

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي 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 des produits naturels

THEME

**Activité antimicrobienne des extraits naturels des
trois espèces *Marrubium vulgare*, *Inonotus hispidus*
et *Punica granatum L.***

Présenté par : AID Karima DJENAOUI Fatima Zohra

Devant le jury :

Président(e) : Dr BOUSSOUSSA Hadjer (MCB)

Rapporteur : Dr BENAROUS Khedidja (MCA)

Co-Rapporteur : M^{me} GACEMI Safia (MAB)

Examinatrice : M^{elle} BENABED Houda

Soutenu publiquement le :Mai 2017.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

À mes chers parents qui m'ont éclairé le chemin de la vie par leur grand soutien et leurs encouragements.

J'ai une pensée particulière :

À ma chère sœur Amîna qui était mon ange gardienne dès mon enfance,

Mes sœurs : Meriem, Souad, Zîneb,

À mes frères : Mohammed, Rachîd, Hanachi, Belkacem

À mes nièces et mes neveux,

À toute ma famille,

Et surtout ma chère binôme Fatîma Zohra,

À mes chères amies Naïma, Imane, Fatîma, Nour, Abîr,

Mes camarades de promotion.

Tous mes enseignants

Tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire.

Et enfin à tous ceux que ma mémoire un peu distraite aura pu oublier...

KARIMA

Dédicace

Je dédie ce mémoire

À mes parents pour leur amour inestimable, leur confiance, leur soutien, leurs sacrifices et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer.

À ma chère Anfel, ma plus grande source de bonheur, j'espère que la vie lui réserve le meilleur.

À mon ange Hadil, la prunelle de mes yeux, Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.

À mes frères : Tarek, Bilal, ainsi qu'à mes sœurs : Iman, Soumia, Hadjer, Sara, pour leur tendresse, leur complicité et leur présence malgré la distance qui nous sépare.

À mes nièces et neveux : Ziad, Israa, Ihsan, Sadjed, Alzahraa.

À ma chère binôme Karima pour sa douceur et sa gentillesse.

À toute ma famille ainsi qu'à mes amis.

À tous mes enseignants.

FATIMA ZOÛRA

Remerciements

A DIEU tout puissant et miséricordieux, pour nous avoir donné courage, patience et volonté d'arriver jusque-là.

Un grand merci à nos parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience.

Nos Remerciements les plus sincères à notre promotrice Dr. BENAROUS Khedidja, qui nous a permis de réaliser ce travail. Nous ne saurons jamais oublier sa disponibilité, son assistance et ses conseils judicieux.

Nos remerciements également seront adressés à notre Co-promotrice M^{me} GACEMI Safia, pour être toujours disponible, pour nous avoir guidé et aidé lors de notre pratique.

Nous remercions également tous les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail.

À tous nos chers professeurs et enseignants, Nous adressons nos profonds remerciements à nos familles et nos chères amis pour l'aide et les encouragements qu'ils ont apporté le long de nos études.

Et à tous ceux qui ont contribué un jour à notre éducation, et toutes les personnes qui ont contribué à l'obtention de ce diplôme.

RÉSUMÉ

Les composés phénoliques et les alcaloïdes sont des molécules bioactives, qui présentent un sujet d'intérêt scientifique grâce à leurs activités biologiques. Dans ce travail, les extraits phénoliques des feuilles de *Marrubium vulgare* et ceux du champignon *Inonotus hispidus*, les alcaloïdes de fruits *Punica granatum L*, ainsi que les trois molécules pures harmaline, hispidine, quercétine ont été investigués pour leurs activités antimicrobiennes *in vitro*. Le pouvoir antimicrobien a été testé suivant la méthode de diffusion sur disque contre quatre souches microbiennes à savoir les bactéries *Staphylococcus aureus* (Gram +), *Escherichia coli* (Gram -) et la levure *Candida albicans* (IPA 200 et IPA 400). Les résultats obtenus ont révélé que ces extraits ayant montré une faible activité antimicrobienne.

Mots clés : composés phénoliques, alcaloïdes, *Marrubium vulgare*, *Inonotus hispidus*, *Punica granatum L*, harmaline, hispidine, quercétine, activité antimicrobienne.

ABSTRACT

Phenolic compounds and alkaloids are bioactive molecules exhibiting a lot of scientific attention due to their multiple biological activities. In this study, phenolic extracts of *Marrubium vulgare* leaves and *Inonotus hispidus* fungus with alkaloids of *Punica granatum L* fruits, indeed of three pure molecules hispidin, harmaline, quercetine were investigated for their antimicrobial activities *in vitro*. Antimicrobial activity of these extracts has been tested using agar diffusion method of four microbial strains: bacterial strains *Staphylococcus aureus* (Gram +), *Escherichia coli* (Gram -), yeast *Candida albicans* (IPA 200 et IPA 400). Results revealed that these extracts have a weak activity against these species.

Key words: phenolic compounds, alkaloids, *Marrubium vulgare*, *Inonotus hispidus*, *Punica granatum L*, harmaline, hispidin, quercetine, antimicrobial activity.

ملخص

تعتبر دراسة المركبات الفينولية والقلويدات للنباتات الطبية موضوع ذو أهمية علمية، لما تحتويه من مركبات فعالة ذات نشاط بيولوجي. نهتم في هذا العمل بدراسة المستخلصات الفينولية لأوراق نبتة المريوت وفطر سرّة البطم والمركبات القلويدية لثمار الرمان، وثلاث جزيئات نقية: حرملين، هسبدين، كيرسيتين، كما ندرس أيضا خصائصها المضادة للميكروبات.

تمت دراسة النشاط المضاد للجراثيم لهذه المستخلصات بواسطة طريقة الانتشار على الأغار (في الأقراص) باستخدام أربع أنواع من الميكروبات (بكتيريا وفطريات): *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. أظهرت النتائج بأن هذه المستخلصات تملك نشاط ضعيف مضاد لهذه الأنواع.

الكلمات المفتاحية: المركبات الفينولية، القلويدات، المريوت، سرّة البطم، الرمان، حرملين، هسبدين، كيرسيتين، النشاط المضاد للميكروبات.

Liste des abréviations

Ac-O-Et :	Acétate d'éthyle
ATCC :	American Type culture Collection
BN :	Bouillon nutritif
DCM :	Dichlorométhane
DMSO :	DiMéthylSulfOxyde.
DO :	Densité Optique
E 15 :	Erythromycine 15µg
Fluc:	Fluconazol
Gram +:	Gram positif
Gram - :	Gram positif
GYP :	gélose yeast peptone
h :	heure
I h :	<i>Inonotus hispidus</i>
IPA :	Institut Pasteur d'Alger
L2 :	lincomycine 2 µg
MH :	Mueller Hinton
Mvp :	<i>Marrubium vulgare</i> poudre
Mvct :	<i>Marrubium vulgare</i> cotonné
OXA 1:	Oxacilline 1 µg
P 10 :	Pénicilline 10 µg
S10 :	Streptomycine 10 µg
UFC :	Unité formant colonie
µl :	Microlitre
VA 30 :	Vancomycine 30

Liste des figures

Figure 1. Classification générales des composés phénoliques (Macheix et al., 2005).....	3
Figure 2. Le Marrube blanc, <i>Marrubium vulgare</i> et sa classification (Benarous, 2010).....	7
Figure 3. Le polypore hérissé, <i>Inonotus hispidus</i> et leur classification.....	8
Figure 4. Grenadier, <i>Punica granatum</i> L et leur classification	8
Figure 5. Procédure d'extraction des composés phénoliques.....	11
Figure 6. Procédure d'extraction par fractionnement solide-liquide.....	12
Figure 7. Procédure de l'extraction des alcaloïdes de <i>Punica granatum</i>	13
Figure 8. Photos illustrant l'activité antifongique des extraits sur la souche <i>C. albicans</i> IPA 200.	18
Figure 9. Photos illustrant l'activité antifongique des extraits sur la souche <i>C. albicans</i> IPA 400.	18
Figure 10. Photos illustrant l'antifongigramme de la souche de <i>C. albicans</i> IPA 200.	19
Figure 11. Photos illustrant l'antifongigramme de la souche de <i>C. albicans</i> IPA 400.	19
Figure 12. Comparaison l'activité antibactérienne de nos extraits avec les extraits de deux plantes. .	22
Figure 13. Photos illustrant l'activité antibactérienne des extraits sur la souche <i>S. aureus</i>	25
Figure 14. Photos illustrant l'activité antibactérienne des extraits sur la souche <i>E. coli</i>	25
Figure 15. Photos illustrant l'antibiogramme de la souche <i>S. aureus</i>	26
Figure 16. Photos illustrant l'antibiogramme de la souche <i>E. coli</i>	26

Liste des tableaux

Tableau 1. Pathogénicité des souches microbiennes utilisées.....	9
Tableau 2. Matériel chimiques.....	10
Tableau 3. Milieux de cultures utilisés pour les bactéries et la levure.....	10
Tableau 4. Diamètres des zones d'inhibition des extraits et des molécules pures sur les souches de <i>C. albicans</i>	15
Tableau 5. Diamètres des zones d'inhibition sur <i>C. albicans</i> par rapport à différentes références bibliographiques.....	16
Tableau 6. Les diamètres des zones d'inhibition des extraits et des molécules pures sur les souches de <i>S. aureus</i> et <i>E. coli</i>	20
Tableau 7. Diamètres des zones d'inhibition sur <i>S. aureus</i> par rapport à différentes références bibliographiques.....	23
Tableau 8. Diamètres des zones d'inhibition sur <i>E. coli</i> par rapport à différentes références bibliographiques.....	24

Table des matières

RÉSUMÉ	v
Liste des abréviations	vi
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	vii
INTRODUCTION	1
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	2
1. Généralités sur les plantes médicinales	2
2. Métabolites secondaires	2
1.1. Phénols et polyphénols	2
2.2. Alcaloïdes	3
2.3. Huiles essentielles	4
3. Activité antimicrobienne	4
3.1. Antibiotiques	5
3.2. Méthodes d'étude de l'activité antimicrobienne	5
MATERIELS ET METHODES	7
1. Matériel biologique	7
1.1. Plantes médicinales	7
1.2. Souches microbiennes	9
2. Matériel chimiques et milieux de culture	9
2.1. Matériel chimiques	9
2.2. Milieux de culture	10
3. Extraction des métabolites secondaires	10
3.1. Extraction des composés phénoliques par fractionnement liquide-liquide	10
3.2. Extraction des métabolites par un fractionnement solide –liquide	11
3.2. Extraction des alcaloïdes par la méthode de Ross et Rain (1977)	12
4. Évaluation de l'activité antimicrobienne	13
4.1. Préparation des cultures microbiennes	13
4.2. Ensemencement	13
4.3. Préparation des dilutions	14
4.4. Méthode de diffusion sur gélose	14
4.5. Test d'antibiogramme et d'antifongigramme	14
RESULTATS ET DISCUSSION	14
1. Résultats de l'activité antifongique par la méthode de diffusion sur gélose	14

2. Résultats de l'activité antibactérienne.....	20
CONCLUSION GENERALE	27
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	28
ANNEXES.....	34

INTRODUCTION

L'homme a longtemps eu recours à des remèdes traditionnels à base de plantes (tisanes, poudres, décoction) pour qu'il se soigne, administrés par inhalations, cataplasmes, massages ou encore par voie orale appelé aujourd'hui la phytothérapie. Même durant les guerres de l'époque actuelle, les plantes ont servi comme première source de médicaments pour les hommes, et elles ont continué à fournir à l'humanité, des remèdes thérapeutiques nouveaux et originaux jusqu'à aujourd'hui, l'intérêt des études a mené à la caractérisation et à l'identification de molécules majeures, et à l'isolation de composés chimiques actifs d'une importance thérapeutique incontestable (Leduc et *al.*, 2006).

La phytothérapie est une thérapeutique alternative ou parallèle dans beaucoup de maladies aiguës et chroniques. Elle connaît un regain d'intérêt dans de nombreux pays à travers le monde, notamment dans les pays du Maghreb. En effet, un grand nombre de plantes sont utilisées en médecine traditionnelle en Algérie pour le traitement de diverses pathologies (Lamba et *al.*, 2000).

En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voir des milliers de composés naturels bioactifs appelés : les métabolites secondaires. Ces derniers sont par la suite accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante (Boudjouref, 2011).

Ces métabolites sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles : Les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes (Boudjouref, 2011).

A l'heure actuelle, Les plantes sont également utilisées pour leur propriété antibactérienne et antifongique. Cependant, en tant que sources de médicaments, les plantes restent encore sous exploitées surtout dans le domaine de la microbiologie médicale. Un grand nombre de ses composés sont de très bons agents antifongiques (Mohammedi, 2013).

Le mémoire commencera par une introduction générale. Second, rappels bibliographiques où nous avons apporté à abrégés sur les métabolites secondaire et activité antimicrobienne ensuite, nous avons décrit tous le matériel et les méthodes utilisés et nous avons étudié l'activité antimicrobienne des extraits phénoliques des feuilles de *Marrubium vulgare* et le champignon d'*Inonotus hispidus* et les alcaloïdes de fruits *Punica granatum L* et les molécules pures harmaline, hispidine et quercétine sur la candidose avec 2 souches *Candida albicans* et des souches bactériennes : *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, suivies des résultats et leur discussion et se terminera par une conclusion générale.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1. Généralités sur les plantes médicinales

Les plantes médicinales ont été utilisées comme une source importante de médicaments pour des milliers d'années dans l'histoire humaine, et même aujourd'hui, ils constituent une base de la pratique de la médecine traditionnelle systématique dans plusieurs pays partout dans le monde.

Aujourd'hui on observe à nouveau un regain d'intérêt pour la phytothérapie, avec plus de cinq cents produits promus comme remèdes inoffensifs dans de multiples indications comme la constipation, la fatigue, l'obésité et des affections cutanées. Les plantes médicinales, tirent leurs effets thérapeutiques grâce à leur richesse de ce qu'on appelle « métabolites secondaires » (Pinto et *al.*, 2002).

2. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des composés non structuraux, localisés dans certaines parties des plantes. Généralement, de faibles poids moléculaires, leurs structures très variables dérivent des métabolites primaires et ne semblent pas essentiels à la croissance végétale (Dahl., 2003)

Les métabolites secondaires sont reconnus par leurs activités biologiques nombreuses qui comprennent des activités antibactériennes, anticancéreuses, antifongiques, analgésiques, anti-inflammatoires, diurétiques gastro- intestinales, antioxydants (Cuendet et *al.*, 1999).

Ces substances, qui n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de la plante (Guignard., 1996; Hanson., 2003).

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

- Phénols et polyphénols ;
- Alcaloïdes ;
- Huiles essentielles.

1.1. Phénols et polyphénols

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

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

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes (figure 1).

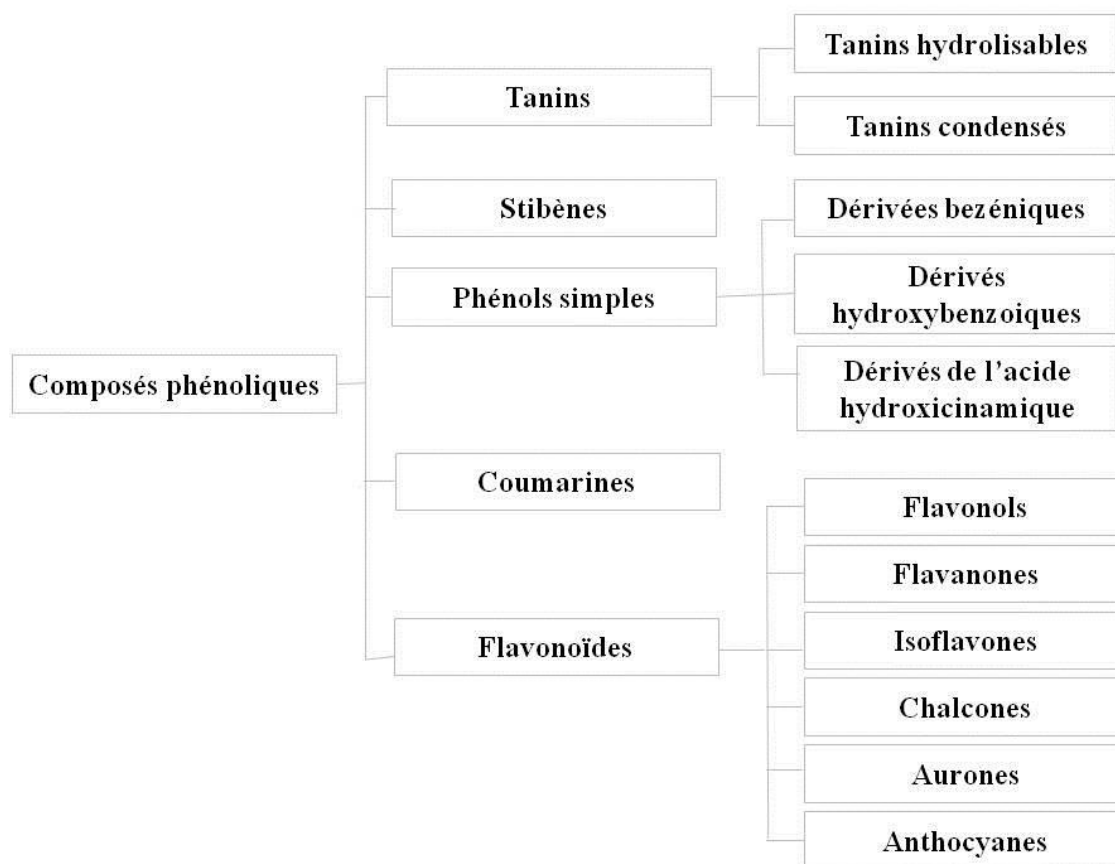


Figure 1. Classification générales des composés phénoliques (Macheix et *al.*, 2005).

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobienne des polyphénols. A l'heure actuelle, cet effet est certain et démontré par de nombreuses recherches expérimentales. Les études du pouvoir inhibiteur des flavonoïdes sur la croissance bactérienne ont démontré que de nombreux composés flavoniques sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif (*Escherichia coli*) et Gram positif (*Staphylococcus aureus*) (Ulanowska et *al.*, 2007).

2.2. Alcaloïdes

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

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

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

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

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

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

2.3. Huiles essentielles

Ce sont des substances odorantes, concentrées, obtenues à partir de plantes par entraînement à la vapeur d'eau ou expression. Le terme « huile essentielle » a été inventé au 16^{ème} siècle par le médecin suisse Parascelsus Von Hohenheim pour désigner le composé actif d'un remède naturel (Oussalah et *al.*, 2007).

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne. Dans les domaines phytosanitaire et agro-alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs sont employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires, respectivement (Ochoa., 2005).

3. Activité antimicrobienne

Dès la naissance l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux. Pour résister à ces micro-organismes de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut schématiquement en distinguer 3 groupes : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise (Kaufmann., 1997).

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux

médicaments à base des plantes (Billing et *al.*, 1998).

3.1. Antibiotiques

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques (Bergogne-Berezin et *al.*, 1995).

3.2. Méthodes d'étude de l'activité antimicrobienne

Les méthodes d'étude des activités antibactérienne et antifongique sont très nombreuses. Dans notre cas nous ferons allusion aux méthodes *in vitro*.

A l'heure actuelle, l'activité antimicrobienne *in vitro* d'une substance donnée peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, les plus utilisées sont :

a. Méthode de diffusion sur gélose

Cette méthode consiste à la détermination de l'activité anti microbienne d'une substance ou d'un extrait agissant sur un microorganisme.

Les solutions d'extraits sont déposés sur des petits disques en papier de dimensions bien déterminées, ces disques sont placés en suite sur de la gélose préalablementensemencée en surface à l'aide d'une suspension microbienne.

Après une incubation de 18 à 24 heures, les zones d'activités apparaissent circulaires sur le fond opaque de la gélose, la lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (Chenni., 2010).

b. Méthode de diffusion en puits

C'est une méthode qui a été proposée par Cooper et Woodman en 1946, et reprise par la suite par Schroder et Messing eb 1949, elle assure une diffusion radiale de l'extrait à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable. La méthode consistait à découper un trou circulaire vertical dans la gélose et à y verser une solution de l'extrait de concentration connue. L'extrait diffus radialement créait une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne (Dorman et Deans., 2000).

c. Antibiogramme

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans un but épidémiologique ou thérapeutique. Un antibiogramme permet donc de tester sur milieu de culture, l'action de molécules antibiotiques sur une souche bactérienne. Il donnera des indications sur l'efficacité in vitro de ces antibiotiques (Daas., 2009).

MATERIELS ET METHODES

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie, département de biologie, université de Laghouat. Le présent travail a pour objectif d'évaluer l'activité antimicrobienne des composés phénoliques et alcaloïdes de quelques plantes médicinales locales et trois molécules pures. Le matériel et les méthodes expérimentales utilisés dans cette étude, sont décrits comme suit.

1. Matériel biologique

1.1. Plantes médicinales

Pour notre étude, nous avons utilisé trois espèces de plantes médicinales, qui sont : *Marrubium vulgare*, *Inonotus hispidus* et *Punica granatum L.*

a. *Marrubium vulgare*

Le *marrubium*, un genre de plantes à fleurs dans la famille des *Lamiaceae*s, comprend environ 40 espèces. (Meyre-Silva et Cechinel Filho., 2010). *Marrubium vulgare L.* une herbe vivace, est indigène en Europe, en Méditerranée et en Asie (Mabberley., 1997).

M. vulgare est utilisé en médecine traditionnelle pour traiter les infections respiratoires, y compris la bronchite, la toux et l'asthme (Knöess et Zapp., 1998) On prétend que la plante possède une activité hypoglycémique (Roman et al., 1992), analgésique (De Souza et al., 1998), anti-inflammatoire (Sahpaz et al., 2002), antioxydante (Weel et al., 1999) et des activités antibactériennes (Masoodi et al., 2008).



Règne : *Plante*

Famille : *Labiées (Lamiacées)*

Genre : *Marrubium*

Espèce : *Marrubium vulgare*

Appellations locales : Marriouet, مريوت

Partie utilisée : Feuilles

Figure 2. Le Marrube blanc, *Marrubium vulgare* et sa classification (Benarous, 2010).

b. *Inonotus hispidus*

Inonotus hispidus (Basidiomycetes), communément appelé «Sorret el btoum», est un champignon parasite vivant de préférence sur une variété d'arbres à feuilles caduques et se trouve sur *Pistacia atlantica* Arbre en Algérie. (Nasser Ali et al., 1996; Benarous et al.,2013).

Ce champignon est utilisé dans la médecine folklorique pour le traitement de l'ulcère gastrique (Yousfi et *al.*, 2009) et il est connu de son activité antivirale (Awadh Ali et *al.*, 2003).



Règne : *Fungi*

Famille : *Basidiomycètes*

Genre : *Inonotus*

Espèce : *Inonotus hispidus*

Appellations locales : سرّة البطم, Sorret Elbtoum,

Figure 3. Le polypore hérissé, *Inonotus hispidus* et leur classification.

c. *Punica granatum L*

Punica granatum L. est un petit arbre de la famille *Punicaceae*. C'est un arbuste se développe également dans les régions climatiques chaudes des Amériques et d'autres parties du monde (Vidal et *al.*, 2003).

En plus de l'utilisation de ses fruits (grenade), *Punica Granatum* est également utilisé dans plusieurs systèmes de médecine traditionnelle. Les études précédemment rapportées ont révélé plusieurs activités biologiques telles que les anti-cancérigènes, antimicrobiens, antioxydants et antiviraux (Cassano et *al.*, 2011 ; Malik et *al.*, 2005 ; Turfan et *al.*, 2011).



Règne : Plante

Famille : *Punicaceae*

Genre : *Punica*

Espèce : *Punica granatum L.*

Appellations locales : الرمان

Partie utilisée : Fruits.

Figure 4. Grenadier, *Punica granatum L* et leur classification

1.2. Souches microbiennes

Pour l'étude de l'activité antimicrobienne, notre choix a été porté sur deux souches bactériennes et deux fongiques qui sont pathogènes (tableau 1). Les souches fongiques de *Candida albicans* (IPA200, IPA400) isolées et identifiées par l'Institut Pasteur d'Alger. Les deux souches bactériennes de référence ont été obtenues à partir du Laboratoire Vétérinaire Régionale Laghouat (LVRL).

Tableau 1. Pathogénicité des souches microbiennes utilisées.

Souches microbiennes	Codes	Pathogénicité
<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram +)	ATCC 25923	Intoxication alimentaire, nausées, sévères, crampes, vomissement, diarrhée (1-2 j). <u>Infection superficielle</u> : figurent l'impétigo, la folliculite, les abcès, les furoncles et les lacérations infectées. <u>Infection profondes</u> : la méningite, l'arthrite septique, la pneumonie et l'ostéomyélite.
<i>Escherichia coli</i> (Gram -)	ATCC 25922	Infection intestinale, diarrhée liquide, fièvre, crampes abdominale vomissement, acideose.
<i>Candida albicans</i> (Levure)	IPA 200, 400	Il s'agit d'un pathogène opportuniste très polyvalent : il peut être responsable d'infection superficielle cutanée, causer un érythème fessier chez les nouveau-nés, une bronchopneumonie et/ ou une pneumonie, une vaginite, une balanite ou être responsable d'infection profondes.

2. Matériel chimiques et milieux de culture

2.1. Matériel chimiques

Les produits chimiques utilisés dans ce travail, sont mentionnés dans le tableau 2.

Tableau 2. Matériel chimiques.

Molécules pures	Harmaline : isolée à partir de <i>Peganum harmala</i> (Benarous et al., 2015).
	Hispidine : isolée à partir d' <i>Inonotus hispidus</i> (Benarous et al., 2015).
	Quercétine : à partir de Sigma Aldrich.
Antibiotiques	Vacomycine (VA 30)
	Oxacilline (OXA 1)
	Pénicilline (P 10)
	Lincomycine (2)
	Streptomycine (10)
Antifongiques	Erythromycine (E 15)
	Fluconazole gélule 150 mg
	Fluconazole gélule 50 mg (médicaments commercialisés)
DMSO	A partir de Fluka.
Chlorure de sodium	A partir de Fluka.

2.2. Milieux de culture

Les milieux de culture et les réactifs nécessaires pour l'étude microbiologique sont cités dans le tableau 3 (Voir les compositions en Annexe 1).

Tableau 3. Milieux de cultures utilisés pour les bactéries et la levure

Milieux de culture	Utilisation
Gelose Sabouraud	Pour les levures
Milieu GYP	
Muller-hinton (MH)	Pour les bactéries.
Bouillon nutritif (BN)	

3. Extraction des métabolites secondaires

Les extraits de trois plantes ont été obtenus par Benarous (2010 ; 2014) selon les protocoles d'extraction cités ci-dessous.

3.1. Extraction des composés phénoliques par fractionnement liquide-liquide

Une quantité de 5 g de chaque poudre de plante est macérée dans un mélange hydroalcoolique (éthanol /méthanol/eau 50/40/10 : v/v/v) pendant 30 h à température ambiante et à l'obscurité. Après filtration et évaporation sous pression réduite à une température de 55°C, la phase

aqueuse de chaque extrait est lavée une ou plusieurs fois avec un demi-volume de l'éther de pétrole dans une ampoule à décanter afin d'éliminer toutes traces de composés apolaires (pigments, lipides, etc.). La phase aqueuse ainsi obtenue est ensuite lavée une ou plusieurs fois avec un même volume d'acétate d'éthyle. La phase organique obtenue est séchée par le sulfate de sodium anhydre Na_2SO_4 pour éliminer toutes traces d'eau. Après filtration le solvant est évaporé à sec sous pression réduite à 55°C . Le résidu est conservé à $+4^\circ\text{C}$ donnant l'extrait phénolique brut (figure 5).

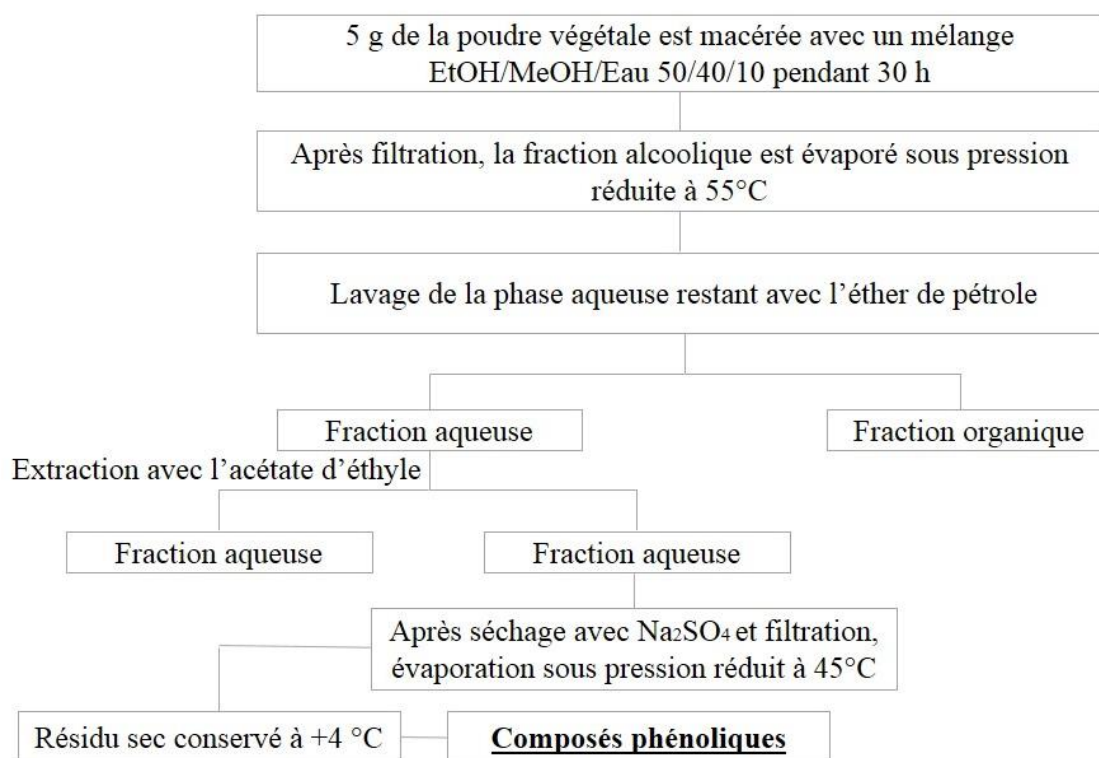


Figure 5. Procédure d'extraction des composés phénoliques.

3.2. Extraction des métabolites par un fractionnement solide –liquide

Afin d'étudier la capacité des solvants organiques à extraire des métabolites de différente polarité, nous avons réalisé des extractions solide –liquide successives en utilisant des solvants à polarité croissante à savoir l'hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, l'acétone et le méthanol (figure 6).

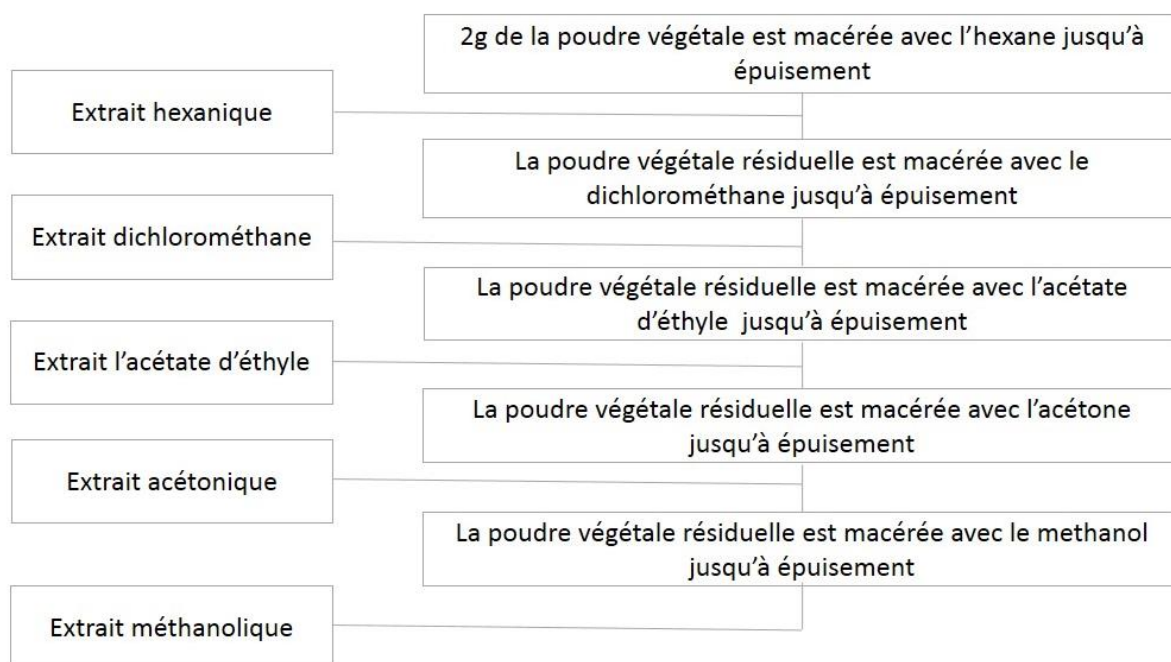


Figure 6. Procédure d'extraction par fractionnement solide-liquide.

3.2. Extraction des alcaloïdes par la méthode de Ross et Rain (1977)

Les alcaloïdes ont été obtenus par une triple extraction liquide – liquide selon la méthode de Ross et Rain (1977) ; In Harborne (1998, modifié), 100 g de jus de fruits *Punica granatum* ont été macérées dans 500 ml d'éthanol absolu à température ambiante et à l'obscurité pendant 48 h, après filtration, le filtrat éthanolique est évaporé sous pression réduite à sec à une température de 55°C.

Ce résidu sec est solubilisé dans 100 ml de chloroforme en ajoutant par la suite 50 ml de l'acide chlorhydrique 5 % et à pH=1, plusieurs lavages ont été effectués par le chloroforme pour la dépigmentation. L'alcalinisation de la phase aqueuse acide est faite par l'ajout de 50 ml d'une solution aqueuse de NH₄OH 25% à pH=10, pour récupérer les alcaloïdes, un second lavage est effectué par le chloroforme qui est par la suite évaporé à sec et sous pression réduite dans le rotavapeur et à une température de 55 °C.

Enfin, après la pesée du résidu sec, il est conservé à basse température (+4°C) jusqu'à la date des tests biologiques (figure 7).

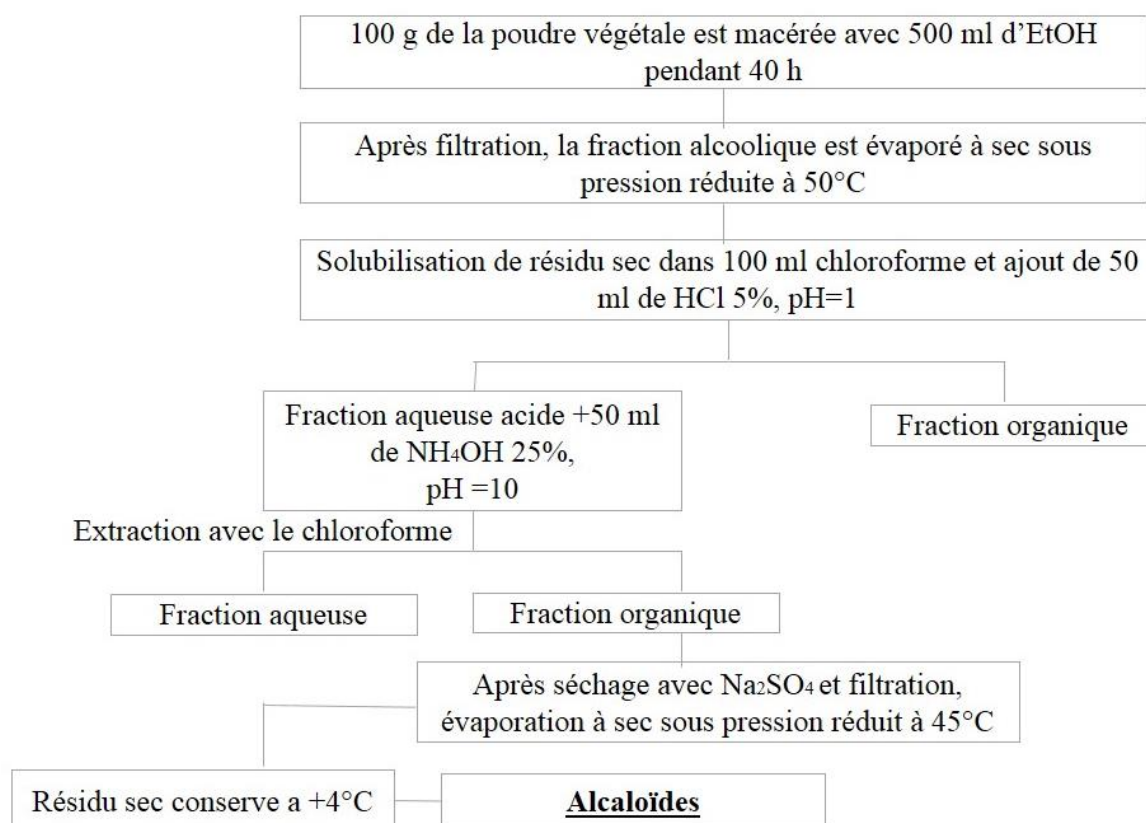


Figure 7. Procédure de l'extraction des alcaloïdes de *Punica granatum*

4. Évaluation de l'activité antimicrobienne

4.1. Préparation des cultures microbiennes

Une pré culture des souches microbiennes était préparée dans des milieux liquides afin d'avoir une concentration microbienne de 10^8 UFC/ml, avec une incubation dans le BN pendant 24 heures à 37°C et dans le milieu GYP pendant 48 heures à 30°C pour les bactéries et la levure, respectivement.

Après incubation, La suspension microbienne est bien homogénéisée, sa turbidité doit être équivalente à une densité optique comprise entre 0,08 à 0,10 mesurée à 625 nm pour obtenir une suspension de charge 10^8 CFU/ml (Digrak et *al.*, 2002).

4.2. Ensemencement

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes de Pétri. Un écouvillon est trempé dans les suspensions bactériennes et fongiques, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 90° . L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface pour avoir un tapis homogène de croissance microbienne.

4.3. Préparation des dilutions

Le solvant choisi pour les dilutions des extraits naturels est le DMSO, où il est testé par la méthode décrite ci-après en imbibant le disque en papier par le solvant.

4.4. Méthode de diffusion sur gélose

Pour tester l'activité antimicrobienne des extraits, nous avons adopté la technique de diffusion sur milieu solide à partir des disques en papier Wattman stériles (6 mm de diamètre) sont chargés avec 10 µl de chaque dilution des extraits (3 disque par la boîte pour le même extrait) , en suite et pour permettre une bonne diffusion des extraits, les boîtes sont mises sous 4°C pendant 2h puis après 24 h d'incubation à 37 °C pour les souches bactériennes, et 48 h à 30 °C pour les levures L'activité antimicrobienne est déterminée en termes de diamètres de la zone d'inhibition produite autour des disques à l'aide d'un pied à coulisse (Tepe et *al.*, 2004 ; Lesueur et *al.*, 2007; Klančnik et *al.*, 2010).

4.5. Test d'antibiogramme et d'antifongigramme

Nous avons testé l'effet antimicrobien des antibiotiques (VA 30, OXA 1, P 10, L2, S10, E 15) et des antifongiques (Fluc 150 mg, Fluc 50 mg) couramment utilisés en médecine sur les souches pathogènes. Ces tests ont été réalisés pour étudier l'antibiogramme et antifongigramme standard des germes utilisés et le comparer avec l'effet de nos extraits naturels. Les disques sont déposés à la surface d'un milieu solide, préalablement ensemencé avec une culture pure des souches étudiées.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Résultats de l'activité antifongique par la méthode de diffusion sur gélose

Les résultats de l'évaluation antimicrobienne des extraits de trois plantes (*Marrubium vulgare*, *Inonotus hispidus*, *Punica granatum L.*), des extraits à partir du fractionnement et de trois molécules pures (harmaline, hispidine, quercitine) par la méthode de disques sont enregistrés ci-après (Tableaux 4 et 6). Les diamètres de zones d'inhibition en millimètre (mm) sont montrés, ces dernières représentent la grandeur du halo formé par les microorganismes (bactéries et levure) détruits par l'activité antimicrobienne des extraits naturels et des antimicrobiens commercialisés.

Tableau 4. Diamètres des zones d'inhibition des extraits et des molécules pures sur les souches de *C. albicans*.

Plantes	Extraits	Concentrations ($\mu\text{g}/\text{disque}$)	Diamètres des zones d'inhibition (mm)	
			Souche IPA 200	Souche IPA 400
<i>Marrubium vulgare</i> M _{VCT} (cotonné)		250	10 \pm 0	P.I
	Ac-O-Et	500	9 \pm 0	7,75 \pm 0,35
		1000	9,25 \pm 1,76	7,5 \pm 0
<i>Inonotus hispidus</i>	Ac-O-Et 1	500	9 \pm 0	P.I
		1000	7,5 \pm 0	P.I
	Ac-O-Et 2	250	8,75 \pm 0,35	P.I
		500	9 \pm 0	P.I
<i>Punica granatum</i>	Extrait 1	250	9 \pm 0	P.I
		500	8,75 \pm 0,35	P.I
		1000	9 \pm 0	P.I
	Extrait 2	250	7 \pm 0	P.I
		500	9,75 \pm 0,35	P.I
		1000	10,75 \pm 0,35	P.I
Molécules pures	Hispidine	95	10 \pm 0	P.I
		380	8,16 \pm 0,28	P.I
	Harmaline	75	8 \pm 0	8,5 \pm 0
		150	7,75 \pm 0,35	8,25 \pm 0,35
		300	P.I	10,66 \pm 0,28
Quercétine	62	7,75 \pm 0,35	P.I	
Antifongiques	Fluconazole 150 mg	250	11	20
		500	19	33
		1000	26	40
	Fluconazole 50 mg	125	17	38
		250	23	27

P.I : pas d'inhibition.

Extrait 1 : la macération 24 h.

Extrait 2 : la macération 48 h.

Tableau 5. Diamètres des zones d'inhibition sur *C. albicans* par rapport à différentes références bibliographiques.

Plante	Extrait	Concentration ($\mu\text{g}/\text{disque}$)	CMI ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Zone d'inhibition	Référence
<i>Inonotus hispidus</i>	Cyclohexane			10 \pm 1,1	Smolskaitė et al., 2015
	Dichlorométhane	/	100	9,5 \pm 0,7	
	Méthanol			15 \pm 0,5	
	Extrait aqueux			-	
<i>Marrubium vulgare</i>	Méthanol	100	100	23,05 \pm 1,73	Bouterfas et al., 2016
	Hexane	100	100	28,16 \pm 0,76	
	Chloroforme	100	100	26,93 \pm 1,40	
	Acétate d'éthyle	100	500	26,22 \pm 1,40	
<i>Satureja khuzistanica</i>	Extrait ethnolique	1500	2,99	11,3 \pm 0,62	Mahboubi et al., 2016
<i>Tamarix gallica</i>	Méthanol	3000	2900	12,33 \pm 0,58	Boulaaba et al., 2015
<i>Glycyrrhiza glabra L.</i>	Hydroalcolique	1250	1000	10	Martins et al., 2015

Dans ce travail, nous avons testé un ensemble des extraits obtenus par trois méthodes d'extraction différentes, l'objectif est d'investiguer leurs pouvoirs d'inhiber la croissance de quelques microorganismes à savoir : *Candida albicans* (2 isolats), *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* en utilisant la méthode de diffusion sur milieu solide, nous révélons une variation des diamètres des zones d'inhibition allant de 7 à 13 mm, selon les souches microbiennes testées et les concentrations de chaque extrait (figure 8 et 9).

Les extraits phénoliques de la plante *Marrubium vulgare* ont présenté des zones d'inhibition différentes selon le microorganisme étudié. Nous avons enregistré des zones d'inhibition de 7,5 à 10 mm pour l'extrait Ac-O-Et pour les deux souches de *Candida albicans*, Si nous comparons ces résultats avec ceux publiés et montrés dans le tableau (5), nous pouvons dire que les extraits étudiés ont présenté une faible activité par rapport à l'extrait d'Ac-O-Et de la même plante (Bouterfas et al., 2016) avec une zone d'inhibition importante d'une valeur moyenne de 20 mm contre *Candida albicans*, ceci peut être expliqué par le profil de résistance différent des isolats fongiques.

Les extraits phénoliques de l'Ac-O-Et d'*Inonotus hispidus* provoque une faible activité pour une seule souche IPA 200 avec des diamètres d'inhibition de 7 à 9 mm (figure8).

Nos résultats a été confirmé par les travaux de Smolskaitė et al., 2015, l'étude de l'effet de l'extrait dichlorométhane d'IH montre que la levure *C. albicans* moins sensible (9,5 mm).

La souche *C. albicans* IPA 200 a présenté une sensibilité modérée contre les extraits alcaloïdes de la plante PG (ext1, 2, figure 8) avec des diamètres d'inhibition allant de 7 à 10,75 mm et l'autre souche présente une résistance à ces deux extraits. Nous comparons nos résultats avec (Mahboubi et al., 2016) qui utilisent une autre espèce de plante (*Satureja khuzistanica*), on remarque que la concentration de 1,5 mg/disque donne une zone d'inhibition de $11,3 \text{ mm} \pm 0,62$, nous pouvons conclure que nos extraits possèdent presque une même activité avec l'extrait de ce plante.

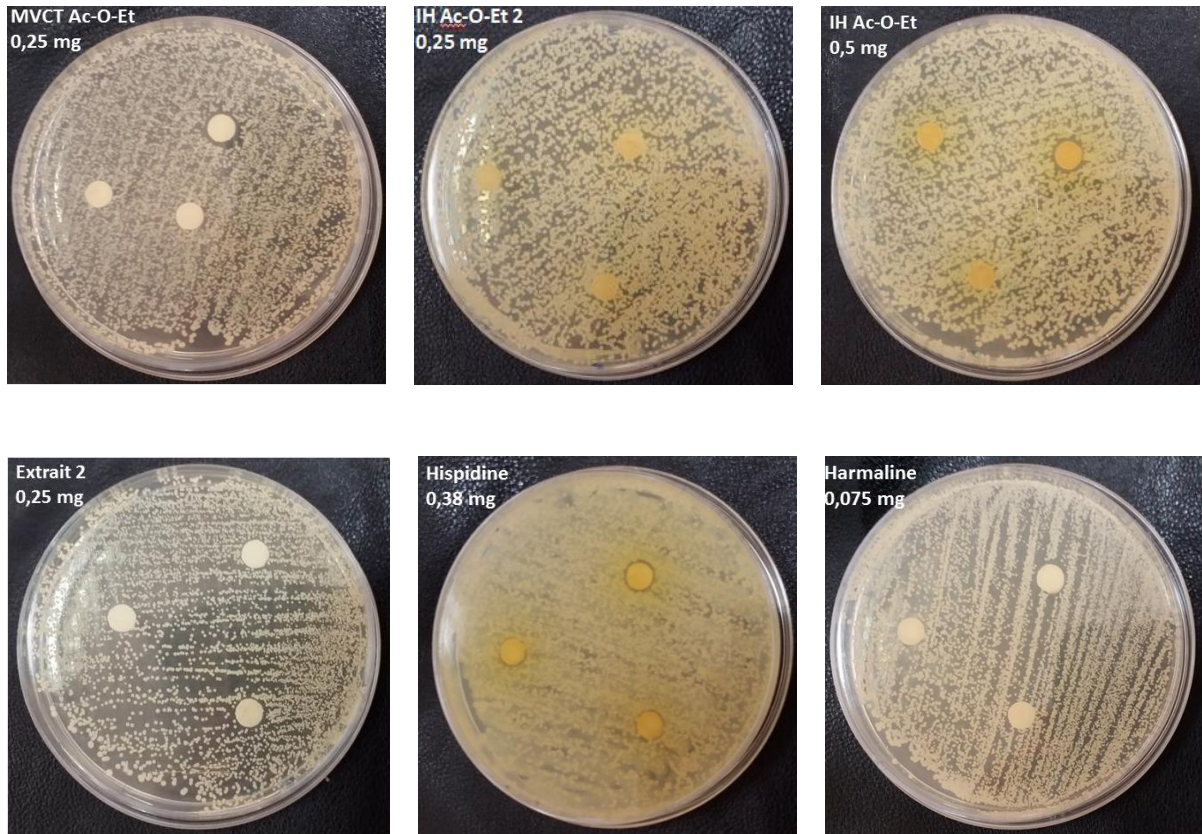


Figure 8. Photos illustrant l'activité antifongique des extraits sur la souche *C. albicans* IPA 200.



Figure 9. Photos illustrant l'activité antifongique des extraits sur la souche *C. albicans* IPA 400.

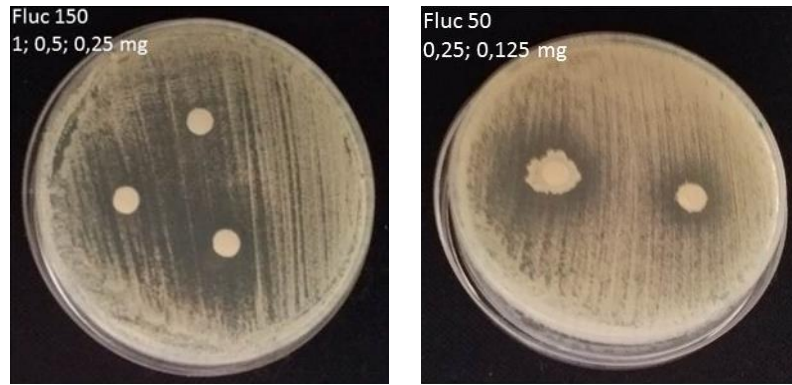


Figure 10. Photos illustrant l'antifongigramme de la souche de *C.albicans* IPA 200.

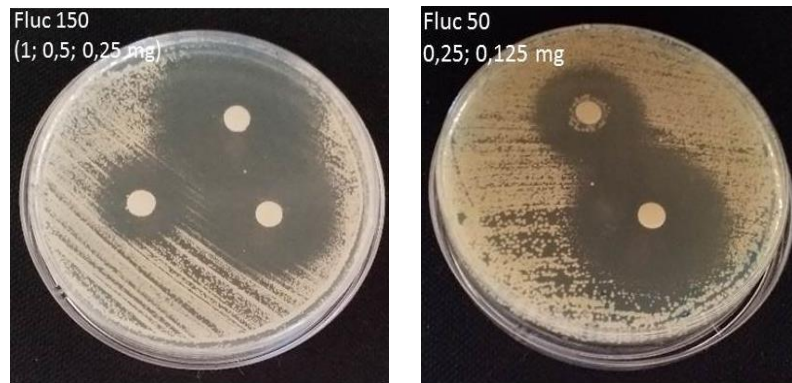


Figure 11. Photos illustrant l'antifongigramme de la souche de *C. albicans* IPA 400.

2. Résultats de l'activité antibactérienne

Après incubation pendant 24h à 37°C, les diamètres obtenus des zones d'inhibition sont résumés dans le tableau 6.

Tableau 6. Les diamètres des zones d'inhibition des extraits et des molécules pures sur les souches de *S. aureus* et *E. coli*.

Plantes	Extraits	Concentrations (µg/disque)	Diamètres des zones d'inhibition (mm)	
			<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
<i>Marrubium vulgare</i> MVCT	Ac-O-Et	250	P.I	P.I
		500	P.I	P.I
		1000	P.I	P.I
	DCM	500	8,83±1,25	P.I
		1500	9 ± 0	P.I
		500	10± 0	P.I
	Acétone	1500	9 ±0	P.I
		3000	10 ± 0	P.I
		250	8,5±0,70	7,75±1,06
<i>Marrubium vulgare</i> MVP	Act	500	8,16± 0,28	7,66± 0,57
		1000	8,25 ± 0,35	P.I
		500	8,83±1,25	7,75±1,06
	DCM	1500	9 ± 0	P.I
		500	P.I	P.I
<i>Punica granatum</i> PG	Extrait 1	1000	P.I	P.I
		2000	P.I	P.I
		400	13 ± 0	P.I
Molécules pures	Hispidine	250	P.I	P.I
		500	P.I	P.I
		1000	P.I	P.I
		35	26	
Antibiotiques (témoin positif)	Quercetine	250	P.I	P.I
		500	P.I	P.I
		1000	P.I	P.I
		22	19.5	
		18	P.I	
	E15	31	10	
		38	16	

P.I : pas d'inhibition.

L'extrait Ac-O-Et de la plante *Marrubium vulgare* (aspect cotonné) n'ont présenté aucune activité contre les deux espèces : *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

Les résultats expérimentaux de l'effet antibactérien des deux extraits phénoliques d'Acétone et DCM de *Marrubium vulgare* cotonné montrent que la bactérie à Gram (-) (*E. coli*) présentent une résistance à ces deux extraits, par contre la bactérie à Gram (+) (*S. aureus*) a donné une zone de 8,83 à 10 mm. Mais les mêmes extraits DCM et Acétone de la plante *Marrubium vulgare* (poudre), nous avons enregistré une faible activité pour les deux bactéries (figure 13 et 14).

Comparativement aux travaux de (Khaled-Khodja et al.,2014) ayant concerné l'étude de l'activité antibactérienne en utilisant un extrait méthanolique de *Marrubium vulgare* contre les souches *S. aureus*, *E. coli* avec une zone d'inhibition 15, 18 mm respectivement. Nous observons que nos extraits présentent une inhibition moins importante, cette différence d'action peut être expliquée par les protocoles d'extraction suivis dans chaque test.

L'extrait 1 des alcaloïdes de l'espèce *Punica granatum* n'ont montré aucun effet sur les souches bactériennes *S. aureus* et *E. coli*. En revanche, Pagliarulo et al., (2015) ont étudié l'effet antibactérien de l'espèce *Punica granatum*, ils ont détecté que l'extrait des polyphénols de l'éthanol de cette espèce présentent une activité antibactérienne faible prononcée contre les souches *E. coli* et *S. aureus*.

Pour les souches bactériennes, on a utilisé les deux molécules pures (hispidine et quercétine), les résultats obtenus n'ont donné aucune inhibition de la croissance de la bactérie *E. coli* par contre *S. aureus* a montré une sensibilité moyenne avec l'hispidine (13 mm) (figure 13).

La souche bactérienne *S. aureus* est révélée la bactérie la plus sensible aux extraits. Cette sensibilité plus marquée de bactérie à Gram (+) par rapport à la bactérie à Gram (-) vis-à-vis certain extraits de plantes appartenant aux différentes espèces a été observée par plusieurs auteurs (tableaux 7,8).

Les travaux d'Ourlad et al., 2016, sur les extraits méthanoliques des plantes *Vitex parviflora*, *Cyanthillium cinereum* testées par la méthode des disques sur *S. aureus* et *E. coli* à concentration 500 µg/disque, mentionnent que pour *E. coli* résiste contre les extraits de ces plantes, par contre la bactérie *S. aureus* possède une sensibilité moyenne contre l'extrait méthanolique de la plante *Cyanthillium cinereum* (13,47 mm de diamètre), mais elle ne montre aucune sensibilité avec *Vitex parviflora* (voir la figure 12).

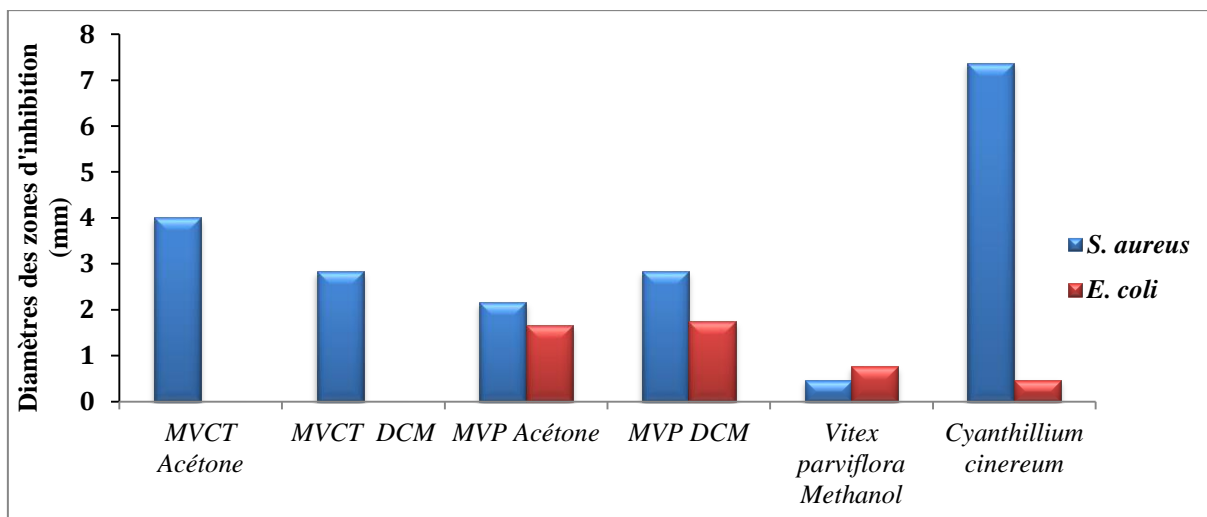


Figure 12. Comparaison l'activité antibactérienne de nos extraits avec les extraits de deux plantes (les données présentées sans les diamètres des disques).

Selon les résultats de l'antibiogramme présent dans les figures 15 et 16, les antibiotiques : E15, S10, VA, OX, P10, L2 ont montré une forte activité contre *Staphylococcus aureus* avec des diamètres de zone d'inhibition respectivement de 35mm, 26 mm, 22mm ; 18mm, 31mm, 38mm. Les antibiotiques S10, OX ne possèdent aucun effet inhibiteur sur *E. coli* pour les autres antibiotiques les diamètres varient entre 10 mm et 26mm.

Les bactéries Gram (-), ayant une membrane externe composée de phospholipides, de protéines et riche en molécules de lipopolysaccharides, leur membrane formant une barrière imperméable (Boutefas et *al.*, 2014) qui empêche l'entrée de substance environnementale comme les antibiotiques et les inhibiteurs (Mendes et *al.*, 2013) la membrane est également associée à des enzymes dans l'espace périplasmique qui sont capables de décomposer la molécule introduite de l'extérieur (Adaykalaraj et *al.*, 2012) en revanche, les bactéries Gram (+) sont plus sensibles ayant seulement une couche de peptidoglycane externe qui n'est pas une barrière de perméabilité effective (Abirami et *al.*, 2012).

En comparant ces résultats aux références bibliographiques (tableaux 7, 8 et figure 12), ayant concerné l'étude de l'activité antibactérienne en utilisant d'autres espèces de plantes comportant des composés phénoliques et des alcaloïdes sur les deux souches bactériennes : *Staphylococcus aureus* (tableau 7), *Escherichia coli* (tableau 8). Nous pouvons constater que nos extraits ont présenté des activités antimicrobiennes moins importantes.

Tableau 7. Diamètres des zones d'inhibition sur *S. aureus* par rapport à différentes références bibliographiques.

Plante	Extrait	Concentration ($\mu\text{g}/\text{disque}$)	CMI ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Zone d'inhibition	Référence
<i>Marrubium vulgare</i> (composés phénoliques)	Méthanol	2000	900	15,5 \pm 0,7	Khaled- Khodja et <i>al.</i> , 2014
<i>Tamarix gallica</i>	Méthanol	1	1,4	11,33 \pm 0,58	Boulaaba et <i>al.</i> , 2015
<i>Genista quadriflora</i>	Huile essentielle	400 200 100	/	9,2 \pm 0,1 7,1 \pm 0,2 6,0 \pm 0,5	Kacem et <i>al.</i> , 2016
<i>Vitex parviflora</i> (Feuilles)	Méthanol	1000 500 250	/	– 6,47 \pm 0,17 –	Ourlad Alzeus et <i>al.</i> , 2016
<i>Cyanthillium cinereum</i> (Feuilles)	Méthanol	1000 500 250	/	15,7 \pm 1,20 13,37 \pm 1,68 10,97 \pm 0,95	Ourlad Alzeus et <i>al.</i> , 2016
<i>Ajuga brateosa</i>	Méthanol/ chloroforme extrait aqueux	100 100	/	6,8 \pm 0,1 –	Akhtar et <i>al.</i> , 2015
<i>Punica granatum L.</i> (jus)	Ethanol	20000 4000	650	13 10	Pagliarulo et <i>al.</i> , 2015
<i>Punica granatum L.</i> (écorce)	Éthanol Ecorce purifié	8000 2000 ; 4000 ; 8000	200	20 15-20	Pagliarulo et <i>al.</i> , 2015

– : Pas d'inhibition.

Tableau 8. Diamètres des zones d'inhibition sur *E. coli* par rapport à différentes références bibliographiques.

Plante	Extrait	Concentration ($\mu\text{g}/\text{disque}$)	CMI ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Zone d'inhibition	Référence
<i>Marrubium</i>					
<i>vulgare</i> (composés ph)	méthanol	1000	900	18,5 \pm 1,04	Khaled-Khodja et <i>al.</i> , 2014
<i>Tamarix</i>					
<i>gallica</i>	méthanol	3	1,4	6 \pm 0,001	Boulaaba et <i>al.</i> , 2015
fleurs de					
<i>Calendula</i>	hexane		62,5	8	Abudunia et <i>al.</i> ,
<i>arvensis</i>	méthanol	/	125	14	2016
	extraits aqueux		125	12	
<i>Vitex</i>					
<i>parviflora</i> (Feuilles)	Méthanol	1000 500 250	/	6,80 \pm 0,05 6,77 \pm 0,09 6,57 \pm 0,24	Ourlad Alzeus et <i>al.</i> , 2016
<i>Cyanthillium</i>					
<i>cinereum</i> (Feuilles)	Méthanol	1000 500 250		6,33 \pm 0,09 6,47 \pm 0,25 6,70 \pm 0,22	Ourlad Alzeus et <i>al.</i> , 2016
<i>Ajuga</i>					
<i>brateosa</i>	Méthanol / chloroforme extrait aqueux	100 100	/ /	8,1 \pm 0,6 –	Akhtar et <i>al.</i> , 2015
<i>Punica</i>					
<i>granatum L.</i> (juice)	Ethanol	20000 4000	400	13 10	Pagliarulo et <i>al.</i> , 2015
<i>Punica</i>					
<i>granatum L.</i> (écorce)	éthanol écorce purifiée	8000 2000 ; 4000 ; 8000	300	30 20-30	Pagliarulo et <i>al.</i> , 2015



Figure 13. Photos illustrant l'activité antibactérienne des extraits sur la souche *S. aureus*.

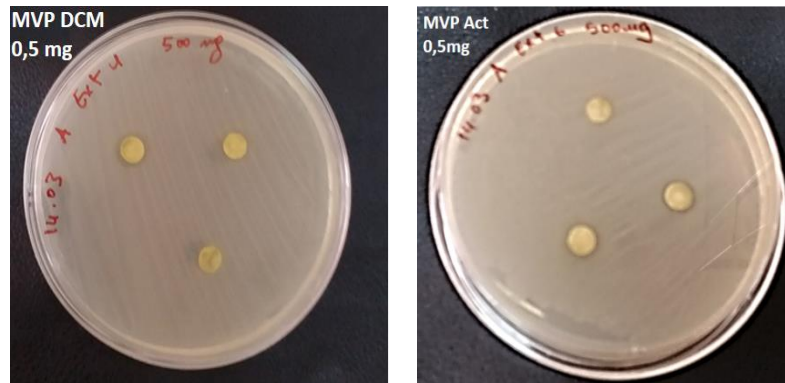


Figure 14. Photos illustrant l'activité antibactérienne des extraits sur la souche *E. coli*.

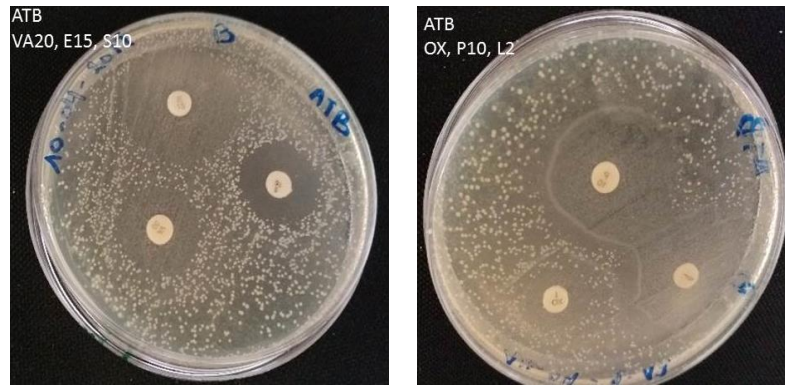


Figure 15. Photos illustrant l'antibiogramme de la souche *S. aureus*.

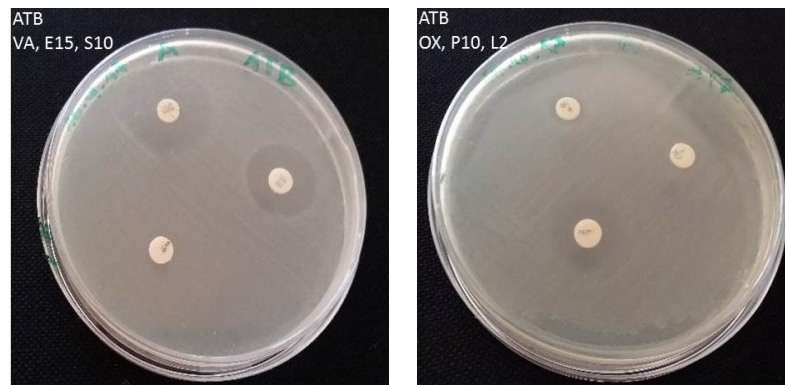


Figure 16. Photos illustrant l'antibiogramme de la souche *E. coli*.

CONCLUSION GENERALE

L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires.

L'objet de notre travail a porté sur l'étude de l'effet antimicrobien des extraits naturels (alcaloïdes, composés phénoliques et extraits par fractionnement) de *Marrubium vulgare*, *Inonotus hispidus*, *Punica granatum L*, qui utilisées en phytothérapie. Et des trois molécules pures hispidine, harmaline, quercétine.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de nos extraits a été mise en évidence *in vitro* en utilisant la méthode de diffusion sur gélose des souches étudiées (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*). Nous avons obtenus des résultats microbiologiques montrant que les extraits ont une activité antimicrobienne modérée contre la majorité des microorganismes testés, surtout contre la levure *C. albicans* IPA 200.

D'après les résultats qu'on a obtenus, l'activité antimicrobienne est en relation avec la souche testée, la concentration de principe actif (extrait phénolique et alcaloïde ou autre) et de la nature du solvant avec lequel sont extraits les composés naturels.

En se référant avec la bibliographie, il paraît que nos extraits présentent une activité antimicrobienne moyenne.

En perspective, il serait intéressant d'élargir le nombre de plantes étudiées et les régions de récolte, avec une étude plus approfondie qui est nécessaire pour identifier et caractériser les composés responsables des activités antimicrobiennes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adaykalaraj. G, Partric. R.D, Johonson. M, Janakiraman. N, Babu. A., 2012. Antibacterial potential of selected red seaweeds from manapad coastal areas, Thoothukudi, Tamil nadu, India. Asian pacific Journal of topical Biomedicine, P1077-1088.

Akhtar, Ihsan-ul-Haq, Bushra Mirza., 2015. Phytochemical analysis and comprehensive evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of 61 medicinal plant species. pp 13.

Awadh Ali, R.A.A. Mothana, A. Lesnau, H. Pilgrim, U. Lindequist, Antiviral activity of *Inonotus hispidus*, *Fitoterapia* 2003. 74: 483–485.

Benarous, 2010. Evaluation de l'activité antioxydante et étude des effets inhibiteurs des extraits phénoliques, saponines et alcaloïdes sur la lipase de *Candida rugosa*. Thèse pour l'obtention du diplôme de Magister en Biologie. U.Laghouat, p 7.

Benarous, A. Djeridane, A. Kameli, M. Yousfi, Inhibition of *Candida rugosa* lipase by secondary metabolites extracts of three Algerian plants and their antioxidant activities, *Curr. Enzym. Inhib.* 2013. 9 : 75–82.

Bergogne-Berezin E., Dellamonica P., 1995 .Antibiothérapie en pratique clinique. Ed Masson, Paris, 486 p.

Billing J. and Sherman P. W. Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot. *Q. Rev. Biol.*1998; 73: 3-49.

Boudjouref, 2011 : Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. p 1-9

Boulaaba, Mejdi Snoussi, Mariem Saada, Khaoula Mkadmini, Abderrazak Smaoui, Chedly Abdelly, Riadh Ksouri., 2015. Antimicrobial activities and phytochemical analysis of *Tamarix gallica* extracts. *Industrial Crops and Products*.,2015. 76: 1114–1122.

Bouterfas, K, Z. Mehdadi, A. Latreche, L. Aouad., 2014. Pouvoir antimicrobien des flavonoïdes extraits des feuilles de *Marrubium vulgare* L. en provenance du mont de tessala (Algérie occidentale). *Pharmacognosie*. 6,5-7.

Bouterfas, Z. Mehdadi, L. Aouad, M.M. Elaoufi, M.B. Khaled, A. Latreche, W. Benchiha., 2016. Does the sampling locality influence on the antifungal activity of the flavonoids of *Marrubium vulgare* against *Aspergillus niger* and *Candida albicans*., MYCMED-607; No. of Pages 1.

Cassano, A., Conidi, C., Drioli, E., 2011. Clarification and concentration of pomegranate juice (*Punica granatum* L.) using membrane processes. *J. Food Eng.* 107: 366–373.

Chambers H. F., 1997. Methicillin resistance in *staphylococci* : molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 781-791.

Chenni M. Contribution à l'étude chimique et biologique de la racine d'une plante médicinale : *Bryonia dioica* Jacq. Mémoire présenté Pour l'obtention du Diplôme de Magister. Université D'oran Es-Senia., 2010.page 2_50

Cuendet, M., Bruneton, J., 1999 .Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : «*Fagraeablumei*» (loganiaceae) et de trois plantes d'altitude : «*Bartsiaalpina*» (scrophulariaceae), «*Loiseleuriaprocumbens*» (Ericaceae) et Camp, these de doctorat : p 24(37).

Daas Amieur S. Etude Quantitative Des Composés Phenoliques Des Extraits De Trois Variétés De Dattes (*Phoenix Dactylifera* L.) Et Evaluation In Vitro De Leur Activité Biologique. Diplôme de Magister en Biologie Option : Biochimie appliquée. Université ElHadj Lakhdar – Batna., 2009.26_42.

Dahl., 2003. Contribution à l'étude de métabolites secondaires chez les lichens fructiculeux *Cladina stellaris* et *Cladina rangiferina*. Mémoire de maîtrise. Université de québec, 193 pp.

De Souza, M.M., De Jesus, R.A.P., Cechinel-Filho, V., Schlemper, V., 1998. Analgesic profile of hydroalcoholic extract obtained from *Marrubium vulgare*. *Phytomedicine* 5, 103–107.

Digrak., E. Bagci and M. Hakki Alma., 2002. Antibiotique action of seed lipids from five tree species grown in Turkey, *Pharmaceutical Biology*; 5pp.

Dorman et Deans., 2000 Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88:308–316.

Kang. L. Ma., Y. Huang., D. Hou and T. Hou., 2009. Antimicrobial activity of root extracts of *stellera chamaejasme* L from China, *World Applied Science Journal*; 664-668pp.

Khaled-Khodja, Lila Boulekbache-Makhlouf, Khodir Madani., 2014. Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Industrial Crops and Products* 61 (2014) 41–48.

Kaufmann SHE. Host response to intracellular pathogens. Ed. Springer; R.G. Landes, New York; Austin, 1997, p. 345.

Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B. Et Možina S. S., 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. Elsevier. *Journal of Microbiological Methods*, 81,121–126.

Knöess, W., Zapp, J., 1998. Accumulation of furan labdane diterpenes in *Marrubium vulgare* and *Leonurus cardiaca*. *Planta Med.* 64, 357–361.

LAMBA S.S., BUCH K.Y., LEWIS H., LAMBA H.J., 2000. Phytochemicals as potential hypoglycemic agents. *Studies in naturel Products Chemistry*; 21: 457-496

LEDUC, C., COONISHISH, J., HADDAD, P., CURRIER, A., 2006. Plants used by Cree Nation of Eeyou Istchee (Quebec, Canada) for treatment of diabetes: A novel approach in quantitative ethnobotany. *J. Ehtnopharmacol.*; 105: 55-63.

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

Mabberley, D.J., 1997. *The Plant Book*, 2nd edition Cambridge University Press, Cambridge.

Nasser Ali, R. Jansen, H. Pilgrim, K. Liberra, U. Lindequist, Hispolon, a yellow pigment from *Inonotus hispidus*, *Phytochemistry* 41., 1996. 927–929.

Mahboubi, N. Kazempour., 2016. The anti-candidal activity of *Satureja khuzistanica* ethanol extract against clinical isolates of *C. albicans*. MYCMED-586; No. of Pages 5.

Malik, A., Afaq, F., Sarfaraz, S., Adhami, V.M., Seyed, D.N., Mukhtar, H., 2005. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 :14813-14818.

Marc Pihet, Agnes Marot, Diagnostic biologique des candidoses. *REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES - MARS 2013 - N°450*.

Martinsa,b, Isabel C.F.R. Ferreirab , Mariana Henriquesa, Sónia Silvaa., 2016. In vitro anti-Candida activity of *Glycyrrhiza glabra* L. *Industrial Crops and Products* 83 (2016) 81–85.

Masoodi, M.H., 2011. Recent developments in phytochemical and pharmacological studies of *Marrubium vulgare* L. *J. Pharm. Res.* 10: 124–129.

Masoodi, M.H., Ahmed, B., Zargar, I.M., Khan, S.A., Khan, S., Singh, P., 2008. Antibacterial activity of whole plant extract of *Marrubium vulgare*. *Afr. J. Biotechnol.* 7 :86–87.

Mendes. M, Pereira. R, Sousa Pinto. I, Carvalho. A.p et Gomes. A.M., 2013. Antimicrobial activity and lipid profile of seaweed extracts from the north Portuguese coast. *International food research journal*, Vol.20, N°6, P337-3345.

Meyre-Silva, C., Yunes, R.A., Schlemper, V., Campos-Buzzi, F., Cechinel-Filho, V., 2005. Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare*. *Il Farmaco* 60 :321–326.

Mohammedi, 2013 : Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie. P 84.

Mokbel., Y. Watanabe., F. Hashinaga and T. Suganuma., 2006. Purification of antioxidant and antimicrobial substance of ethyl acetate extracts from Buntan (*Citrus grandus Osbeck*) fruit peel, *Pakistan Journal of Biological Sciences*; 145-150 pp

Ochoa H., 2005. Substitution de solvants et de matières actives de synthèse par une combine d'origine végétale. Thèse de Doctorat Institut National Polytechnique de Toulouse. 224 pp.

Ouraini, A. Agoumi, M. Ismaili-Alaoui, K. alaoui, Y. Cherrah, M.A. Alaoui, M.A. Belabbas et al. Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Mentha pulegium* L., comparée aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques *Phytothérapie* ., 2007. Numéro 1: 6–14.

Ourlad Alzeus G. Tantengco1, Marlon Lian C. Condes, Hanna Hasmin T. Estadilla, Elena M. Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., et Lacroix, M., 2007. Les huilles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. *Food control*, 18: 414-420 pp.

Ragragio., 2016. Antibacterial activity of *Vitex parviflora* A.Juss. And *Cyanthillium cinereum* (L.) H.Rob. against human pathogens. *Asian Pac J Trop Dis* 2016; 6(12): 1004-1006.

Pagliarulo, Valentina De Vito, Gianluca Picariello, Roberta Colicchio, Gabiria Pastore, Paola Salvatore, Maria Grazia Volpe., 2016. Inhibitory effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Food Chemistry* 25.

Pinto, M., Geubel, A. P., 2002., *Phytothérapie et hépato toxicité*. Louvain Med. 121 :407-414 pp.

Sahpaz, S., Garbacki, N., Tits, M., Bailleul, F., 2002. Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. *J. Ethnopharmacol.* 79:389–392.

Smolskaitė, Petras Rimantas Venskutonisa, Thierry Talou., 2015. Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species. p7.

Roman, R.R., Alarcon-Aguilar, F., Lara-Lemus, A., Flores-Saenz, J.L., 1992. Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics. *Arch Med Res* 23: 59–64.

Tepe B., Donmeza E., Unlub M., Candanc F., Dafererad D., Vardar-Unlub G., Polissioud M. et Sokmena A., 2004. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). Elsevier, *Food chemistry*, 84: 519-525.

Turfan, O, Turkyılma, M, Yemis, O, Ozkan, M., 2011. Anthocyanin and colour changes during processing of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice from sacs and whole fruit. *Food Chem.* 129: 1644–1651.

Ulanowska K., Majchrzyk A., Moskot M., Jak__bkiewicz-Banecka J. and W_Âgrzyn G. Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia* .,2007; 62: 132-135.

Vidal, A., Fallarero, A., Peña, B.R., Medina, M.E., Gra, B., Rivera, F., Gutierrez, Y. & Vuorela, P.M., 2003. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (*Punicaceae*) whole fruit extracts. *J. Ethnopharmacol.* 89(2-3):295-300.

Weel, K.G.C., Venskutonis, P.R., Pukalskas, A., Gruzdiene, D., Linssen, J.P.H., 1999. Antioxidant activity of horehound (*Marrubium vulgare*) grown in Lithuania. *Fett/Lipid* 101:395–400.

Yousfi, A. Djeridane, I. Bombarda, H. Chahrazed, B. Duhem, E.M. Gaydou, Isolation and characterization of a new hispolone derivative from antioxidant extracts of *Pistacia atlantica*, *Phytother. Res.*23 (2009) 1237–1242.

ANNEXES

Annexe 1. Composition des milieux de culture

Mueller-Hinton Agar (MH)

Infusion de viande bœuf	4 g
Peptone de Caséine	17.5 g
Amidon de Maïs	1.5 g
Agar	15 g
Eau distille	1000 ml
pH	7.4

Bouillon nutritif

Peptone	15 g
Extrait levure	3 g
Chlorure de sodium	6 g
Glucose	1 g
Eau distille	1000 ml
pH	7.2

Sabouraud Agar

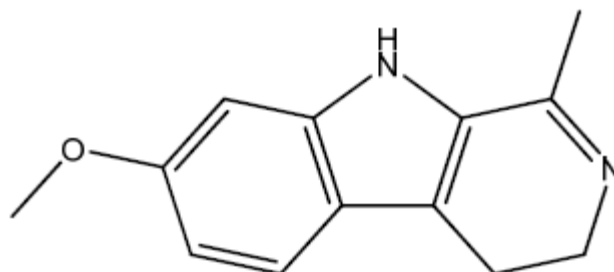
Peptone	10 g
Glucose massé	20 g
Agar-agar	15 g
Eau distille	1000 ml
pH	6

Bouillon GYP

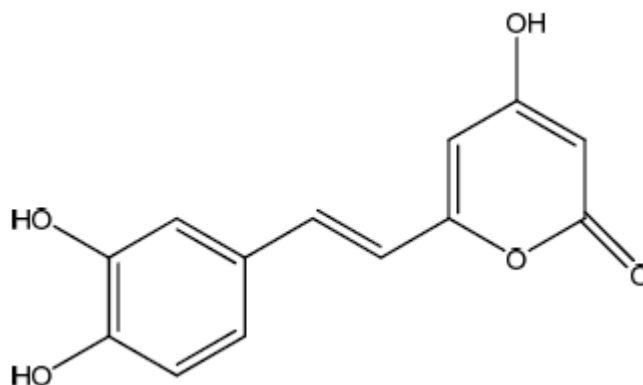
Glucose	5g
Peptone	5g
Extrait de levure	3g
Eau distillée	1000 ml

Annexe 2. Les structures chimiques des molécules pures.

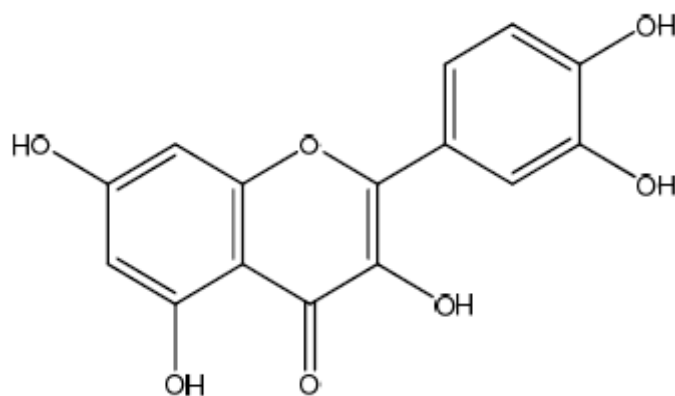
Les structures chimiques des molécules pures



Harmaline

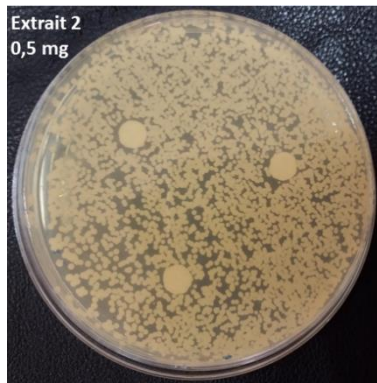


Hispidine



Quercétine

Annexe 3. Des photos illustrant l'activité antimicrobienne des extraits.



Candida Albicans IPA 200



Staphylococcus aureus