

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES

**DEPARTEMENT DES SCIENCES DE
LA NATURE ET DE LA VIE**

N° :



**DOMAINE : SCIENCES DE LA
NATURE ET DE LA VIE**

**FILIERE : SCIENCES
BIOLOGIQUE**

**OPTION : BIOTECHNOLOGIE
VEGETALE**

**Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique
En Biotechnologie Végétale**

Par: BENLECHEHEB Fatima

Intitulé

**Étude phytochimique et activité antimicrobienne
des extraits actifs de quelques plantes
médicinales d'Algérie**

Soutenu devant le jury composé de:

Dr. BENDERRADJI Laid	MCA	Université de M'Sila	Président.
Dr. GHADBANE Mouloud	MCA	Université de M'Sila	Rapporteur.
Dr. BENDIF Hamdi	MCB	Université de M'Sila	Examineur.

Année universitaire : 2017 /2018

DEDICACE

Je dédie ce travail à mes **Parents** qu'ils trouvent ici toute ma gratitude
Pour leur soutien tout le long de mes études ;

A ma très chère frère : **yassine** ;

À mes chères sœurs : **Bouchra ,Sara ,Kawthar** ;

À mes **Amies** ;

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour .

Fatima

REMERCIEMENTS

Je remercie Dieu tout puissant de m'avoir donné la force , le courage et la patience nécessaire pour réaliser ce travail .

J'exprime mes remerciements à **Dr. GHADBANE MOULOUD.** , maitre de conférences au département des SNV ,faculté des sciences , l'université de MOHAMMED BOUDIEF de M'SILA , pour avoir accepté d'encadrer mon travail ;

Je tiens à remercier **Dr.BENDERRADJI LAID.** , maitre de conférences au département des SNV ,faculté des sciences , l'université de MOHAMMED BOUDIEF de M'SILA , de m'avoir fait l'honneur de présider le jury .Qu'elle trouve ici l'expression de ma grande considération ;

Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à **Dr. BENDIF HAMDI** . , maitre de conférences au département des SNV ,faculté des sciences , l'université de MOHAMMED BOUDIEF de M'SILA , de m'avoir suivi , dirigé ,aidé et encouragé tout au long de mon travail . Je le remercie également pour ses précieux conseils et sa constante disponibilité et aussi d'avoir accepté de faire partie du jury et examiner ce travail ;

Je tiens à remercier toutes personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail , en particulier **Dr. HARIR MOHAMED** . , maitre de conférences au département des SNV ,faculté des sciences , l'université de MOHAMMED BOUDIEF de M'SILA ,que je tiens à le remercier pour son aidé ,son soutien et ses encouragements .

À tous mes professeurs du primaire à l'université , un grand merci à tous .

Sommaire

Résumés	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.Les plantes médicinales étudiées.....	03
1-1.La plante medicinale <i>T .munbyanus ssp.coloratus</i>	03
1-1-1. Généralité.....	03
1-1-2. Description botanique de <i>T. munbyanus</i> Boiss. & Reut.	03
1-1-3. Classification botanique	04
1-1-4. Propriétés thérapeutiques	04
1-2.La plante medicinale <i>Pallenis Spinosa</i> L. (Cass.).....	04
1-2-1.Généralité	04
1-2-2. Description botanique de <i>T. munbyanus</i> Boiss. & Reut.	05
1-2-3. Classification botanique	05
1-2-4. Propriétés thérapeutiques	06
1-3.La plante medicinale <i>Micromeria inodora</i> (DESF.) BENTH	06
1-3-1.Généralité.....	06
1-3-2. Description botanique de <i>Micromeria inodora</i> (DESF.) BENTH.....	06
1-3-3. Classification botanique	07
1-3-4. Propriétés thérapeutiques	07
1-4.La plante medicinale <i>Satureja candidissima</i> (Munby.) Briq.	07
1-4-1.Généralité.....	07
1-4-2. Description botanique de <i>Satureja candidissima</i> (Munby.) Briq.	08
1-4-3. Classification botanique	08
1-4-4. Propriétés thérapeutiques	09
2.Composés phénoliques	09
2-1 . Classification des composés phénoliques	09
2-1-1.Acides phénoliques	09
2-1-2. Tannins.....	10
2-1-2. flavonoïdes	10
2-1-2- 1 .Structure et classification des flavonoïdes	10
2-2. Rôle physiologique des composés phénoliques	11
3. Activité antimicrobienne.....	12
3-1. principales substances antimicrobiennes.....	12
3-1.1.Antibiotiques.....	12
3-1-2. Composés phénoliques.....	13

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1-Matériel végétale.....	14
1-1 la récolte des plantes.....	14
1.2 Identification botanique	14
1.3. Préparation des échantillons	15
2. Méthode d'analyse	15
2.1. Préparation des extraits	15
2.1.1. Extrait méthanolique	16
2.2. Analyse chimique.....	18
2.2.1. Détermination du rendement des extraits.....	18
2.2.2. Tests phytochimiques.....	18
2.2.3. Dosage des polyphénols totaux.....	19
2.2.4. Dosage des flavonoïdes totaux	21
3. L'activité antimicrobienne.....	22
3.1. Activité antibactérienne	22
3.2. Activité antifongique	25

Chapitre III RESULTATS ET DISCUSSION

1. Rendements de l' extraction.....	27
2. Composition chimique	28
2.1. Screnning phytochimique.....	28
2.2. Teneur en polyphénols totaux	29
2.3.Teneur en flavonoïdes totaux.....	30
3.L'activité antimicrobienne.....	32
Conclusion	37
Références bibliographiques	39
Annexes	
Rèsumè	

Liste des abréviations

ATCC :American type culture collection .

CLSI :Clinical and laboratory Standards Institue .

DMSO : Dimethylsulfoxyde.

DO : Densité optique.

EAC : Equivalent en acide caféique.

EAG: Equivalent en acide gallique.

EbMoTH :extrait brut méthanolique.

EQ : Equivalent en quercétine.

m/m : Masse par masse.

MF : Matière fraîche.

R (%) : Rendement.

R2 : Coefficient de corrélation .

UFC :Unité Faisant Colonie .

UV : Ultraviolet.

V /V : Volume par Volume .

Liste des figures

Figure 1 : Aspects morphologiques de <i>T. munbyanus</i> ssp. <i>coloratus</i>	04
Figure 2: Aspects morphologiques de <i>Pallenis spinosa</i> L. (Cass.).....	05
Figure 3: Aspects morphologiques de <i>Micromeria inodora</i> (DESF.) BENTH.....	07
Figure 4 : Aspects morphologiques de <i>Satureja candidissima</i> (Munby.) Briq.....	08
Figure 5 : Squelette de base des flavonoïdes.....	10
Figure 6 : évaporateur rotatif “BÜCHI”	16
Figure 7: Protocole de préparation de l'extrait méthanoïque des plantes étudiées par macération	18
Figure 8: Structure de l'acide gallique.....	20
Figure 9: Etapes du dosage des polyphénols totaux	20
Figure 10: Structure de la quercétine	21
Figure 11: Etape du dosage des flavonoïdes totaux	22
Figure12 : Schéma illustrant la démarche expérimentale suivie dans cette étude	26
Figure 13 : rendement de l'extraction de quatre plantes étudiées.....	28
Figure 14 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	30
Figure 15: la teneur en polyphénols des extraits de quatre plantes étudiées.....	30
Figure 16 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	32
Figure 17 : la teneur en flavonoïdes des extraits de quatre plantes étudiées.....	32
Figure18 : résultats des activités antibactériennes de quatre plantes étudiées .	
Figure19 : résultats de l'effets de l'antibiotique (Amoxicilin) sur quelques bacteries.....	35
Figure19 : résultats des activités antifongiques de quelques plantes étudiées.....	36

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques maladies remèdes par <i>Pallenis spinosa</i>	06
Tableau 2 : Activité biologiques des composés phénoliques	12
Tableau 3 : paramètres géographiques des stations de récolte des plantes étudiées.....	15
Tableau 4: Les différents microorganismes testés	23
Tableau 5 : rendement de l'extraction de quatre plantes étudiées.....	27
Tableau 6 : Résultats du screening phytochimique des plantes étudiées.....	28
Tableau7 : Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des extraits de quatre plantes étudiées.....	31
Tableau 8: Diamètre de la zone d'inhibition des extraits méthanoliques des quatre plantes médicinales étudiées.....	33

INTRODUCTION

Introduction

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments **(Maurice, 1997)**.

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives. Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes **(Bahorun et al., 1996)**.

Les polyphénols sont en effet doués de multiples vertus thérapeutiques, ils jouent un rôle très important, principalement, dans la lutte contre les cancers, les maladies cardiovasculaires et la peroxydation lipidique. Expliquant de ce fait leur grande utilisation dans la fabrication des médicaments. Ils interviennent aussi dans la protection des plantes contre les différentes attaques microbiennes (surtout fongiques) risquant de causer la perte d'une grande quantité de végétation **(Bruneton, 1999)**.

Cependant, l'évaluation des propriétés phytopharmaceutiques, antioxydante et antimicrobienne demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connue dans la médecine traditionnelle. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs **(Teixeira da Silva, 2004)**.

L'Algérie, par sa situation géographique au centre de la méditerranée, abrite une végétation riche et diversifiée. Un grand nombre de plantes aromatiques y poussent spontanément dont les lamiacées et les astéracées qui sont riches en polyphénols. Une proportion importante de ces plantes est polymorphe.

Ce travail est alors réalisé pour comporter les tests phytochimiques et d'estimer la teneur de composés actifs essentiels, les polyphénols de quatre plantes médicinales endémiques en Algérie (*Thymus munbyanus ssp. coloratus* (Boiss. & Reut.) Greuter & Burdet., *Pallenis spinosa* L. (Cass.), *Micromeria inodora* (Desf.) Benth., *Satureja candidissima* (Munby.) Briq.) très utilisées par la population locale à des fins thérapeutiques et culinaires et d'étudier leurs activités antimicrobiennes.

Cette mémoire est divisée en trois chapitres :

Dans le premier chapitre ,nous présentons une analyse bibliographique décrivant les notions essentielles liées au contexte globale de notre travail (la description des plantes étudiées ,classification et leurs propriétés thérapeutiques ,les composés phénoliques ,l'activités antimicrobiennes) .

La deuxième chapitre illustre le matériel et les méthodes utilisés.

La troisième chapitre sont consacrées à la présentation et la discussion des résultats obtenus. Enfin, cette étude s'achève par une conclusion et des perspectives pour le futur .

Chapitre I
SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I. Synthèse bibliographique

1. Les plantes médicinales étudiées

1-1. *Thymus munbyanus* ssp. *coloratus* (Boiss. & Reut.) Greuter & Burdet

1-1-1. Généralité

Le nom *Thymus* dérive du nom grec: Thumos, venant du mot grec (theo) parfum ou plante odoriférante, le genre *Thymus* est un des 220 genres les plus diversifiés de la famille des labiées (Quezel et Santa, 1962), et compte plus de 400 espèces dont 26 poussent en Algérie.

L'espèce *T. munbyanus* Boiss. & Reut., est une plante endémique dans l'Afrique de nord (Benchabane *et al.*, 2012). En Algérie, cette endémique se localise dans le secteur Nord Algérois (Saidj *et al.*, 2006). Ce taxon est représenté par trois sous espèces: ssp. *coloratus*, ssp. *munbyanus* et *euciliatus* (Quezel et Santa, 1962).

1-1-2. Description botanique de *T. munbyanus* Boiss. & Reut.

Sous-arbrisseau vivace, assez robuste et touffue avec des racines noueuses et tortueuses, herbacées au sommet très diffuses, petit à moyen mesurant de 10 à 40 cm de haut et très odorant (Thierry, 2005), érigée ou prostrée (Quezel et Santa, 1962). Les feuilles sont très petites, sessiles, ovales, allant du vert (à l'ombre) au gris blanchâtre (en pleine soleil), linéaire ou linéaire-lancéolées, duveteuses au revers, lisses à l'avant et enroulées sur les bords (Grunwald et Christof, 2004). Les fleurs sont visibles entre Avril et Septembre. Elles sont bleu-violettes voir rouge clair (Thierry, 2005), réunies en glomérules.

La sous-espèce *coloratus* : La ssp *coloratus* (Boiss et Reut) Batt. est un sous arbrisseaux à capitule dense, gros et à feuilles florales plus ou moins tachées de pourpre au moins à la base. Les fleurs ne dépassent pas 7 à 8mm et sont en général plus pâles (Quezel et Santa., 1962 ; Bousmaha-Marroki *et al.*, 2007 ; kholkhal, 2013) .



Figure 1 : Aspects morphologiques de *T. munbyanus* ssp. *coloratus* (Boiss. & Reut.) Greuter & Burdet.
(photo de Bendif a Bordj Bou Arreridj, 2017).

1-1-3. Classification botanique

Le *Thymus munbyanus coloratus* est classé comme suit (Pascual et al . ,1978) .

Règne	Plantae
Embranchement	Spermaphytes (phanérogames)
Sous classe	Métachlamydées (gamopétales)
Ordre	Tubiflorales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus munbyanus</i>
Sous-espèce	<i>T. munbyanus coloratus</i>

1-1-4. Propriétés thérapeutiques

De nos jours, le thym est un élément caractéristique de la flore méditerranéenne. Ses feuilles sont riches en huiles essentielles dont les propriétés sont mises à profit en phytothérapie et en médecine, notamment : antiparasite, antispasmodique, antiseptique et digestif. Cela a été mentionné dans plusieurs études (Ebrahimi et al . , 2008 ; Rasooli et al . ,2006 ; Cosentino et al . ,1999). Il est très utilisé en médecine traditionnelle sous plusieurs formes: les feuilles sont utilisées en infusion contre la toux ; en décoction pour guérir la migraine, l'hypertension et la gastrite ; en usage externe comme cicatrisant. Il possède des vertus antiseptiques utilisées pour soigner les infections pulmonaires (Rasooli et al . ,2006 ; Adwan et al . ,2006 ; Soto-Mendivil et al . ,2006). *T. coloratus* représente une activité antioxydant due à la présence des flavonoïdes (kholkhal, 2013).

1-2. La plante *Pallenis Spinosa* L. (Cass.)

1-2-1. Généralité

Le mot *Pallenis* est dérivé de *palea* (paillettes). Ce genre de plantes appartient à la tribu naturelle des Inulées. Les fleurs de cette plante deviennent brunâtres, en se fanant, d'où le nom générique, dérivé d'un verbe latin, signifiant « perdre sa couleur », l'épithète *spinosa*, s'applique aussi braccées « épineuses » (**Djebara, 2013**). Cette espèce est distribuée dans toute la région méditerranéenne : Moyen-Orient, Amman, Jarash, Palestine (**Djebara, 2013**), Libya (**Hegazy, 1898**), Maroc (**Jamal et al., 2004**), Egypte (**Zareh, 2005**), Europe, Nord d'Afrique (**Javier, 2001**) et Algérie (**Boumediene et Mohammed., 2009**).

1-2-2 . Description botaniques

C'est une plante herbacée, annuelle ou biennale, dont la tige, haute d'environ un pied, est dressée, dure, velue, un peu rameuse, presque dichotome. Les feuilles radicales sont étalées, longues, élargies vers la base, obtuses au sommet, denticulées sur les bords, velues. Celles de la tige sont alternes, sessiles, embrassantes, lancéolées et velues, les posées de fleurs jaunes, réunies en capitules de 18 à 25 mm (**Figure 2**). On trouve cette plante sur le bord des champs, dans les provinces méridionales forêts claires, pâturages (**Quezel et Santa, 1962**) Lieux incultes de la région méridionale, bord des chemins commun, où elle fleurit en Juin et Juillet (**Quezel et Santa, 1962**).



Figure 2: Aspects morphologiques de *Pallenis spinosa* L. (Cass.) (**Djebara, 2013**).

1-2-3. Classification botanique (**Quezel et Santa, 1962**)

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Tribu	Inuleae
Genre	<i>Pallenis</i>
Espèce	<i>Pallenis spinosa</i> L. (Cass.) .

1-2-4. Propriétés thérapeutiques

L'espèce *Pallenis spinosa* est utilisée éventuellement comme remède de quelques maladies (Benity et Onzalez .,2010 ; Antoni et Joan., 2003) présentées dans le tableau suivant (Tableau 1).

Un groupe espagnol a fait une étude des extraits de la plante montre une activité Anti-insect (Maria et Antonio., 1999).

Tableau 1 : Quelques maladies remèdes par *Pallenis spinosa* (Benity et Onzalez .,2010 ; Antoni et Joan., 2003) .

Maladie	Partie utilisée de la plante	Méthode utilisée	Administration
Maladies gastriques. Problèmes de circulation.	Plante fleurées	Infusion ou Decoction	Orale
Blessures.	Plante fleurées	Infusion ou Decoction	Orale et topique
Inflammation.	Plante fleurées	Infusion ou Decoction	Topique
Infections bucales, Problèmes de respiration.	Plante fleurées	Infusion	Topique
Douleurs.	Fleures	Infusion	Orale et topique

1-3. La plante *Micromeria inodora* (DESF.) BENTH:

1-3-1. Généralité

Micromeria BENTH. Genre comme actuellement compris appartient à la famille des Lamiacée et contient environ 70 espèces ; *Micromeria inodora* (DESF.) BENTH. est une plante inodore qui s'étend sur les roches, le calcaire en Méditerranée occidentale région particulièrement localisée dans quelques zones du littoral de l'ouest de l'Algérie et des îles Baléares (Benomari et al. ,2016). Parmi leur Synonymes: *Satureja fontanesii* BRIQ. = *Micromeria barceloi* WILLK. = *Satureja Barceloi* (WILLK.PAU) = *Thymus inodorus* DESF.). En Algérie, cette plante est connue de la population sous le nom de «Tazira hmeur»(Quezel et santa ., 1963).

1-3-2. Description botanique

Est un sous-arbrisseau avec des tiges dressées et très ramifiées 10 - 50 cm, avec calice 4 mm glabrescent et rose corolle, grande lèvre inférieure (10-12 mm) de large 6 - 7 mm. feuilles petites (2-3 mm), sessiles, acicu-laires, à bords enroulés, tomenteuses en dessous; fleurs axillaires, solitaires, brièvement pédicellées (Quezel et Santa., 1963).



Figure 3: Aspects morphologiques de *Micromeria inodora* (DESF.) BENTH; (Ivorra et Fuentes, 2016).

1-3-3. Classification botanique : selon (Quezel et Santa, 1962), Le classement de *Micromeria inodora* dans le règne des plantes est comme suit

Règne :	Plantae (végétale)
Embranchement :	Spermaphytes (phanérogames)
Sous embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Sous classe :	Metachlamydeés (gamopetales)
Ordre :	tubiflorales
Sous ordre	verbeninées
Famille :	Lamiaceae (labiae)
Genre :	<i>Micromeria</i>
Espèce :	<i>Micromeria inodora</i> (DESF.) BENTH

1-3-4. propriété thérapeutique:

Les espèces de *Micromeria* sont généralement consommées comme herbes thé et à des fins médicinales populaires dans les rhumes. Ils sont également utilisés contre les troubles cardiaques, les maux de tête, les plaies, et les infections cutanées. À la suite de récentes études, il a été démontré que l'huile essentielle de Les espèces de *Micromeria* présentent une activité biologique telle que antimicrobien, antibactérien, et antioxydant(Benomari et al.,2016).

1-4. La plante *Satureja candidissima* (Munby.) Briq.

1-4-1. Généralité

On appelle calament un certain nombre d'espèces de plantes vivaces de la famille des lamiacées originaires d'Europe et d'Asie occidentale (plus précisément d'Iran et d'Europe centrale).

Les calaments appartiennent aux sous genres : Acinos, Micromeria, Clinopodium et calamintha, qui sont regroupés au sein du même genre *Satureja* (kerbouche ,2009).

Parmi leur Synonymes : *Melissa candidissima* (Munby.) [1847], *Calamintha candidissima* (Munby.) Straighth., *Clinopodium candidissimum* (Munby.) Kuntze. *Calamintha candidissima* (Munby.) var *laxiflora* Faure et Maire. [1848] (Quezel et Santa , 1963). En Algérie, cette plante est connue de la population sous le nom de : Zaater cheleuh (Quezel et Santa , 1963) Nabta elbida.

1-4-2 . Description botanique

Plante de la famille des Lamiacées, couverte sauf dans l'inflorescence, d'un épais tomentum velouté blanchâtre. Feuilles ovoïdes. Fleurs courtement pédicellées rosées de 8-12 mm. Calice et inflorescence glabres. Pousse entre les lauriers-roses et les pelouses rocailleuses. En Algérie elle pousse spontanément à Oran et ses environs (Quezel P. et Santa S., 1963).



Figure 4 :Aspects morphologiques de *Satureja candidissima* (Munby.) Briq. (Attou, 2017) .

1-4-3. Classification botanique

Le classement de *Satureja candidissima* dans le règne des plantes est comme suit :

Domaine :	<i>Biota</i>
Règne :	<i>Plantae</i> Haeckel., 1866
Sous-Règne :	<i>Viridaplantae</i>
Division :	<i>Magnoliophyta</i> Cronquist, Takhtajan & W. Zimmermann., 1966
Classe :	<i>Equisetopsida</i> C.Agardh., 1825
Sous-Classe :	<i>Magnoliidae</i> Novák ex Takht., 1967
Super-Ordre :	<i>Asteranae</i> Takht., 1967
Ordre :	<i>Lamiales</i> Bromhead., 1838
Famille :	<i>Lamiaceae</i> Martinov., 1820
Genre:	<i>Satureja</i>
Espèce:	<i>Satureja candidissima</i> (Munby.) Briq.

1-4-4. Propriétés thérapeutiques :

Comme cette plante n'a pas fait l'objet d'études avant, on a fait une petite recherche sur ses utilisations traditionnelles, selon la population locale, « Nabta el bida » était efficace en cas de grippe, les vers intestinaux, les infections, et comme pansement pour la cicatrisation des brûlures et blessures. L'appartenance de *Satureja candidissima* à la famille des lamiacées, et la richesse de son huile essentielle en pulegone et en monoterpènes confère à cette plante plusieurs autres propriétés tels que: antimicrobienne, insecticide, larvicide et herbicide, spasmolytique, contre les troubles gastro-intestinal tels que l'indigestion et la diarrhée, anti-inflammatoire et analgésique.

En cuisine, elle est utilisée pour aromatiser les sauces ou pour préparer un plat traditionnel de la région, appelé « Rfiss » qui est une préparation avec de la semoule, beurre, sel, eau et la plante fraîche découpée, après cuisson on la découpe en morceaux et on la mélange avec du lait ou du beurre fondu, la même recette peut être faite avec *Satureja calamintha* Scheele. ssp. *nepeta* (Attou, 2017).

2. Composés phénoliques

Les poly phénols constituent l'un des groupes les plus nombreux et largement distribués des substances dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues. Les poly phénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux et présents dans tous les organes de la plante. Ils résultent biogénétiquement de deux voies synthétiques principales : la voie shikimate et la voie acétate (Lugasi et al., 2003).

Les composés poly phénoliques constitués d'un noyau aromatique comportant une ou plusieurs fonctions hydroxyles ainsi que des groupements fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside) (Kerbouche, 2009).

2-1. Classification des composés phénoliques

Selon Harborne (1989) les polyphénols peuvent être divisés en au moins 10 classes différentes selon leur structure chimique de base. Ils peuvent s'étendre de molécules simples, tels que les acides phénoliques, aux composés fortement polymérisés, tels que des tannins (Lugasi et al., 2003).

Les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes simples, proanthocyanidines) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes (Betta et al., 2005).

2-1-1. Acides phénoliques

Les acides sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales (**Psotova et al . , 2003**) .comme exemple d'acide phénolique ,On cite : l'acide chlorogénique , l'acide cafeique , l'acide protocatechique , l'acide vanillique , l'acide ferulique , l'acide sinapique et l'acide gallique .

2-1-2. Tannins

Les Tannins sont des polyphénols polaires d'origines végétales , existent dans presque chaque partie de la plante : écorce ,bois ,feuilles , fruits et racines , leurs poids moléculaires s'étendent de 500 à 3000 Da (**cowan,1999**) .il est difficile de les séparer dans un extrait végétale , parce que de nombreux isomères avec une base moléculaire très semblable coexistent (**Berthod et al . ,1999**) .En plus , des propriétés classiques des phénols ,les Tannins précipitent les alcaloïdes ,la gélatine et les protéines .

On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs , deux groupes de tannins différents par leurs structure aussi bien que par leur origine biogénique : les Tannins hydrolysables et les Tannins condensés dits aussi : proanthocyanidines (**Brunethon ,1999**) .

2-1-2. flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols ,ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux ,dont plusieurs sont responsables de couleur vive des fleurs , des fruits et des feuilles (**Pietta ,2000 ;Ghedira,2005**) .

2-1-2- 1 .Structure et classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes présentent un squelette de base à 15 atomes de carbone, fait de deux cycles en C6 reliés par une chaîne en C3. Le pont à 3 carbones entre les deux phényles forme généralement un troisième cycle pyrone. Tous les flavonoïdes environ 300 ont une origine biosynthétique commune, à savoir les flavones, les flavonols et les flavanones. Ils peuvent être regroupés en une dizaine de classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central (**Bruneton, 1987 ; 1999**).

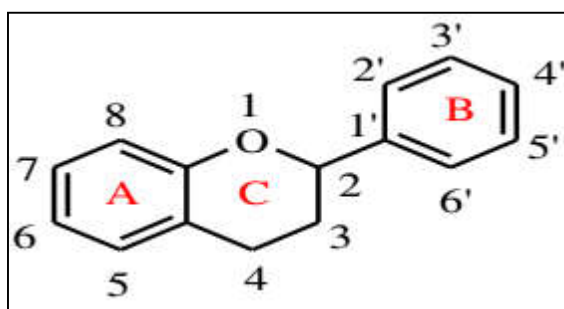


Figure 5 : Squelette de base des flavonoïdes (Erlund, 2004).

2-2. Rôle physiologique des composés phénoliques

Les flavonoïdes et d'autres polyphénols sont partiellement responsables des qualités sensorielles et alimentaires des aliments végétaux . L'astringence et l'amertume des nourritures et des boissons dépendent de la teneur des polyphénols **(Lugasi et al . , 2003)** .

Des anciens travaux **(Alibert et al . , 1977)** ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques :croissance cellulaire , différenciation , organogénèse, dormance des bourgeons , floraison et tubérisation .

Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs , des fruits et des feuilles ,Ils sont universellement présents dans les cellules épidermiques des feuilles , et sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnements UV **(Hadi,2004)** .

Les pigments responsables de la coloration des fleurs représentent des signaux visuels qui attirent des animaux pollinisateurs. La plupart de ces pigments sont des anthocynes , des aurones et des chalcones . D'autres polyphénols incolores tels que des flavonols et flavanones interagissent avec des anthocyanes pour altérer , par co-pigmentation , la couleur des fleurs et fruits **(Brouillard et al . , 1997)** .

Les cellules végétales répondent au stimuli environnemental en synthétisant les métabolites secondaires qui peuvent les protéger contre les agents de l'agression par la formation d'un tissu cicatriciel résistant aux infections **(Misirli et al .,2001)** .

L'attaque de microbe pathogène telle que le virus , les bactéries ou les mycètes induit une cascade de réactions qui peuvent mener à la résistance étant exprimée à l'emplacement de l'infection ou dans d'autres parties non infectées de la plante .Cette résistance systématique implique l'existence d'un signal endogène transféré de l'emplacement d'infection à d'autres parties de la plante . On pense que la première étape du mécanisme de la défense comporte une accumulation rapide des phénols à l'emplacement d'infection , qui fonctionnent pour ralentir la croissance du microbe pathogène **(Misirli et al .,2001)**.

La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques **(Rees et Harborne , 1985)**.Les mécanismes de l'action et de l'interaction , et les produits chimiques qu'ils contiennent demeurent dans la plupart indéterminés .Des chercheurs deviennent graduellement intéressés dans l'identification des principes actifs dans les extraits avec l'étude complémentaire intensive de leurs mécanismes d'action **(Sun et al . ,2002)**.

Les principales activités biologiques des composés phénoliques sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2 : Activités biologiques des composés phénoliques.

Polyphénols	Principales activités
Acides phénols (cinnamique et benzoïque)	Antibactériens, Antifongiques et antioxydants.
Coumarines	Vasoprotectrices et antioedémateuses
Flavonoïdes	Antitumorales, anticarcinogènes, anti-inflammatoires, hypotenseurs, diurétiques et antioxydants.
Anthocyanes	Protection des veines et capillaires.
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène, antioxydants, antitumorales, antifongiques, et anti-inflammatoires.
Tannins galliques et catéchiques.	Antioxydants.

3. Activité antimicrobienne

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutané-muqueux. 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**).

L'activité antimicrobienne des extraits de plantes ont formé la base de beaucoup d'applications, y compris, pharmaceutiques, thérapie naturelle et la conservation des aliments (**Sagdic et al., 2002**).

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrolases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (**Cowan, 1999**).

3-1 . principales substances antimicrobiennes

3-1-1 . 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 Dellamonica, 1995**).

3-1-2. Composés phénoliques

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 (apigénine, kaempférol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif (*Escherichia coli*) et Gram positif (*Staphylococcus aureus*) (**Ulanowska et al., 2007**).

Des flavonoïdes, une flavone et une flavanone, respectivement isolés des fruits de *Terminalia bellerica* et de l'arbuste *Eysenhardtia texana* ont été montré comme possédant l'activité contre le microbe pathogène opportuniste *Candida albicans* (**Wächter et al., 1999**). Deux autres flavones isolés de la plante *Artemisia giraldi* ont été rapportés exhiber une activité contre l'espèce *Aspergillus flavus* une espèce de mycète qui cause la maladie envahissante chez les patients immunosuppresseurs (**Valsaraj et al., 1997**).

Chapitre II

MATERIEL ET

METHODES

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1-Matériel végétale :

Le matériel végétale au quel nous nous sommes intéressé est constitué de trois espèces de la famille des lamiacées et un seul espèce de la famille des astéracées (**tableau 3**).

1-1 la récolte des plantes

les plantes étudiées ont été récoltées au niveau de plusieurs sites en Algérie (**tableau3**).

1. *Thymus munbyanus ssp. coloratus* (Boiss. & Reut.) Greuter & Burdet :

Les inflorescences, les tiges et les feuilles ont été séparément cueillies le mois de mars 2015 au niveau de Mechta Fatima, Bordj Bou Arreridj.

2. *Pallenis spinosa* L. (Cass.):

Les parties aériennes ont été collectées durant l'été 2015, à bordj ghdir (bordj bou Arreridj, Algérie).

3. *Micromeria inodora* (Desf.) Benth :

Les parties aériennes ont été collecté à partir d'individus se développant spontanément dans la région des lions Mountain, Oran.

4. *Satureja candidissima* (Munby.) Briq. :

Les inflorescences, les tiges et les feuilles ont été collecté chez des individus qui poussent spontanément dans la région de Djebel Murdjadjo, Oran.

1.2 Identification botanique :

L'identification botanique a été faite par Dr. MIARA Mohamed Djamel (Maitre de conférences au département de biologie, faculté des SNV, Université de Tiaret) par le biais de flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales (**Quézel et Santa, 1962-1963**).

Tableau 3 : paramètres géographiques des stations de récolte des plantes étudiées :

La plante	famille	station	Altitude(m)	Latitude	Longitude
1. <i>T.munbyanus</i> <i>Subsp coloratus</i>	Lamiacées	Mechta Fatima, Bordj Bou Arreridj (Nord- Est Algerie Mars 2016	928 m	N 36°.06'	E 04°76'
2. <i>Pallenis</i> <i>spinosa</i>	Astéracées	bordj ghdir (bordj bou Arreridj, Algerie).2015	1 056 m	N 35.91248	E 4.924707
3. <i>Micromeria</i> <i>inodora</i>	Lamiacées	region de lions Mountain Oran	200 m	N 35.798917	O 0.489923
4. <i>Satureja</i> <i>candidissima</i> = <i>Calamintha</i> <i>candidissima</i> (<i>Munby</i>) <i>Benth.</i>	Lamiacées	Djebel Murdjado, Oran Mars 2016.	200 m	N 35.701930	O 0.721408

1.3. Préparation des échantillons

Après récolté le matériel végétal , nous avons procédé au séchage à la température ambiante (20 – 25°C) pendant environ un mois à l'air libre , jusqu' à la stabilisation de leur masse afin d'éviter d'éventuelles risques d'oxydation des polyphénols et de préserver au maximum l'intégrité des molécules . Ensuite, les échantillons ont été récupérés dans des sacs propres et stockés à l'abri de la lumière et d'humidité .

2. Méthode d'analyse

2.1. Préparation des extraits

Le matériel végétal a été broyé à l'aide d'un broyeur avec un tamis de 2 mm . cette poudre est conservée à température ambiante , à l'abri de la lumière et de l'humidité .

Le broyat va constituer la matière sèche qui va servir à l'extraction .

Le solvant d'extraction est été choisis de manière à solubiliser un maximum de composés .

Le solvant d'extraction qui est ainsi été testé est : le Méthanol (MtOH) qui possède la polarité et qui va permettre d'obtenir des extraits polaires .

2.1.1. Extrait méthanolique

L'extrait méthanolique de ces plantes étudiées a été préparé à partir de 10 g de broyat , qui ont été mis à macérer dans 100 ml de méthanol à la température ambiante pendant 4 à 5 heures, avec un maximum d'agitation. Ensuite le mélange est filtré sur papier Whatman (n°1). L'opération est répétée une seconde fois sur le marc avec 50 ml de méthanol. Les filtrats obtenus sont additionnés et évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif "BÜCHI" (**figure 6**) à une température de 40 - 50 °C. L'extrait sec est conservé au réfrigérateur .(**Bendif et al . ,2017**).



Figure 6 : évaporateur rotatif "BÜCHI" .(Photo de Benlecheheb ,M'sila 2018) .

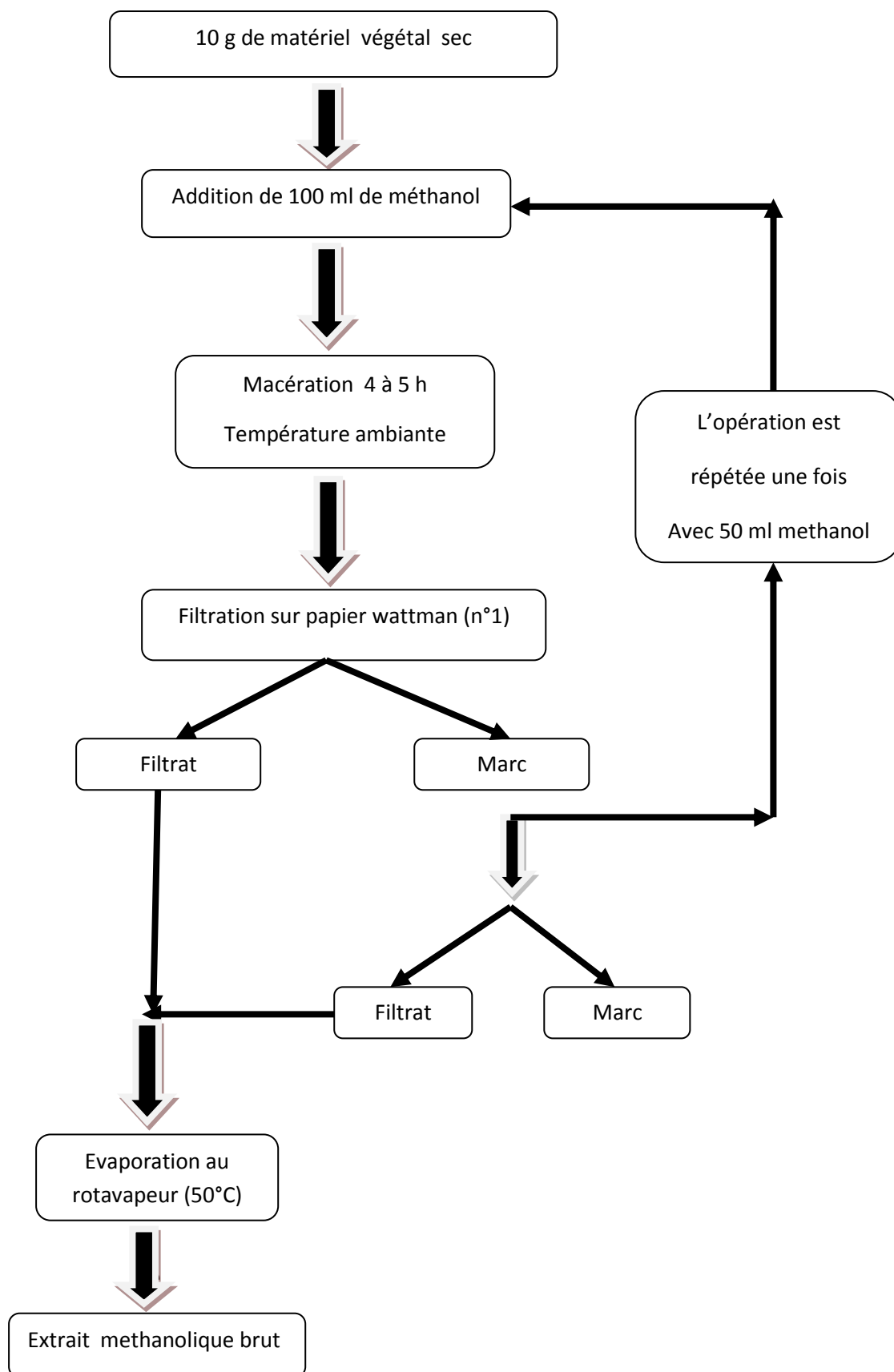


Figure 7: Protocole de préparation de l'extrait méthanolique des plantes étudiées par macération (Bendif et al .,2017) .

2.2. Analyse chimique

2.2.1. Détermination du rendement des extraits

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction.

Le rendement a été calculé par la formule suivante : $R (\%) = M / M_0 \times 100$

Avec : M : la masse en gramme de l'extrait sec résultant.

M₀ : la masse en gramme des plantes étudiées .

2.2.2. Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques ont pour but de détecter les différentes familles de métabolites secondaires existant dans notre extrait, en se référant à des réactions qualitatives de caractérisation, basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés.

Les résultats ont été évalués comme suit (**annexe1**) :

+++ : Fortement positif ; ++ : Moyennement positif ; + : Faiblement positif ; - : Négatif.

a. Composés phénoliques

un volume de 10 ml de chlorure d'hydrogène (HCl) est ajouté à 10 ml d'infusé méthanolique . un test positif est révélé par la coloration vert en présence de polyphénols .

b. Flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoides consiste à traiter 2,5 ml de l'extrait méthanolique avec 0,5 ml d'HCl concentré et quelques copeaux de magnésium (Mg) .

La présence des flavonoides est mise en évidence si la couleur rose ou rouge se développe après 3 min (**Bruneton,1993**) .

c. Tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant ,à 1ml de l'extrait méthanolique ,2ml d'eau et entre 2 à 3 gouttes de chlorure de fer (FeCl₃) diluée.

Un test positif est révélée par l'apparition d'une coloration bleue-noire (Tanins galliques),vert ou bleu-verte (Tanins catéchique) (**Trease et Evans, 1987**).

d. Les quinones

une solution de 1 ml d'extrait à analyser à laquelle on ajoute quelques gouttes de lessive de soude (NaOH à 10%) vire au jaune, indiquant la présence de quinones (**Edeoga et al., 2005**).

e . Les anthraquinones

A 1ml d'extrait à analyser, on introduit quelques gouttes de KOH à 10% ; après agitation la solution vire au rouge, ce qui traduit la présence des anthraquinones (**Edeoga et al., 2005**).

f . Les terpenoïdes

A 5ml d'extrait sont ajoutés 2ml de Chloroforme et 3ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré. La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase indique la présence de terpenoïdes (**Edeoga et al., 2005**).

g. les saponosides

La détection des saponosides est réalisée en ajoutant 1ml d'extrait à 2ml d'eau chaude , après agitation (2min) l'apparition d'une mousse persistante plus de 5 min ,indique la présence de saponosides .

2.2.3. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu (**Singleton et al., 1999**).

2.2.3.1. Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PMo₁₂O₄₀) et phosphomolibdique (H₃PMo₁₂O₄₀), il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃), (**Ribéreau-Gayon et al., 1972**). Cette coloration bleue (**annexe 2**) dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 760 nm.

2.2.3. 2.Mode opératoire

Mettre 20 µl de chaque extrait de notre plantes étudiées dans des tubes à essais ; ajouter 1.58 ml d'eau distillée et 100 µl de réactif de Folin-Ciocalteu dilué dans H₂O distillée (v/v) dans chaque tube; agiter vigoureusement puis laisser agir 6 min avant d'ajouter 300 µl de carbonate de sodium à 7.5%.

Après 2 heures d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible (Spectronic 20 Genysis TM) à 760 nm. Effectuer la même opération pour l'acide caféique à différentes concentrations en introduisant 20 µl de ces dernières dans une série de tubes et ajout des autres réactifs. (**Figure 9**) .

Le blanc est représenté par l'éthanol additionné du Folin-Ciocalteu, de l'eau distillée et de carbonate de sodium.

Toutes les mesures sont réalisées en triplicata.

2.2.3.3.Expression des résultats

Les concentrations des polyphénols totaux contenus dans les extraits sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent en acide gallique/ g de matière fraîche. (**Figure 8**).

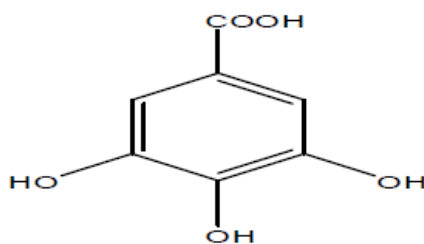


Figure 8: Structure de l'acide gallique.

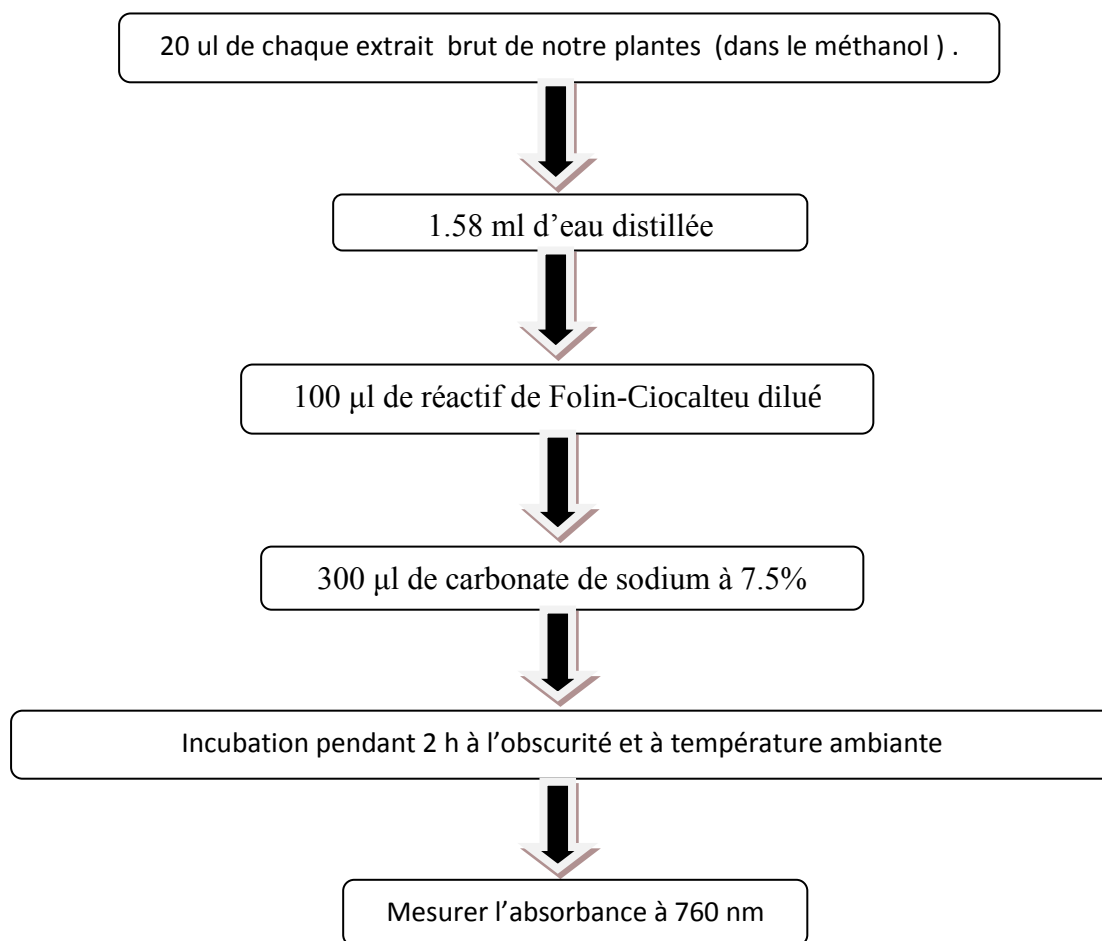


Figure 9: Etapes du dosage des polyphénols totaux .

2.2.4. Dosage des flavonoïdes

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les extraits est réalisée par la méthode de **Bahorun et al. (1996)**.

2.2.4.1. Principe

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres (**voire l'annexe3**) par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (**Ribéreau-Gayon et al., 1972**).

2.2.4.2. Mode opératoire

Mettre 1 ml d'extraits de dans un tube à essai ; Ajouter 1 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 2 % ; laisser incuber 15 min à température ambiante.

Lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible (Spectronic 20 Genysis TM) à 430 nm (**Figure 11**).

Effectuer la même opération pour la quercétine à différentes concentrations en introduisant 1 ml de ces dernières dans une série de tubes et ajout de 1 ml d'AlCl₃ à 2%.

Le blanc est représenté par l'éthanol additionné à l'AlCl₃, toutes les opérations sont réalisées en triplicata. (**Figure 10**) .

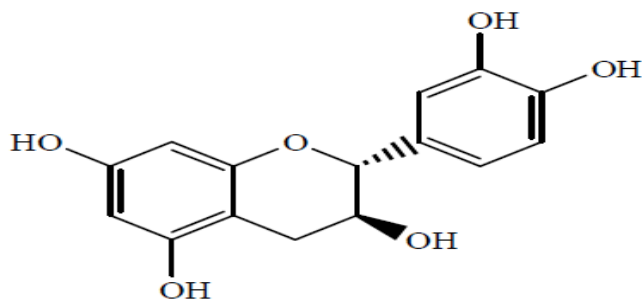


Figure 10: Structure de la quercétine .

2.2.4. 3. Expression des résultats

Les concentrations des flavonoïdes contenus dans les extraits sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard, les résultats sont exprimés en mg équivalent en quercétine/ g de matière fraîche.

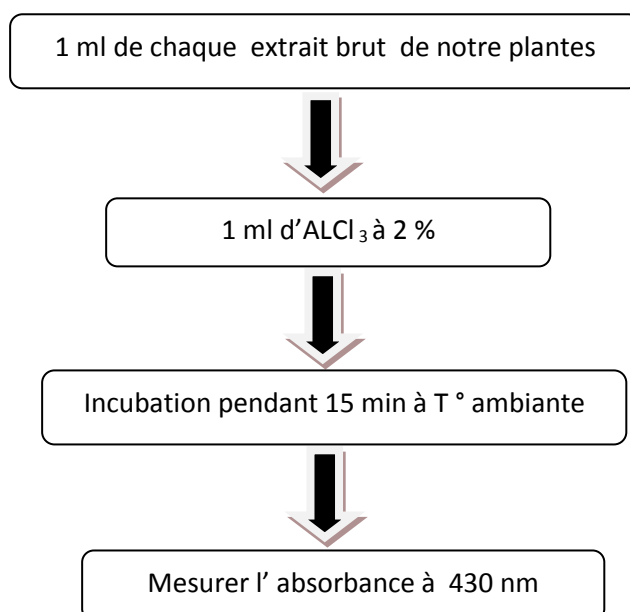


Figure 11: Etape du dosage des flavonoïdes .

3. L'activité antimicrobienne

3.1. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits bruts de notre plantes étudiées a été testée selon la méthode de disque selon l'institut de normalisation clinique et de laboratoire (CLSI,2012) .

3.1.1. Provenance des souches testées

Les souches qui ont été testées sont des souches de références représentées dans le tableau qui au dessous .

Tableau 4: Les différents microorganismes testés .

	Espèces	Références	Origine	Habitat préférentiel	Pouvoir pathogène
Bactérie Gram +	Staphylococcus aureus.	ATCC 25923	Laboratoire de microbiologie appliquée (pôle universitaire) M'sila .	Peau, cheveux Nasopharynx Périnée Poussières,air Aliments Contaminés	Infections cutanées ,plaies , Brûlures ,abcès Ostéites ,osteomyélites Endocardites Septicémies Infections pulmonaires Infections alimentaires , Nosocomiales .
Bactérie Gram+	Bacillus cereus	ATCC 11778		Sol, l'intestin humain.	Infection alimentaires ,nosocomiales .
Bactérie Gram-	Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853		Sol,eau ,plantes Voies respiratoires Matières fécales Réfrigérateurs Appareils sanitaires	Infections pulmonaires ,brûlures plaies Septicémies Infections alimentaires, nosocomiales.
Bactérie Gram-	Escherichia coli .	ATCC 25922		Matières fécales Aliments contaminés Eaux usées	Infections urinaires Plaies Septicémies Infections respiratoires Infections alimentaires nosocomiales. Gastro-entérite .
Bactérie Gram-	Proteus mirabilis .	ATCC 35659		Eau, sol, tube digestif .	Infections urinaires Infections cutanées .
Levures	Candida albicans	ATCC 6633		Tube digestif	Septicémies et infections viscérales candidoses superficielles La candidose Infection cutanée.
Moisissure	Aspergillus Niger			Sol, les débris végétaux ,les fruits pourris .	Infections alimentaires infections cutanées Cancer hépatique chez l'animal et humains.

3.1.2. Stérilisation du matériels

L'eau distillée, le milieu de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

3.1.3. Préparation des dilutions d'extraits des plantes étudiées

Les extraits des plantes étudiées ont été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour avoir une concentration de 50 mg /ml .

3.1.4. Repiquage des souches bactériennes

Les souches ont subi une série de repiquage continus pendant une nuit à 37 °C dans la gélose nutritive ,par la méthode des stries pour s'assurer de leur pureté (afin d'obtenir une culture jeune, et des colonies isolées .

3.1.5. Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes sontensemencées dans la bouillon nutritive (**voire annexe 4**) et incubées à 37°C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. La suspension bactérienne est bien homogénéisée, Les concentrations bactériennes des incula sont évaluées par turbidité , correspond à $1-2 \times 10^8$ UFC /ml (0 ,5 Mc Farland) .

3.1.6. Ensemencement et dépôt des disques

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est Frotté sur la totalité de la surface gélosée de Mueller Hinton(MH), de haut en bas en stries serrées.

L'opération est répétée deux fois en tournant la boite de 60° à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche. Les disques stériles de 6 mm diamètre imprégnés de 10µL d'extraits à tester , où ils sont séchés ,ont été déposés stérilement à la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile.

De même les antibiogrammes réalisés avec des disques contenant des antibiotiques (témoin positif) appropriés prêts à l'emploi ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des extraits testés et les disques Wattman imprégnés de DMSO (témoin négatif). Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C.

3.1.7. Lecture des antibiogrammes

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques.

3.2. Activité antifongique

3.2.1. Préparation de l'inoculum

Les mêmes opérations sont effectuées avec les souches des champignons, . Les champignons sont activés pendant 7 jours dans des boîtes de Pétrie à une température de 28°C avant le test, après incubation l'inoculum des champignons et levures est préparé dans solution saline (**voire annexe 5**) avec turbidité correspond 10^6 UFC /ml pour les levures et l'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri coulés dans le milieu de culture de gélose Muller Hinton pour l'*Aspergillus Niger*, et sur le milieu gélose de MH supplémenté de 2% glucose et 0,5 µg du bleu de Méthylène pour la levure *C. albicans*.

3.2.2. Lecture des antibiogrammes

La lecture des antibiogrammes est faite après 72 heures d'incubation à 28°C et 48h pour *C.albicans*.

Analyse statistique :

Les données de l'analyse de l'activité antimicrobienne des extraits, ont été analysées par le logiciel SAS 9. Les moyens de traitements pour chaque expérience ont été comparés en utilisant le test de Duncan au seuil de probabilité de 5 %. Sur le tableau, chaque moyenne est affectée d'une lettre et les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes.

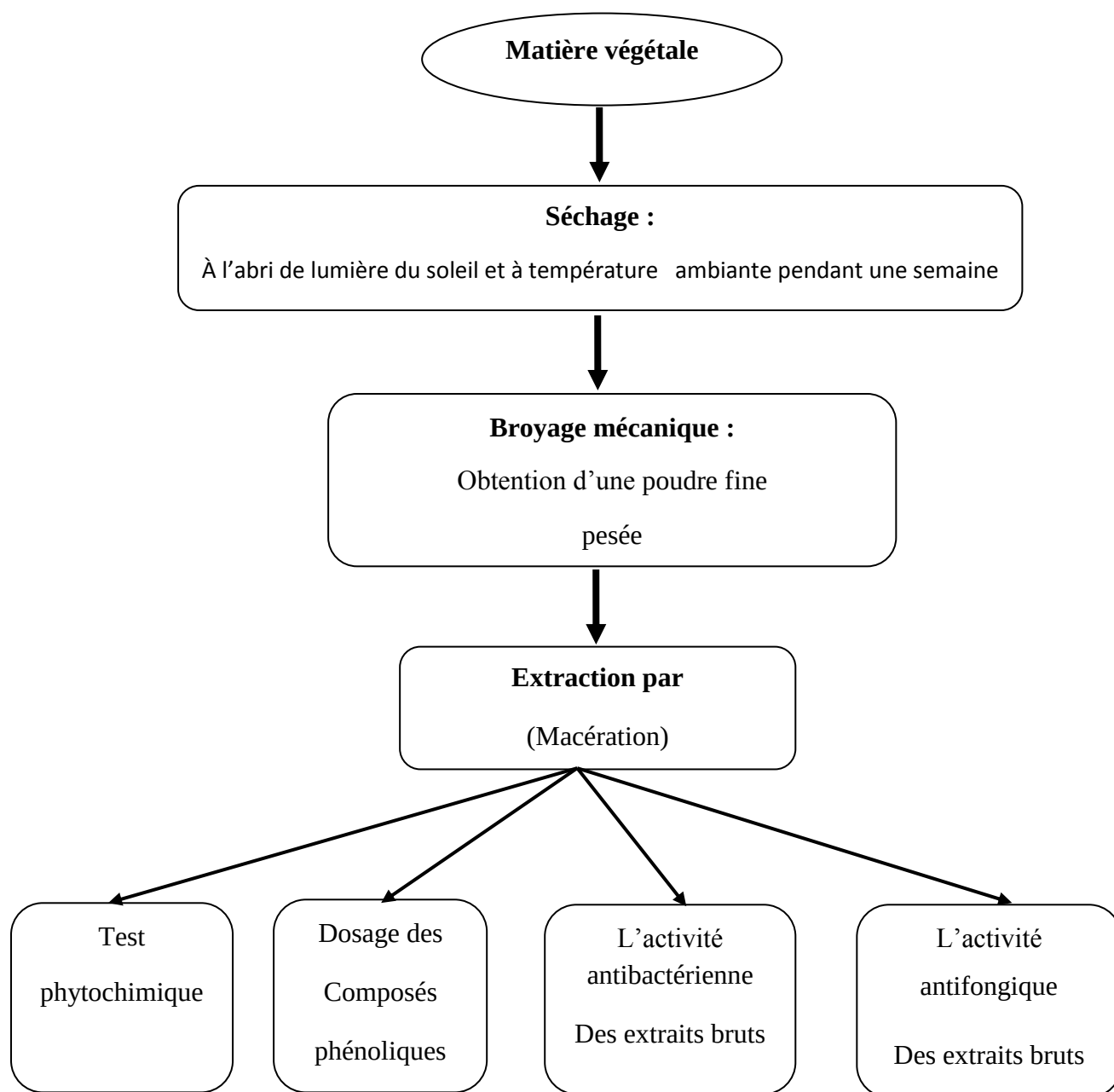


Figure12 :Schéma illustrant la démarche expérimentale suivie dans cette étude .

Chapitre III

RESULTATS ET

DISCUSSIONS

Chapitre III Résultats et Discussion

1. Rendements de l' extraction

Les plantes étudiées dans ce travail ont été macérées deux fois dans le Méthanol pendant 4 à 5heurs par fois. ce qui a permet l'obtention des extraits bruts méthanolique (EbMeOH).

Les rendements de leurs extraits bruts sont mentionnés dans **le tableau5 et la figure13** ci-dessous. Le rendement est exprimé en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse de la plante fraiche, déterminé par la formule indiquée dans la partie matériels et méthodes .

Tableau 5 : rendement de l'extraction de quatre plantes étudiées.

N	plant	Rendement %
1	<i>Thymus munbyanus coloratus</i>	9,559631
2	<i>Pallenis spinosa.</i>	10,65806
3	<i>Micromeria inodora (Desf.) Benth.</i>	8,906667
4	<i>Satureja candidissima (Munby) Benth.</i>	12,23611

Nous constatons que les rendements de l'extraction méthanolique varient considérablement. Les pourcentages enregistrés sont compris entre 09,55 et12,23 %. L'espèce *Satureja candidissima (Munby) Benth* ,donne clairement le meilleur rendement (12,23 %) suivie par la plante *Pallenis spinosa* avec un rendement de 10,65 % ; puis la plante *Thymus munbyanus coloratus* avec un rendement de 9,55% . Le faible rendement est celui de la plante *Micromeria inodora (Desf.) Benth* de l'ordre de 8,90 %.

Cette différences entre les rendements d'extraction obtenus pour les différentes espèces est due aux facteurs climatiques (chaleur , froid), géographiques(altitude, nature du sol taux d'exposition au soleil) et la nature des plantes aromatiques .

Le rendement d'extraction est tributaire de plusieurs facteurs qui peuvent influencer les performances de l'extraction, tels que la taille des particules, la nature du solvant, la température, le temps d'extraction et le degré d'agitation.

Au vu de la bibliographie, il n'y a pas de travaux réalisés sur la composition chimique des extraits bruts méthanoliques de notre espèces étudiées. Mais en comparaison avec d'autres plantes médicinales , comme les résultats trouvées par(**Dahdouh et Bentahar , 2016**) de *Foeniculum vulgare* sont moins inferieure que nos résultats par 3.6% , et (**Harrar,2011**), trouvé une valeur assez proche de notre résultats avec un rendement de 11 % (m/m) par macération de *Rhamnus alternus L* .

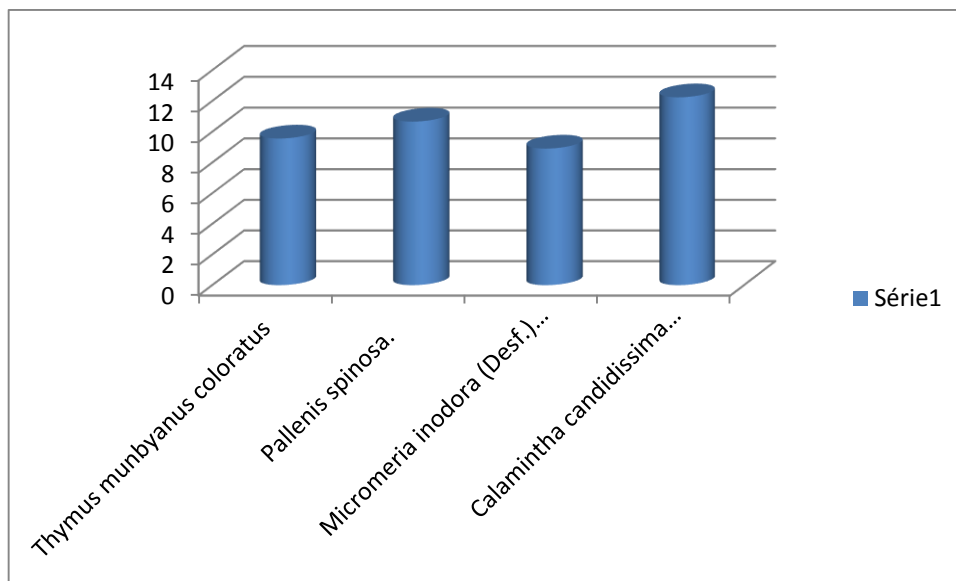


Figure 13 : rendement de l'extraction de quatre plantes étudiées.

2. Composition chimique

2.1. Screnning phytochimique

L'analyse qualitative de la poudre des plantes qui a pour but la mise en évidence la présence de certains types de métabolites secondaires, par des réactions de caractérisation qualitatives, des réactions qui sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques présentés dans le **tableau 6 ,et annexe 1** .

Tableau 6 : Résultats du screnning phytochimique des plantes étudiées.

plantes	Composés phénoliques	Flavonoïdes	Tanins	quinones	anthraquinones	terpenoïdes	saponosides
T.munbyanus	^{+c}	+	+	+++	+++	+	^{-d}
P.spinosa	^{++b}	+	+++	+	+++	+++	-
M.inodora	+	++	++	++	+++	+++	+
S.candidissima	++	^{+++a}	+	+++	++	+++	+

^{+++a} : Réaction très positive. ^{++b} : Réaction moyennement positive. ^{+c} : Réaction faiblement positive. ^{-d} : Réaction négative.

Sur l'ensemble des résultats obtenus, nous remarquons que les plantes étudiées sont plus ou moins riches en métabolites secondaires. Les tests phytochimiques réalisés nous ont permis d'avoir une idée générale sur la composition chimique des plantes étudiées.

2.2. Teneur en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des extraits bruts des plantes étudiées est déterminée par la méthode de Folin- Ciocalteu, en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique utilisé comme standard (**Fig 14**). Les teneurs sont exprimées en μg équivalent d'acide gallique/mg d'extrait (μg EAG/mg d'extrait), et déterminé par l'équation de type : $y = 0,010x + 0,006$ sachant que $R^2 = 0,999$ (**Figure 15**).

Selon les résultats mentionnés dans **le tableau 7 et la figure 15**, les teneurs en phénols totaux varient largement dans les extraits bruts (de 58.78 à 108.59 μg EAG/mg).

Parmi les quatre espèces étudiées, la plante de *Pallenis spinosa* possède la meilleure Teneur (108.59 μg EAG/mg). La plante de *Thymus munbyanus coloratus* et *Micromeria inodora* (Desf.) Benth ont aussi des teneurs en composés phénoliques élevées par rapport la teneur De dernier plante (78.13 et 63.32 μg EAG/mg respectivement). Le dernier teneur a été enregistrée dans l'extrait brut de *Satureja candidissima* (Munby) Benth (58.78 μg EAG/mg) .

Peu de données bibliographiques concernant la teneur en composés phénoliques des plantes choisies sont disponibles.

Nos résultats de La teneur en polyphénols totaux sont inférieures que celles déposés par (Yakhlef et al., 2011) de *Thymus vulgaris* $165,45 \pm 32,14$, *Laurus nobilis* $166,81 \pm 8,69$ μg EAG/mg .

La faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines etc. (Gmez-Caravaca et al., 2006; Vuorela, 2005).

Le solvant d'extraction élu des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique (Djeridane et al., 2007). Le dosage par ce réactif donne donc une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait.

Il n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé (**Tawaha et al., 2007**).

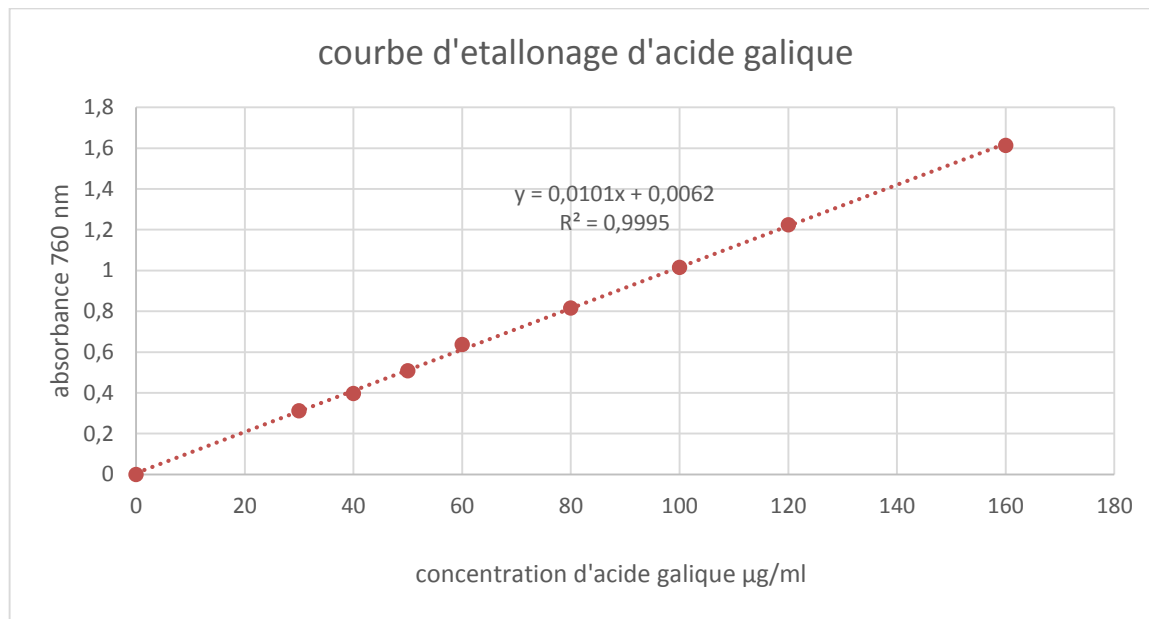


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

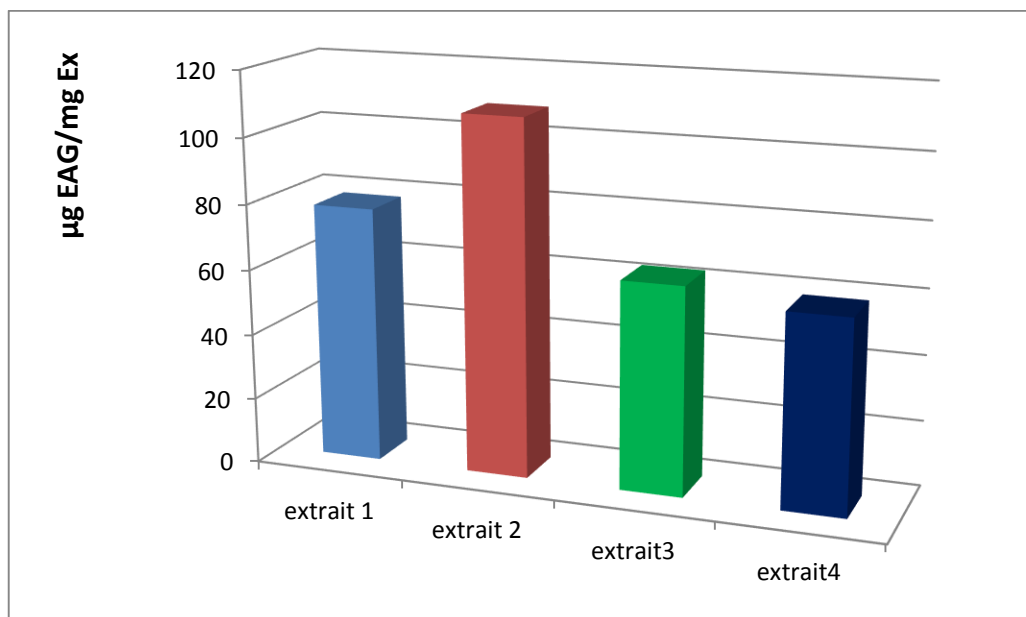


Figure 15: la teneur en polyphénols des extraits de quatre plantes étudiées.

2.3.Teneur en flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et l'étalon été la quercétine (**Fig 16**). La teneur est exprimée en µg équivalent de quercétine/mg

d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait). Les taux des flavonoïdes des quatre extraits bruts méthanoliques des plantes étudiées ont été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage qui suit une équation de type : $y = 0,037x + 0,004$ sachant que $R^2 = 0,999$.

Les concentrations des flavonoïdes (**Fig 17 et tableau7 ci-dessous**) sont relativement importants dans les extraits dans leur majorité, les teneurs en flavonoïdes sont de $40.92 \mu\text{g EQ/mg}$ dans l'extrait brute de la plante de *Satureja candidissima* (Munby) Benth suivie de celles de L'extrait brute de *Thymus munbyanus coloratus* et *Pallenis spinosa* avec 31.91 et $31.31 \mu\text{g EQ/mg}$ respectivement et enfin celle d'extrait brut de *Micromeria inodora* (Desf.) Benth avec $11.18 \mu\text{g EQ/mg}$ est faible par rapport autres plantes étudiées .

Plusieurs facteurs peuvent influencer la teneur en composés phénoliques tels que les méthodes d'extraction, les facteurs géographiques et climatiques, le patrimoine génétique, la période de la récolte, le degré de maturation de la plante ainsi que la durée de stockage (**Pedneault et al., 2001**).

Tableau7 : Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des extraits de quatre plantes étudiées.

Extrait	Polyphénols ^(a)	Flavonoïdes ^(b)
<i>Thymus munbyanus coloratus</i>	78.13201	31.91615
<i>Pallenis spinosa</i> .	108.594	31.31467
<i>Micromeria inodora</i>	63.32453	11.18726
<i>Satureja candidissima</i>	58.7855	40.92652

^(a) : $\mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait.

^(b) : $\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait.

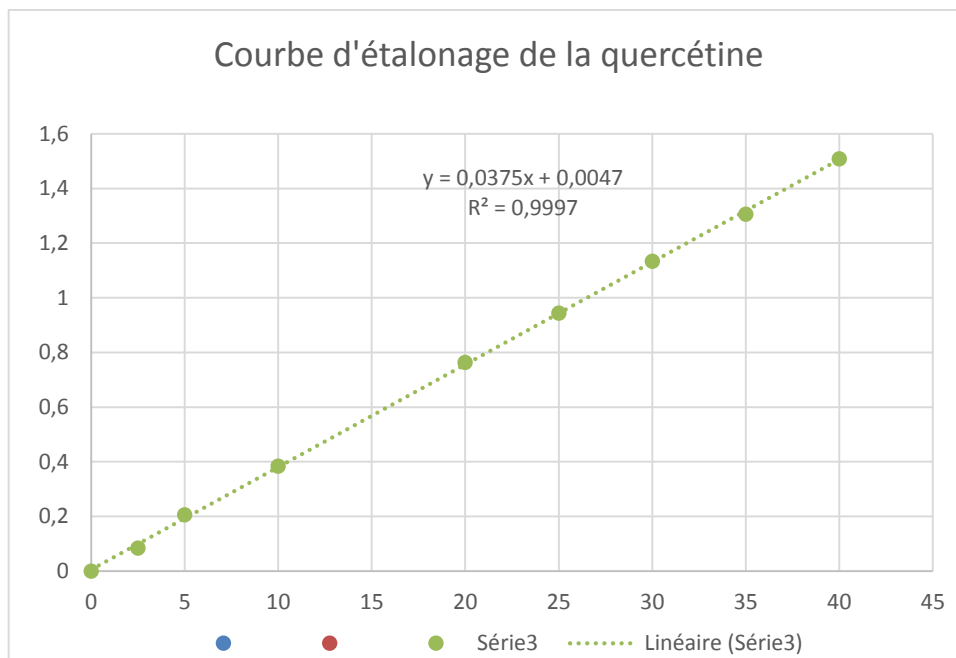


Figure 16 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

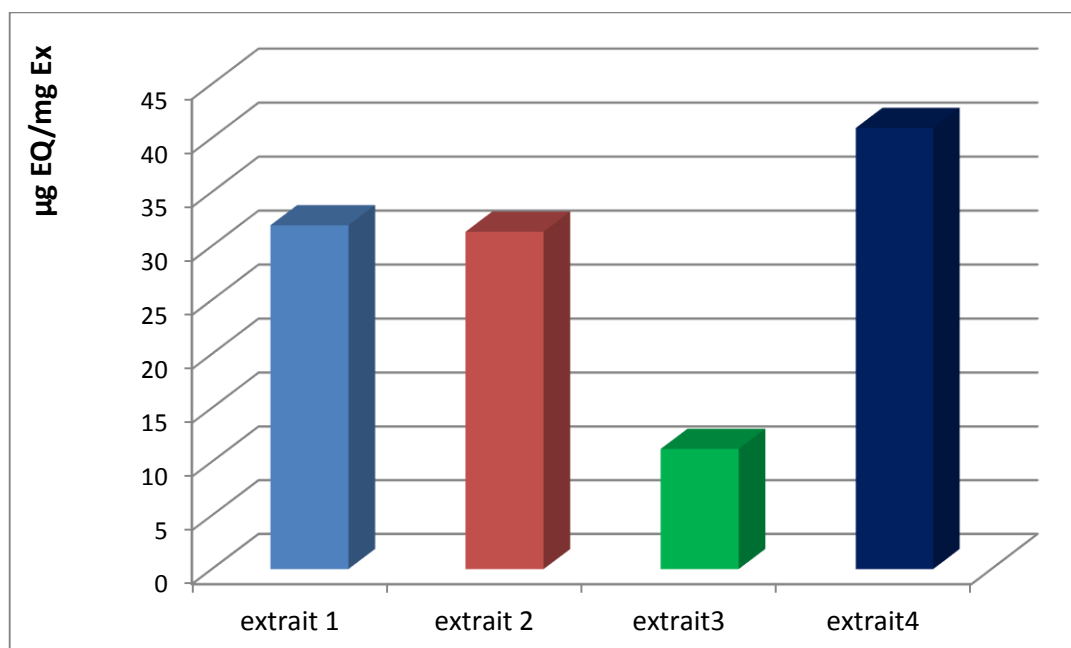


Figure 17 : la teneur en flavonoïdes des extraits de quatre plantes étudiées.

3.L'activité antimicrobienne

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antimicrobien des extraits bruts méthanoliques des quatre plantes médicinales choisies par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosés solides, Mueller-Hinton pour les bactéries et les moisissures ,et sur le milieu gélose de MH supplémenté de glucose et du bleu de Méthylène pour la levure.

L'activité antimicrobienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de sept (07) germes pathogènes d'origine hospitalière dont onze (05) bactéries Gram + et Gram - et deux (02) champignons à savoir un seule moisissure et une levure .

3.1. Résultats du test préliminaire

Si les extraits doivent être soumis aux essais biologiques, la toxicité du solvant peut également être critique car même en traces, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique. L'attention devrait également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et les corps dissous pendant que le solvant peut réagir avec certains composés pour produire des complexes ou pour causer la décomposition, la déshydratation, ou l'isomérisation de ces composés (Yrjöen, 2004).

Pour cela le DMSO a été testé comme solvant, les résultats montrent que le solvant est approprié et ne présente aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes.

3.2. Activité antibactérienne des extraits bruts par la méthode des disques

Les résultats de l'activité antibactérienne *in vitro* des extraits bruts méthanoliques des quatre plantes médicinales étudiées sont confiés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 8: Diamètre de la zone d'inhibition des extraits méthanoliques des quatre plantes médicinales étudiées.

Extrait méthanolique des plantes	Diamètre des zones d'inhibition de la croissance (mm)						
	Bactéries à Gram négatif			Bactéries à Gram positif		Levure	Champignon filamenteux
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>E coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>T.munbyanus coloratus</i>	14,33±3,05 ^b	13,33±1,52 ^c	11,33±1,5 ^b	13±1 ^b	19,33±3,05 ^b	10±2 ^b	0±0 ^c
<i>P.spinosa</i>	20,66±4,50 ^b	27,66±3,78 ^a	13,66±13,22 ^b	13,66±2,08 ^b	12,33±1,52 ^c	10,33±2,51 ^b	14,66±1,52 ^a
<i>M.inodora</i>	17±4,35 ^b	19±2,64 ^b	26,66±4,16 ^a	22,66±4,61 ^a	18,66±1,15 ^b	12,33±2,08 ^b	0±0 ^c
<i>S.candidis-sima</i>	21,66±2,88 ^b	15,66±2,08 ^c	14,66±3,05 ^b	13,66±1,52 ^b	21,66±1,52 ^b	12±1,73 ^b	0±0 ^c
Amoxicilin 25µg/ml	20,00±1,00 ^a	17,00±0,00 ^a	20,00±1,00 ^a	20,33±0,58 ^a	21,33±0,58 ^a	-	-
Amphotéricine B	-	-	-	-	-	22,33±0,58 ^a	12,67±0,58 ^a

-: Aucune inhibition.^(a,b,c) :le classement des microbiennes .

* Les valeurs sont la moyenne de trois mesures $\pm$ Ecart type.

Les effets inhibiteurs de la croissance des germes sont manifestés par des extraits bruts à partir d'une concentration de 50 mg/ml, sur 5 bactéries et deux champignons . Les diamètres d'inhibition sont en fonction de la dose de 10 μ l sur le disque.

Au vu des résultats, nous avons remarqué que les bactéries à Gram négatif sont plus sensibles que les bactéries à Gram positive où elle a enregistré chez *E.coli* par 27,66 à la plante de *P.spinosa* ,ceci est dû à structure de leurs membranes externes . Et la plus faible valeur enregistrée à *proteus mirabilis* par 11,33 mm .

Les extraits méthanoliques obtenus de *P.spinosa* et *M.inodora* et *S.candidissima* présentent l'activité antibactérienne la plus élevée vis-à-vis des souches *E coli*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* avec des diamètres d'inhibition de 27,66 ; 26,66 ; 22,66 ; 21,66 mm respectivement, Il est clair que l'activité antibactérienne de ces extraits reste supérieurs à celle de l'antibiotique de référence: Amoxicilin 25 μ g/ml , et à partir de là ,ces extraits peuvent compenser pour sa place .

Nos résultats est supérieure que celles résultats trouvées par Bouchouqa,2016. Des plantes médicinales de *C. violacea*, des feuilles de *P. laevigata* et des parties aériennes de *A. radiata* vis-à-vis de la souche *S. aureus* à la concentration en extrait de 200 mg/ml avec des diamètres d'inhibition de 17,03 ; 14,09 et 12,94 mm respectivement.

Les extraits bruts méthanoliques de quatre plantes étudiées sont significativement moyenne contre *C .albicans* avec des diamètres d'inhibition entre 10 et 12 mm ,à été inférieure de l'antifogique Amphotéricine où il a marqué 22,33mm de diamètre d'inhibition .

Aucune inhibition d'*Aspergillus niger*, n'a été enregistrée avec tous les extraits bruts à l'exception de l'extrait de *P.spinosa* qui a montré une activité antibactérienne significative avec un diamètre de zone d'inhibition de 14,66 mm, reste supérieure à celle de l'antifogique de référence: Amphotéricine B avec 12,67mm .

Cowan (1999) a rapporté que les différentes classes de poly phénols essentiellement les tanins et les flavonoïdes peuvent augmenter la toxicité des extraits envers les microorganismes. Cette toxicité est fonction du site et du nombre de groupements hydroxyles présents sur le composé phénolique. En outre, il est évident que l'augmentation de l'hydroxylation conduit à une augmentation de la toxicité. L'effet antimicrobien de ces phénols peut être expliqué par l'inhibition de la croissance bactérienne suite à leur adsorption sur les membranes cellulaires, l'interaction avec les enzymes et les effecteurs ou la privation en substrats et ions métalliques (**Dhaouadi et al., 2010**).

L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée (synergie) de différents composés (Essawi et Srour, 2000).

Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique, l'altération des fonctions de la membrane cytoplasmique, la séquestration de substrats nécessaires à la croissance microbienne et l'inhibition du métabolisme énergétique microbien (Jungkind, 1995).

Il a été rapporté que l'activité antimicrobienne chez d'autres plantes est dû à la présence d'anthraquinones (Comini et al., 2011; Doughari et al., 2012).

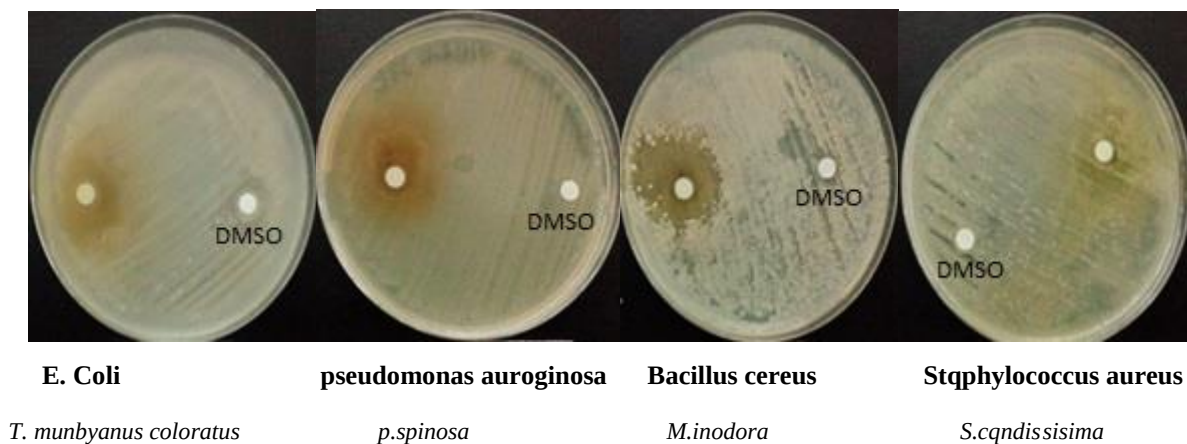


Figure18 :résultats des activités antibactériennes de quatre plantes étudiées .

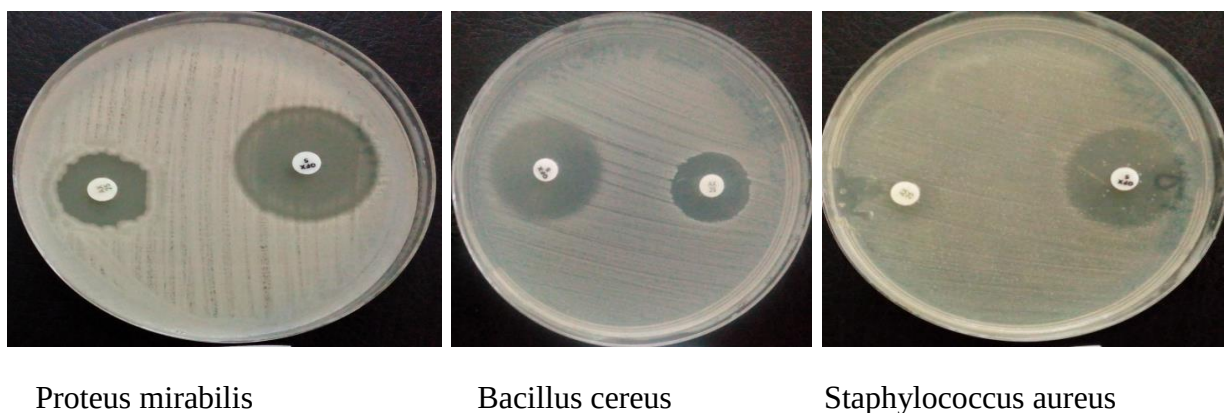
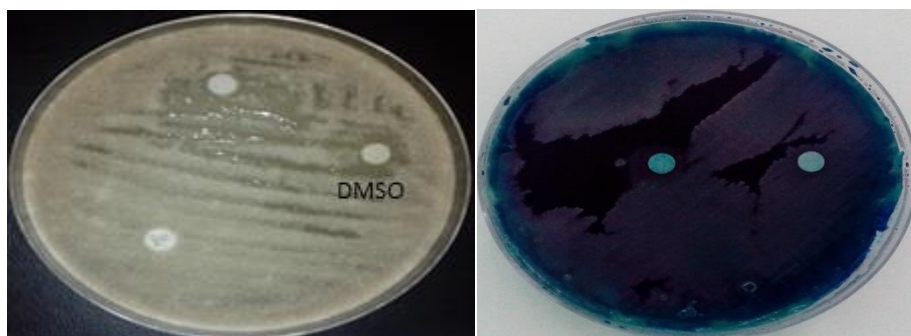


Figure19 :résultats de l'effets de l'antibiotique (Amoxicilin) sur quelques bacteries.



Aspergillus Niger

p.spinosa

Candida albicans

T. munbyanus coloratus

Figure19 : résultats des activités antifongiques de quelques plantes étudiées.

CONCLUSION

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Une étude phytochimique et antimicrobienne des extraits actifs de quatre plantes médicinales algériennes (*Thymus munbyanus subsp. coloratus* (Boiss. & Reut.) Greuter & Burdet., *Pallenis spinosa* L. (Cass.), *Micromeria inodora* (Desf.) Benth., *Satureja candidissima* (Munby.) Briq.) Elles étaient choisies parmi les espèces les moins étudiées tout en prenant en considération leur caractère endémique. Donc, ce travail se veut une contribution à une meilleure connaissance de ces espèces végétales.

D'abord, un screening phytochimique, en tant qu'analyse qualitative, a mis en évidence la richesse de certaines espèces en métabolites secondaires comme dans le cas de *Pallenis spinosa* L. (Cass.) et *Satureja candidissima* (Munby.) Briq.

Nous avons déterminé quantitativement, dans un premier temps, la teneur en phénols totaux en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu, dans les extraits bruts méthanoliques obtenus par simple macération. La plante *Pallenis spinosa* L. (Cass.) possède la teneur la plus élevée de l'ordre de $108.59 \mu\text{g EAG/mg}$. Le dosage des flavonoïdes par la méthode d' AlCl_3 , a révélé une teneur élevée enregistrée chez la plante *Satureja candidissima* (Munby.) Briq. de l'ordre de $40.92 \mu\text{g EQ/mg d'extrait}$.

Au cours de cette étude nous avons réalisé également un test antimicrobienne vis-à-vis 05 bactéries et 2 champignons pathogènes, les résultats microbiologiques ont montré que pour les extraits bruts les plus actifs de notre plantes ayant montré un effet inhibiteur notable vis-à-vis des souches microbiennes sensibles.

Sachant que notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches, de cet effet, et comme perspectives on propose de :

Des travaux complémentaires sont alors nécessaires pour isoler et identifier les substances bioactives responsables des activités testées.

Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.

Développer des médicaments antiradicalaires à base de plantes, doués d'une activité antioxydante.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

1. Adwan, G. B, Abu-Shanab. F, Adwan. and F, Abu-Shanab., (2006) .Antibacterial Effects of Nutraceutical Plants Growing in Palestine on *Pseudomonas Aeruginosa*-Turk. *J Biol*30 ,239–242.
2. Antoni, A. Joan, V.,(2003). Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Pallars Pyrenees, atalonia, Iberian Peninsula). Part II. New or very rare uses of previously known medicinal plants.*Journal of Ethnopharmacology*.,84,211-227.
3. Attou ,A . ,(2017) .Detrmination de la composition chimique des huiles essentielles de quatre plantes aromatique de l'ouest Algerien (Region d'Ain Temouchent) .etude de leurs activité antioxydante et antimicrobienne . These de Doctora en Biologie .P 35.
4. Bahorun ,T. Gressier, B. Trotin, F. Brunet, C. Dine, T. Luyckx ,M.Vasseur ,J. Cazin, M. Cazin, J, C. and Pinkas, M.,(1086-1089). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthornfresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arznei. Forschung*..
5. Benchabane, O. Hazzit, M. Baaliouamer ,A. and Mouhouche, F., (2012). Analysis andAntioxidant Activity of the Essential Oils of *Ferula vesceritensis*Coss. etDur. and*Thymusmunbyanus*Desf. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15, 774-781.
6. Bendif ,H. ,(2017) . Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques *in vitro* des extraits actifs de quelques Lamiaceae:*Ajugaiva*(L.) Schreb., *Teucriumpolium*L., *Thymus munbyanus* subsp. *coloratus*(Boiss. &Reut.) Greuter&Burd *Rosmarinuseriocalyx*Jord &Fourr.These de Doctora en biologie .ENS de Kouba, Alger.P25.
7. Bendif,H .M ,Boudjenib,M,D.MiaraL.Biqiku,M.Bramucci,G.Caprioli,G.Lupidi,L.Quassinti,G .A.Sagratini,L.Vitali,S.Vittori,F.Maggi ., (2017) . *Rosmarinus eriocalyx*: An alternative to *Rosmarinusofficinalis* as a source of antioxidant compound ,*Food Chem* .218,78-88.
8. Benítez, G. Onzález ,M,G. *Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain):Ethnopharmacologicalsynthesis. Journal of Ethnopharmacology*,2010, 129,87– 05.
9. Benomari, F.Z. Djabou ,N. Medbouhi,A . khadir, A. Selles,CDesjobert,J.M. Costa,J. Muselli ,A.,(2016).Chemical Variability and Biological Activities of Essential Oils of *MicromeriaInodora* (Desf.).Benth.From Algeria .*Chemistry &Biodiversity* .13, 1559-1572.
10. Bergogne-Berezin ,E .and Dellamonica ,P.,(1995) . Antibiothérapie en pratique clinique. Ed-Masson, Paris, p. 486.

11. Bouchouqa ,E . ,(2016) . Extraction des polyphénolsetétude des activitésantioxydante et antibactérienne de quelquesplantesSahariennes. These de Doctora en biologie .Université de Annaba.P35.
12. Boumediene , M. Mohammed ,I. ,(2009) . La flore vasculaire des trara(Algerie).ActaBotanicaMalacitana,. 62, 57-75.
13. Bousmaha-Marroki, L.F, Atik-Bekkara.F ,Tomi. and J ,Casanova. , (2007).Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Thymus Ciliatus*(Desf.) Benth. Ssp. *Eu-Ciliatus*MairefromAlgeria. *J EssentOilRes*19: 490–493.
14. Bruneton , J., (1993). Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. 2ème Ed. Paris: Tec & Doc Lavoisier, P. 268-277.
15. Bruneton, J., (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4ème Ed. Paris: Tec& Doc Lavoisier.*
16. Bruneton, J. (1999) .Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. mdicales internationales Editions Technique & Documentation, Cachan, [S.l.], p. 647-673.
17. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute (2009). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard M02–A10, tenth ed. Author, Wayne,PA.
18. Cosentino, S, C. I, G, Tuberoso. B, Pisano. and M, Satta. , (1999). In Vitro Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Sardinian Thymus Essential Oils.” *Letters in AppliedMicrobiology*29. 130–135.
19. Cowan, M, M.,(1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 564-582.
20. Dahdouh ,H .Benthaher ,F. ,(2016) . Etude de l'activité antioxydante d'extraits des graines de *Foeniculumvulgare*.*Memoire de Mastere en analyse Biochimique* .Université Mohamed Boudiaf M'sila .p43.
21. Daoudi ,F . ,(2015) .Analyse chimique et propriétés biologiques des huiles essentielles de*Chiliadenusrupestriset Thymus coloratus*(Zaater) de la région de Tlemcen.Memoire de Master en chimie. Université de Tlemcen . p25.
22. DJebara ,A. ,(2013) .Etude Phytochimique du *Pallenis spinosa*.Memoire de Magister en Chimie organique .Université de Batna.P54.
23. Djeridane, A. Yousfi, M.Nadjemi, B. Vidal, N. Lesgards, J, F. and Stocker, P.,(2007) .Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Eur.Food Res. Technol.* 224: 801-809.

24. Ebrahimi, S. N, J. H, Mirjalili, and A, Sonboli., (2008).Essential Oil Composition and Antibacterial Activity of *Thymus Caramanicus* at Different Phonological Stages.*Food Chem.* 10: 1016.
25. Erlund, I., (2004). Review of the flavonoids quecetin, hesperetin, and naringenin. Dietarysources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24, 851-874.
26. Giovanni, A.Giancarlo, C.,(1997). A sesquiterpene alcohol from *Pallenisspinosa*.*Phytochemistry*,1997, 46, 1039 -1043.
27. Grunwald, J. and Christof ,J,M., (2004). Guide de la phytothérapie. La thérapeutique par les plantes. La santé par les plantes. Un répertoire des plantes. Des conseils pratiques.1ère édition. Marabout: Italie. PP 360-361.
28. Harrar,A. ,(2011) .Activités antioxydante et antimicrobienne d’extraits de *Rhamnus alaternus*L.Memoire de Magister . Université de Sétif.P44.
29. Ivorra ,A., Funes,J.; Sobre la presencia de *Micromeria Inodora* (Desf .) Benth . en la provincia de almeria (surestre de espana) .*acta botanicamalacitana* 41.2016.
30. Jamal, B. Allal, D. ,(2004) . Contribution à la connaissance de la florevas-culaire de la forêt de l’achach, plateau central (maroc). *Actabotanicamalacitana*.28; 23-41.
31. JAVIER, F.,(2001). Origin and evolution of the endemic Macaronesian *Inuleae* (Asteraceae): evidence from the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA .*Biological Journal of the Linnean Society*, 81.77-97.
32. K, Hegazy1.,(2011).vegetation and species altitudinal distribution in al-jabal al-akhdar landscape, Libya. *J. Bot*, 43, 1885-1898.
33. Kaufmann ,SHE.,(1997). Host response to intracellular pathogens. Ed. Springer ; R.G. Landes, New York; Austin, 1997, p. 345.
34. Kerbouche ,L ., (2009) .Composition chimique et activité biologique des huiles essentielles de labiacées et de cupressacées .Memoire de Magister .Ecole superieure agronomique –El Harrach – Alger .P27.
35. Kholkhal ,F. Lazouni, H, A. Bendahou, M. Boublenza, I. Chabane, S, D. and Chaouch, T., (2013). Étude phytochimique et évaluation de l’activité anti-oxydante de *Thymus Ciliatus*ssp.*coloratus*. *Afrique Science*, 09(1), 151-158.
36. Kholkhal, F. ,(2013) .Etude Phytochimique et Activité Antioxydante Des Extraits Des Composés hénoliques de *Thymus Ciliatus*Ssp*Coloratus*et *SspEuciliatus*.” Doctorat en biologie, université de Tlemcen Abou Bekr Belkaid.

37. Lugasi ,A . Hovari ,J. Sagi, k ,V et Birol .,(2003). The role of antioxydante phytonutrients in the prevention of deseases .ActaBiologiqaSzegdeensis ,Vol .47,n ,1-4,p.p.119-125.
38. Maria, J, P. Antonio ,R.,(1999). Anti-insect activity of plant extracts from the wild flora in southeastern Spain. *Biochemical Systematics and Ecology*. 27, 10.
39. Maurice , N.(1997) . L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle. Ed.Lavoisier, Paris, p. 12-14.
40. Pascual Teresa, J, A.F, Barrero. and A, San Feliciano. ,(1978).Kudtdiol, New Sesquiterpene Alcohol from *JasoniaGlutinosa*D.C. *Tetrahedron Letters* 19, no. 43 : 4141–4144.
41. Quezel , P. Santa, S. ,(1962-1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol. 1-2. Ed. Centre National de la Recherche Scientifique CNRS.Paris, 1170p.
42. Rasooli, I, M. B ,Rezaei, and A,Allameh., (2006).Ultrastructural Studies on Antimicrobial Efficacy of Thyme Essential Oils on *Listeria Monocytogenes*. *International Journal of Infectious Diseases* 10: 236–241.
43. Ribéreau-Gayon , J . Peynaud , m.Ribéreau-Gayon , P . and Sudraud ,P.(1972) . Sciences et techniques du vin. Tome 1, analyse et controle des vins. Ed. Dunod, Paris, p. 671.
44. Saidj , F., (2006). Extraction de l'huile essentielle de thym : *Thymus numidicus*kabylica- Thèse de magistère en Technologie des hydricarbures, Université Boumerdes, Algerie.
45. Soto-Mendivil, E. A, J. F, Moreno-Rodriguez, and M. E Starron-Espinosa.,(2006). Chemical Composition and Fungicidal Activity of the Essential Oil of *Thymus Vulgaris* against *Alternariacitri*.” *E-Gnosis* 4, no. 16 .
46. Teixeira da Silva J, A.,(2004). Mining the essential oils of the *Anthemideae*. *Afr. J. Biotechnol.* ; 3: 706-720.
47. Thierrey ,M., (2005). Guide de la flore méditerranéenne de collioure à Menton. Arrière-pays et littoral. Editions-Sud ouest: France. P16.
48. Ulanowska, K. Majchrzyk ,A.Moskot, M. Jak__bkiewicz-Banecka J. and W_Âgrzyn G.,(2007). Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia*2007; 62: 132-135.
49. Valsaraj, R. Pushpangadan, P. Smitt, U,W. Adsersen, A. Christensen, S, r, B, g., Sittie ,A. Nyman, U. Nielsen, C. and Olsen C, E.,(1997). New Anti-HIV-1, Antimalarial, and Antifungal Compounds from *Terminaliabellerica*. *J. Nat. Prod.* 60: 739-742.

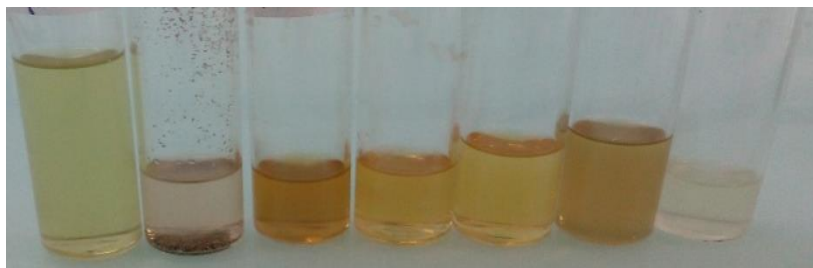
50. Wächter, G, A. Hoffmann ,J, J. Furbacher, T. Blake ,M, E. and Timmermann, B, N.,(1999).
Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochem.* 1999; 52:
1469-1471.

ANNEXES

Annexes

Annexe 1: résultats des tests phytochimiques préliminaires.

1.*T.munbyanusSubspcoloratus*



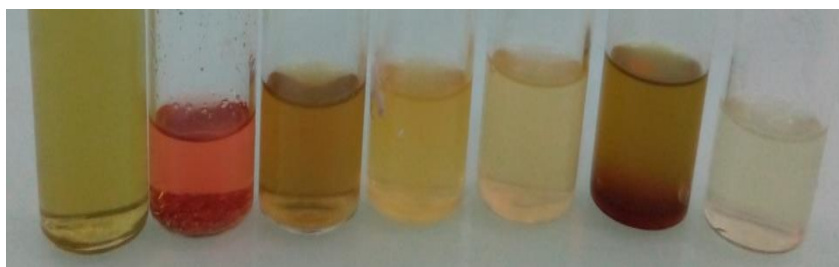
2.*Pallenisspinosa*



3.*Micromeria inodora*



4.*Satureja candidissima =Calamintha candidissima (Munby) Benth.*



Composés phénoliques	Flavonoïdes	Tanins	Les quinones	Les anthraquinones	Les terpénoïdes	les saponosides
-------------------------	-------------	--------	--------------	-----------------------	-----------------	-----------------

Annexe 2:resultats de Dosage des polyphénols totaux.



Annexe 3:Dosage des flavonoïdes totaux.



Annexe 4:Compositionde Bouillon nutritive .

Peptone 10g

Extrait de levure 5g

NaCl 5g

Eau distillee 1000 ml

pH 7,2

Annexe 5:Compositionde L'eau physiologie .

Chlorure de sodium 9g

Eau distillee 1000 ml

Résumé

Dans le domaine de l'évaluation des ressources naturelles et médicales en Algérie, nous avons étudié quatre plantes médicinales, nommément : le ssp. coloratus de Thymus, Pallenis Spinosa, Micromeria inodora, Satureja candidissima en raison de la grande circulation dans la médecine populaire. Avec une extraction de rendement estimé dans du méthanol Trempage% (9,55, 10,65, 8,90, 12,23), de Thymus subsp. coloratus, Pallenis Spinosa, Micromeria inodora, Satureja candidissima, sur l'université de phénol Altertab.oukdrat Aadidat utilisant photoactif Folin-Ciocalteu, où il trouve (78,13, 108,59, 63,32, 52,78) de l'acide microg équivalent Algalick / mg d'extrait de plantes : de Thymus subsp. coloratus, Pallenis Spinosa, Micromeria inodora, Satureja candidissima, respectivement, alors que je trouve les flavonoïdes des collèges manière estimés AlCl₃ (31,91, 31,31, 11,18, 40,92) mg d'équivalent Alchrisan / mg de plantes Almstl_khas, du Thymus subsp. coloratus, Pallenis Spinosa, Micromeria inodora, Satureja candidissima sur l'activité de test Altoala.oobdy Alamada bactéries D sur 05 souches bactériennes de Gram + et Gram- et 02 souche fongique en utilisant la méthode de propagation de disques effet sur l'inhibition des souches bactériennes Gram-, tout en enregistrant l'inhibition de Aspergillus Nager pour plante Pallenis Spinosa et l'absence de celui-ci dans les trois plantes restantes.

Mots-clés: multi-phénol, activité antibactérienne, la ssp. coloratus Thymus, Pallenis Spinosa, Micromeria inodora, Satureja candidissima.

Abstract

In the field of valuing the natural and medical resources in Algeria, we studied four medicinal plants: Thymus munbyanus ssp. coloratus, Pallenis Spinosa, Micromeria inodora, Satureja candidissima due to its frequent circulation in folk medicine. The total yield of phenol was determined by using the Folin-ciocalteu reactor, where it was found that the total soluble phenol was found to be in the form of methanol (9.8, 10.65, 8.90, 12.23): Thymus munbyanus subsp. coloratus, Pallenis Spinosa, Micromeria inodora and Satureja candidissima. 78.3, 108.59, 63.32, 52.78), respectively, while total flavonoids and AlCl₃ (31.91, 31.31, 11.18, 40.92) µg Kg / mg of plant extracts, Thymus munbyanus subsp. coloratus, Pallenis Spinosa, Micromeria inodora, Satureja candidissima, respectively. D. Bacteriological strains of Gram + + and Gram - 02 fungal strains using the method of diffusion of disks had an inhibitory effect on Gram-positive strains, while Aspergillus Nager was inhibited for Pallenis Spinosa and its absence in the remaining three plants.

Keywords: phenolic, antimicrobial activity, Thymus munbyanus ssp. coloratus, Pallenis Spinosa, Micromeria inodora, Satureja candidissima.

ملخص

في مجال تثمين الموارد الطبيعية و الطبية في الجزائر، قمنا بدراسة أربعة نباتات طبية وهي: *Thymus munbyanus* ssp. *coloratus*، *Pallenis Spinosa*، *Micromeria inodora*، *Satureja candidissima* نظرا لكثرة تداولها في الطب الشعبي. حيث قدر مردود الاستخلاص بالنقع في الميثانول % (9.55، 10.65، 8.90، 12.23): *Thymus munbyanus* subsp. *coloratus*، *Pallenis Spinosa*، *Micromeria inodora*، *Satureja candidissima*، على الترتيب. وقدرت عديدات الفينول الكلية باستعمال متفاعل Folin-ciocalteu، حيث وجد (78.13، 108.59، 63.32، 52.78) مكروغرام مكافئ حمض الغاليك/ملغ من المستخلص للنباتات: *Thymus munbyanus* subsp. *coloratus*، *Pallenis Spinosa*، *Micromeria inodora*، *Satureja candidissima*، على الترتيب، في حين وجدت الفلافونويدات الكلية والمقدرة بطريقة AlCl₃ (31.91، 31.31، 11.18، 40.92) مكروغرام مكافئ حمض الغاليك/ملغ من المستخلص للنباتات: *Thymus munbyanus* subsp. *coloratus*، *Pallenis Spinosa*، *Micromeria inodora*، *Satureja candidissima*، على التوالي. وأبدى إختبار النشاط المضاد للجراثيم على 05 سلالات بكتيرية غرام+ وغرام- و 02 سلالة فطرية باستعمال طريقة إنتشار الأقراص تأثيرا مثبطا على السلالات البكتيرية غرام-، في حين تم تسجيل تثبيط على *Aspergillus Nager* بالنسبة للنبات *Pallenis Spinosa* وانعدامه في النباتات الثلاثة الباقية. **كلمات مفتاحية:** متعدد الفينول، نشاط مضاد للجراثيم، *Thymus munbyanus* ssp. *coloratus*، *Pallenis Spinosa*، *Micromeria inodora*، *Satureja candidissima*.