *Q. Rev. Biol*, 73, 3-49.
16. **Blandin ,P. (2010).** Biodiversité, l'avenir du vivant. Bibliothèque Sciences éd. Paris. Page 259.
17. **Borris, R. P., Blaskó, G., & Cordell, G. A. (1988).** Ethnopharmacologic and phytochemical studies of the Thymelaeaceae. *Journal of ethnopharmacology*, 24(1), 41-91.
18. **Boston, MA: Springer US. Miyamae, Y., Villareal, M. O., Abdrabbah, M. B., Isoda, H., & Shigemori, H. (2009).** Hirseins A and B, daphnane diterpenoids from *Thymelaea hirsuta* that inhibit melanogenesis in B16 melanoma cells. *Journal of natural products*, 72(5), 938-941.
19. **Bottone E.J. (1997)** *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev*10: 257–276. *enterocolitica* in clinical, food and environmental samples: a methodological problem. *Clin Microbiol Rev*16: 220–229.
20. **Bottone, E. J. (1999).** *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes and infection*, 1(4), 323-333.
21. **Boukef, M. K. (1986).** Traditional medicine and pharmacopoeia: plants in Tunisian traditional medicine. Ed. ACCT, Paris, 350.
22. **Bounab S., Lograda T., Ramdani M., Chalard P. and Figueredo G (2018).** Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activity of *Thymelaea microphylla* Essential Oil from Algeria. *Der. Pharma Chemica*. 10(5): 36-41. Available on: <https://www.derpharmachemica.com/pharma-chemica/chemical-composition-antioxidant-and-antibacterial-activity-of-thymelaea-microphylla-essential-oil-from-algeria.pdf>
23. **Brocklehurst, T. F., & Lund, B. M. (1990).** The influence of pH, temperature and organic acids on the initiation of growth of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(3), 390-397.

C

24. **Carocho, M., & CFR Ferreira, I. (2013).** The role of phenolic compounds in the fight against cancer—a review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 13(8), 1236-1258.
25. **Cornelis, G., Vanootegem, J. C., & Sluiter, C. (1987).** Transcription of the yop regulon from *Y. enterocolitica* requires trans acting pYV and chromosomal genes. *Microbial pathogenesis*, 2(5), 367-379.
26. **Cowan M.M. (1999).** Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4), 564-582.

D

27. **Dehimi, K.** (2011). Etude de quelques propriétés des extraits de *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. Mémoire de magister . Biotechnologie, Biskra: Université Mohamed Khider.
28. **Diogo, C. V., Félix, L., Vilela, S., Burgeiro, A., Barbosa, I. A., Carvalho, M. J., ... & Peixoto, F. P.** (2009). Mitochondrial toxicity of the phytochemicals daphnetoxin and daphnoretin–Relevance for possible anti-cancer application. *Toxicology in Vitro*, 23(5), 772-779.
29. **Djenadi Fouzia.** (2011). Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne du genévrier (*Juniperus phoenicea*): essai des huiles essentielles et composés phénoliques [en ligne]. Mémoire de Master en Biochimie Appliquée. Béjaia : Université A Mira. Disponible sur : http://www.memoireonline.com/01/13/6764/m_Contribution--l-etude-de-l-activite-antimicrobienne-dugenevrierJuniperus-phoenicea--essai-d4.html (consulté le : 20.02.2015).
30. **Dohou, R., Yamni, K., Tahrouch, S., Hassani, L. I., Badoc, A., & Gmira, N.** (2003). Screening phytochimique d'une endémique iberomarocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bulletin-Société de Pharmacie de Bordeaux*, 142(1/4), 61-78.
31. **Dommée, B., Bascamano, A., Denelle, N., Bompar, J. L., & Thompson, J. D.** (1995). Sexual tetramorphism in *Thymelaea hirsuta* (Thymelaeaceae): morph ratios in open-pollinated progeny. *American Journal of Botany*, 82(6), 734-740.
32. **Dommée, B., Denelle, N., & Rioux, J. A.** (1984). Proportions des sexes dans deux populations françaises de *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl. *Bulletin de la Société Botanique de France. Lettres Botaniques*, 131(3), 201-205.

E

33. **E.P. Fox, C.J. Nabil .** (2013). The role of *Candida albicans* biofilms in human disease L.A. Dietrich, T.S. Friedmann (Eds.), *Candida albicans* symptoms, causes and treatment options, Nova Science Publishers, pp. 1-24
34. **El Amrani, F., Rhallab, A., Alaoui, T., El Badaoui, K., & Chakir, S.** (2009). Hypoglycaemic effect of *Thymelaea hirsuta* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Plants Res*, 3, 625-629.
35. **El-Batanouny, M., & Chou, F. C.** (2005). Structure and lattice dynamics of $\text{Sr}_2\text{CuO}_2\text{Cl}_2(001)$ studied by helium-atom scattering. *Physical Review B*, 72(8), 085409.
36. **El-Houiti, F.** (2010). Composition chimique, activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles de *Rhanterium adpressum*. Département de biologie, Université AMAR TELIDJI – LAGHOUAT: 118.
37. **El-Kolli M,** (2017). Structure et activité des substances naturelles : principes et applications. Cours.Univ Ferhat Abbas.Sétif.

38. **Ellermeier, C. D., & Schlauch, J. M.** (2006). The Genus *Salmonella*: PROTEOBACTERIA: GAMMA SUBCLASS.

F

39. **Ferrari, J.** (2002). Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles: "Gnidia involucrata" Steud. ex A. Rich (Doctoral dissertation, Université de Lausanne, Faculté des sciences).
40. **Fournier P.** (1999) a. Les plantes médicinales et vénéneuses de France. Tome II. Ed. Connaissance et mémoires Européennes.; p. 47-56.
41. **Fournier P.** (1999) b. Les plantes médicinales et vénéneuses de France, Tome III. Ed. Connaissance et mémoires Européennes.; p. 176-77.

G

42. **Ganguly, S., & Mitchell, A. P.** (2011). Mucosal biofilms of *Candida albicans*. Current opinion in microbiology, 14(4), 380-385.
43. **Garcia-Ruiz A., Bartolomé B., Martinez-Rodriguez A.J., Pueyo E., Martin-Alvarez P.J., Moreno-Arribas M.V.** (2008). Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. Food Control, 19, 835–841.
44. **Gard, A. M. B.** (1998). An ordinal classification for the families of flowering plants.
45. **Gelfand, M.** (1985). The traditional medical practitioner in Zimbabwe: his principles of practice and pharmacopoeia.
46. **Ghanem, H., Haba, H., Marcourt, L., Benkhaled, M., & Wolfender, J. L.** (2014). Microphynolides A and B, new spiro- γ -lactone glycosides from *Thymelaea microphylla*. Natural Product Research, 28(20), 1732-1738.

H

47. **Heywood ,VH.** (1996). Les Plantes à Fleurs. Editions Nathan, Paris.; p. 159-60.
48. **Hota, D.** (2007). Bioactive Medicinal Plants. New Delhi: Gene-Tech Books.

I

49. **Iwu, M. M.** (1993). Handbook of African Medicinal Plants. CRC. Press Boca Raton. Ann Arbor Florida USA.

J

50. **Jamkhande, P. G., Ajgunde, B. R., & Jadge, D. R.** (2017). *Annona cherimola* Mill.(Custard apple): A review on its plant profile, nutritional values, traditional claims and ethnomedicinal properties. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 17, 189-201.
51. **Jeanmonod, D., & Gamisans, J.** (2007). *Flora Corsica*. Édisud. Aix-en-Provence. France. G. Bacchetta & al, 86, 1999. Pausas, J. G., Bonet, A., Maestre, F. T., & Climent, A. (2006). The role of the perch effect on the nucleation process in Mediterranean semi-arid oldfields. *Acta Oecologica*, 29(3), 346-352.
52. **Julien, F.** (2002). *Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles: Gnidia involucrata Steud. ex A. Rich* (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat, Lausanne).
53. **Jürgen R., Paul S., Ulrike S., and Reinhard S.**(2009). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties an-overview. *ForschKomplementmed*, 16 , 79–90.

K

54. **Kabbaj, F. Z., Lai, D., Meddah, B., Altenbach, H. J., Cherrah, Y., Proksch, P., ... & Debbab, A.** (2013). Chemical constituents from aerial parts of *Thymelaea lythroides*. *Biochemical systematics and ecology*, 51, 153-155.
55. **Karou, D., Dicko, M., Simporé, J., Yameogo, S., Sanon, S., & Traoré, A.** (2005). Activités antioxydantes et entimicrobiennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. CRSBAN, Université Ouagadougou.
56. **Kerbab, K., Mekhelfi, T., Zaiter, L., Benayache, S., Benayache, F., Picerno, P., ... & Rastrelli, L.** (2015). Chemical composition and antioxidant activity of a polar extract of *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. *Natural product research*, 29(7), 671-675.
57. **Kokwaro, G. O., Ismail, S., Glazier, A. P., Ward, S. A., & Edwards, G.** (1993). Effect of malaria infection and endotoxin-induced fever on the metabolism of antipyrine and metronidazole in the rat. *Biochemical pharmacology*, 45(6), 1243-1249.

L

58. **Limonier, A. S.** (2018). *La phytothérapie de demain: les plantes médicinales au cœur de la pharmacie*.

M

59. **Mfengwana, P. M. A. H., & Mashele, S. S.** (2016). Antimicrobial Activity Screening of *Philenoptera violacea* (Klotzsch) schrire and *Xanthocercis zambesiaca* (Baker) Dumaz-Le-Grand.
60. **Mekhelfi, T., Kerbab, K., Guella, G., Zaiter, L., Benatache, S., & Benayache, F.** (2014). Antioxidant and antimicrobial activities of an endemic desert species *Thymelea microphylla*. *Coss. et Dur. Pharm Lett*, 6, 152-6.
61. **Miller, J. S.** (2001). The global importance of plants as sources of medicines and the future potential of Chinese plants. In *Drug discovery and traditional chinese medicine: Science, regulation, and globalization* (pp. 33-42).

N

62. **Najjaa, H., Zerria, K., Fattouch, S., Ammar, E., & Neffati, M.** (2011). Antioxidant and antimicrobial activities of *Allium roseum* L. "Lazoul," a wild edible endemic species in North Africa. *International journal of food properties*, 14(2), 371-380.
63. **Niewerth, M., & Korting, H. C.** (2002). *Candida albicans* and the principle of opportunism. An essay. *Mycoses*, 45(7-8), 253-258.
64. **Noman, L., Oke-Altuntas, F., Zellagui, A., Sahin Yaglioglu, A., Demirtas, I., M Cardoso, S., ... & Rhouati, S.** (2017). A novel benzimidazole and other constituents with antiproliferative and antioxidant properties from *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. *Natural product research*, 31(17), 2032-2041.

O

65. **OMS**, (1978). *the promotion and developement of Traditional Medcicine*, rapport technque d'une réunion de l'OMS, série n°622, Organisation mondiale pour la santé, Genève,

R

66. **Renner, S. S.** (2001). Erratum: How common is heterodichogamy?(Trends in Ecology Evolution 16 (595-597) PII: S0169534701023771). *Trends in Ecology and Evolution*, 16(12), 721.
67. **Rizk, A. M., Hammouda, F. M., & Ismail, S. I.** (1974). PHYTOCHEMICAL INVESTIGATION OF *THYMELEA HIRSUTA*. *Planta Medica*, 26(08), 346-358.

S

68. **Saltmarsh, M., Crozier, A., Radcliffe, B., & Goldberg, G.** (2003). Plants: Diet and Health. Goldberg, G., Ed, 107-133.
69. **Scalbert A.** (1991). Antibacterial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30, 3875-3883.
70. **Somon, E.** (1987). Arbres, arbustes et arbrisseaux en Algérie. Office des publications universitaires.
71. **STERN, N. J., Pierson, M. D., & Kotula, A. W.** (1980). Effects of pH and sodium chloride on *Yersinia enterocolitica* growth at room and refrigeration temperatures. *Journal of Food Science*, 45(1), 64-67.
72. **Steve Yan, S., Pendrak, M. L., Abela-Ridder, B., Punderson, J. W., Fedorko, D. P., & Foley, S. L.** (2004). An overview of Salmonella typing. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 4(3), 189–204.
73. **Svoboda K., Svoboda T.** (2000). Secretory structures of aromatic and medicinal plants. Ed: Microscopix publications, P 7-12.

T

74. **Trigui, M., Hsouna, A. B., Tounsi, S., & Jaoua, S.** (2013). Chemical composition and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian *Thymelaea hirsuta* with special reference to its mode of action. *Industrial Crops and Products*, 41, 150-157.
75. **Toty A. A., Guessennd N., Bahi C., Kra A. M., Otokore D. A., Dosso M.** (2013). Évaluation in-vitro de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de *Harunganamadagascariensis* sur la croissance de souches multi-résistantes. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 82, 12 – 21.

Q

76. **Quézel, P., & Santa, S.** (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.

Site web

1. <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=21923>
2. https://www.researchgate.net/figure/Image-en-microscopie-electronique-fond-noir-dune-Salmonella-Enteritidis-flagellee-A_fig1_340973434
3. <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/24/17227>
4. https://www.researchgate.net/figure/a-Scanning-electron-microscope-b-light-microscope-100-magnification-filament-of_fig3_365405265