

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

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DEMICROBIOLOGIE
ET DE BIOCHIMIE



DOMAINE: SCIENCE DE LA NATURE DE LA VIE
FILIERE: SCIENCES BIOLOGIQUES
OPTION: BIOCHIMIE APPLIQUEE

Mémoire de Master Académique

Par :

CHAKER INAS
BENNAKHLA NADJMA

Intitulé

**Evaluation de l'activité antibactérienne
de l'extrait méthanolique de *Phlomis crinita***

Soutenu devant le jury composé de :

BOUDJELAL Amel	Pr	Encadreur
BENKHALED Abderrahim	MCA	Examineur
REGGAMI Yassine	MCA	Examineur

Année universitaire: 2020 /2021

Remerciement

- ✚ Nous remercions tout d'abord 'Allah' le tout puissant de nous avoir donné la force et la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail.
- ✚ Nos remerciements vont à notre promoteur Pr BOUDJELAL Amel ainsi que les membres du jury, Dr Benkhaled A. et Dr Reggami Y.
- ✚ Nos remerciements vont également au Dr CHABANE S. pour son aide au laboratoire.
- ✚ Mes remerciements les plus chaleureux sont destinés au Dr DEHIMI et au Dr HARRAR et Dr BAALI pour leur précieuse aide.
- ✚ Nous adressons nos sincères remerciements à tous les membres du laboratoire de Biochimie et Microbiologie du département de Microbiologie et Biochimie, Université de Msila.
- ✚ Nous adressons notre gratitude à Mme Merah et Mr Seghiri pour leur aide à la réalisation de quelques paramètres de l'activité antibactérienne.
- ✚ nous exprimons notre gratitude à tous nos enseignants qui nous ont formé, du primaire jusqu'à nos jours.
- ✚ Finalement, un grand merci du fond du cœur, plein d'amour aux membres de la famille.



Dédicace

*Alhmadou li Allah, qui je' ma donnée tout puissant, le foi, le courage, la
patience d'étudier et suivre de chemin de la science*

Je Dédie ce modeste travail À

*À l'étoile de mon ciel qui a su mettre la lumière dans mon univers, et donné l'espoir de
poursuivre ma vie, a toujours été
ma source de force pour affronter les différents obstacles. «Ma chère mère». Que dieu la
protège.*

*À la chose la plus précieuse que j'ai, Tu as toujours été à mes côtés pour
me soutenir et m'encourager, toi qui m'as tout donné sans
retour, « Mon père que j'aime ». Que dieu te garde.*

À mes très chères sœurs et À mes deux frères adorables Mohammed et abdelmalek

À la mémoire de toute ma famille

À ma chère copine et binôme Inas

À tous Mes meilleures amies et À mes collègues de la promotion biochimie appliquée 2021

À tous ceux qui ont participé à la réalisation de ce travail de près ou de loin.

Nadjma





Dédicace

- ✓ *À mes adorables parents qui m'ont tout donné et qui se sacrifient pour moi tout le temps*
- ✓ *Mes sœurs et frère bien-aimées*
- ✓ *à tous ceux qui ont contribué à ma carrière*
- ✓ *Et nous-mêmes avons aussi besoin de remerciements et de compliment*
- ✓ *Merci pour mes efforts*
- ✓ *Tout cela grâce à Dieu*

INAS



Résumé

Résumé

L'objectif de cette étude est la valorisation d'une plante médicinale de la région de M'sila. *Phlomis crinita*, est une espèce appartenant à la famille des *Lamiaceae*. Elle est utilisée dans la région du Hodna pour traiter les brûlures, les lésions et les infections de la peau, ainsi que certaines allergies. Un extrait méthanolique a été préparé à partir de la partie aérienne de *Phlomis crinita*, à l'aide d'un dispositif Soxhlet. Le criblage phytochimique a montré la richesse de l'extrait par les flavonoïdes, les tanins et les polyphénols. L'activité antibactérienne de l'extrait a été déterminée sur huit souches bactériennes de l'ATCC selon la méthode de diffusion de disque. L'extrait a montré un effet bactérien vis-à-vis de deux bactéries Gram+, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*. La concentration minimale inhibitrice (CMI) manifestée par les trois concentrations de l'extrait méthanolique sur *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* est de 62.5 mg/ml.

Mots-clés : Extraction, *Phlomis crinita*, tests phytochimique, activité antibactérienne, CMI.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تثمين النبات الطبي من منطقة المسيلة *Phlomis crinita* هو نوع ينتمي إلى عائلة الشفويات (Lamiaceae) يستخدم في منطقة الحضنة لعلاج الحروق والآفات والتهابات الجلد وكذلك بعض أنواع الحساسية. تم تحضير مستخلص ميثانولي من الجزء الهوائي من *Phlomis crinita* ، باستخدام جهاز Soxhlet. أظهر الفحص الكيميائي النباتي ثراء المستخلص بالفلافونويد والدباغ والبوليفينول. تم تحديد النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلص على ثماني سلالات بكتيرية من ATCC بطريقة الانتشار القرصي. أظهر المستخلص تأثير بكتيري ضد نوعين من البكتيريا + *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* الحد الأدنى للتركيز المثبط (MIC) الذي تظهره التركيزات الثلاثة للمستخلص الميثانولي على *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* هو 62.5 مجم / مل.

الكلمات المفتاحية: الاستخلاص ، *phlomis crinita* ، الاختبارات الكيميائية النباتية ، النشاط المضاد للبكتيريا .

Abstract

The objective of this study is the valorization of a medicinal plant from the region of M'sila. *Phlomis crinita*, is a species belonging to the Lamiaceae family. It is used in the Hodna region to treat burns, lesions and infections of the skin, as well as some allergies. A methanolic extract was prepared from the aerial part of *Phlomis crinita*, using a Soxhlet device. Phytochemical screening showed the richness of the extract by flavonoids, tannins and polyphenols. The antibacterial activity of the extract was determined on eight bacterial strains of ATCC by the disk diffusion method. The extract showed a bacterial effect against two Gram + bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. The minimum inhibitory concentration (MIC) shown by the three concentrations of the methanolic extract on *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* is 62.5 mg / ml.

Keywords: *Phlomis crinita* Cav, antimicrobial activity, phytochemical test, extract, Lamiaceae

Sommaire

Remerciement	2
Résumé	5
Chapitre I :	2
I. Phlomis crinita	3
I.1. Les lamiacées	3
I.2. Le genre <i>Phlomis</i>	3
I.2.1. Description botanique de l'espèce	3
I.2.3. Systématique de la plante	4
I.2.4. Distribution géographique	4
I.2.5. Utilisations traditionnelles	5
I.2.6. Composition chimique	5
II. Les métabolites secondaires	6
II.1. Les composés phénoliques	6
Chapitre II :	7
I. Matériel	8
I.1. Matériel végétal	8
II. Les méthodes	8
II.1. Préparation de l'extrait méthanolique	8
II.2. Rendement de l'extraction	8
II.4. Activité antibactérienne	9
II.4.1. Microorganismes utilisés	9
II.4.2. Méthode de diffusion en disque	9
Chapitre III :	11
I.1. Rendement de l'extraction	12
CONCLUSION	15
ANNEXES	17
Référence	20
Bibliographiques	20

Listes des figures

Figure 01.....	p03
Figure 02	p04
Figure 03.....	p05

Listes des tableaux

Tableau 01.....	p09
Tableau 02.....	p10
Tableau 03.....	p12
Tableau 04.....	p13

Liste des abréviations

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

DMSO : Diméthylesulfoxyde.

COX : cyclo-oxygénases

R% : Rendement.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

MeOH :Méthanol.

BN :Bouillon Nutritive.

UFC : Unité Formant Colonies.

Gram + : Gram positive.

Gram – : Gram négative.

DO : la densité optique

Introduction

L'homme a toujours bien employé et exploité la nature pour ses besoins médicaux et alimentaires (Rhattas, et al., 2016). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), environ 65-80% de la population mondiale utilise les plantes médicinales pour leurs soins de santé primaire (Libman, et al., 2006; Tamert, 2016).

Les plantes médicinales renferment de nombreux principes actifs où certains sont issus du métabolisme secondaire (Chaabi, 2008). Ces plantes ont été utilisées pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments (Gurib-Fakim, 2006).

Les plantes médicinales sont connues pour leurs propriétés antimicrobiennes (Yano, et al., 2006). Les métabolites secondaires issus des plantes sont capables d'inhiber la croissance bactérienne en agissant sur différentes cibles cellulaires (Eloff, 1998). La résistance aux antibiotiques, qui est un problème de santé publique, rappelle qu'il est important de trouver de nouvelles molécules possédant une activité antibactérienne.

La région du Hodna est connue par sa richesse en plantes aromatique et médicinales. Parmi les plantes qui constituent le couvert végétal, l'espèce *Phlomis crinita*, de la famille des lamiacées. Elle est utilisée pour traiter les brûlures, les lésions et les infections de la peau ainsi que certaines allergies ; elle est aussi utilisée pour ses vertus gastroprotectives (Amor, et al., 2009) (Gürbüz, et al., 2003).

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Phlomis crinita* et la détermination de la concentration minimale inhibitrice des souches qui ont montré une sensibilité.

Ce mémoire comporte trois parties comprenant :

- Une synthèse bibliographique qui concerne la plante d'étude, des généralités sur les composés phénoliques
- Une partie expérimentale consacrée à la présentation du matériel végétal et des méthodes utilisées, suivi des résultats des différents tests effectués ainsi que leurs interprétations.
- Une conclusion et des perspectives au travail

Chapitre I :
Synthèse Bibliographique

I. *Phlomis crinita*

I.1. Les lamiacées

Les Labiées ou Lamiacées constituent une importante famille de plantes angiospermes dicotylédones qui comptent entre 233 à 263 genres (Heywood, et al., 2007) et de 6900 à 7200 espèces (Grayer, et al., 2003). C'est l'une des familles les plus répandues dans le monde entier selon la figure 01 (Judd, et al., 2002).



Figure 01: Répartition géographique des Lamiacées dans le monde (Degreef, 2002)

I.2. Le genre *Phlomis*

Le nom *Phlomis*, du grec (phlox), signifie flamme. Les feuilles des plantes servaient à la création de mèches de bougies (Albaladejo, et al., 2005)

Le genre *Phlomis* comprend environ 100 espèces dont 4 seules en Algérie : *Phlomis herba-venti*, *Phlomis bovei*, *Phlomis caballeroi* et *Phlomis crinita* (Quezel and Santa, 1963)

I.2.1. Description botanique de l'espèce

La plante mesure 75 cm de hauteur, ses feuilles basales font 6 à 18 mm de longueur, elles sont lancéolées ou ovales. Le pétiole fait 7 cm, les feuilles florales sont rhombiques de 2- 4 x 1-2.5 cm, elle est sessile. Bractées inférieures à 1 mm de largeur, linéaires 10-18 mm avec des poils souples dépassant 3 mm, émanant d'une base stellaire. Le calice est couvert de poils stellaires, la corole est marron à jaune. De loin, les feuilles et les tiges ont une couleur grise, Figure 02 (Quezel and Santa, 1963)



Figure n :0 2 : Image de *Phlomis crinita* (<https://hoseito.com/producto/phlomis-crinita>)

I.2.3. Systématique de la plante

Selon (Quezel and Santa, 1963) *Phlomis Crinita* est classé dans :

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Spermaphytes</i>
Sous embranchement	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>Dicotylédones</i>
Sous classe	<i>Asteridae</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Phlomis</i>
Espèce	<i>Phlomis crinita</i>

I.2.4. Distribution géographique

Phlomis crinita est une espèce rare et endémique algérienne. C'est l'une des 09 plantes endémiques enregistrées dans le rapport National sur la diversité biologique en Algérie (unies, 2014)

La distribution géographique du *Phlomis crinita* est mentionnée dans l'espace ouest méditerranéen, en Algérie, Tunisie, Maroc et Espagne (Figure 03).



Figure 3 : Distribution géographique du *Phlomis crinita* (source: World Checklist of Selected Plant Families)

I.2.5. Utilisations traditionnelles

Phlomis crinita est l'espèce la moins étudiée parmi les espèces du genre (Limem-Ben Amor, et al., 2009) *Phlomis*. Elle est généralement utilisée pour traiter les brûlures, les lésions et les infections de la peau ainsi que certaines allergies. Elle est aussi utilisée pour soulager la douleur et/ou l'inflammation des muscles et des articulations (entorses, ecchymoses, douleur articulaire) et pour ses vertus gastroprotectives (Gürbüz, et al., 2003), (Amor, et al., 2009)

I.2.6. Composition chimique

Le genre *Phlomis* est très riche en plusieurs classes des constituants naturels. Plus de 151 composés ont été isolés et identifiés, parmi lesquels on cite, les flavonoïdes, les phenylpropanoïdes, les phenylethanoïdes (Saracoglu, et al., 1998), les diterpenoïdes (Mohajer, 2005). L'huile essentielle de *Phomis* est composée de quatre chémotypes dominés par les monoterpènes (pinène, limonène et linalol), les sesquiterpènes (ger-macrène D et -caryophyllène), composés aliphaliques (ester méthylique de l'acide 9,12,15-octadécatriénoïque), grasacides (acide hexadécanoïque) et autres composants (trans-phytol, 9,12,15-octadécatrien-1-ol). Flavonoïdes, les iridoïdes et l'alcool phényléthylique constituent

les principaux composés isolés des extraits de *Phlomis* (Gürbüz, et al., 2003),(Amor, et al., 2009)

II. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des composés biosynthétisés naturellement par les végétaux, mais qui ne participent pas directement au métabolisme végétal (Laitinen, et al., 2000)

Ils sont caractérisés par de faible concentration dans les tissus végétaux (Newman and Cragg, 2012). D'après leur biosynthèse, les métabolites secondaires peuvent être divisés en trois classes : Polyphénols ,terpénoïdes et alcaloïdes (Hennebelle, et al., 2004)

II.1.Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires très répandus dans le règne végétal (tous les fruits et les légumes).Plus de 8000 structures ont été identifiées (Waksmundzka-Hajnos and Sherma, 2011).Ils jouent un rôle important dans l'interaction de la plante avec son environnement, surtout contre les radiations UV, le stress oxydatif et les attaques microbiennes. Ils sont impliqués aussi dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines et la maturation des fruits (Boizot and Charpentier, 2006) ,Ils assurent la communication entre cellules, entre végétaux et entre végétaux et animaux (Robert and Catesson, 2000).

Les polyphénols sont des métabolites secondaires doués de propriétés biologiques et la consommation d'aliments riches en ces molécules, réduit le développement de nombreuses pathologies, comme le cancer, l'ischémie cardiaque, l'athérosclérose et l'hypertension, Cela peut-être expliqué par le fait que ces composés ont la capacité de modifier de nombreux facteurs impliqués dans la genèse de ces maladies (Martin and Andriantsitohaina, 2002)

La recherche scientifique a permis de vérifier un nombre important d'activités biologiques pour les polyphénols comme l'activité antioxydant, anti-inflammatoire ,anticancéreuse, antimicrobienne, antiallergique, antiathérogène, anti-thrombotique, cardioprotectrice et vasodilatatrice (Falleh, et al., 2008) Leurs propriétés sont liées au fait qu'ils peuvent moduler l'activité de nombreuses protéines intracellulaires (les protéines kinases, les phospholipases, l'adénylatecyclase, les ATPases, les cyclo-oxygénases (COX), le cytochrome P450) et agir sur différents types cellulaires (Martin and Andriantsitohaina, 2002)

Chapitre JJ :
Matériels et méthodes

Matériel et méthodes

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

La plante *Phlomis crinita* a été récoltée en Mai 2020 dans la région de Boussaâda, (Wilaya de M'sila). La partie aérienne a été lavée, séchée à température ambiante dans l'obscurité, ensuite finement broyée.

II. Les méthodes

II.1. Préparation de l'extrait méthanolique

Introduire 15 g de poudre de plante dans une cartouche poreuse du dispositif Soxhlet, puis introduire 600 ml du méthanol pure dans un ballon. L'extraction se poursuit durant 06 heure (Bimakr, et al., 2011), L'extrait méthanolique obtenu est récupéré a la fin de l'extraction, filtré à l'aide de papier Whatman. Le solvant d'extraction est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif L'extrait sec récupéré est stocké à 4°C jusqu'à son utilisation (Engonga, 2009)

II.2. Rendement de l'extraction

Le rendement de l'extraction en R (%) en extrait brut sec méthanolique est calculé selon la formule suivant (Mahmoudi, et al., 2013)

$$R (\%) = [(M_{\text{Extrait}} / M_{\text{Plante sèche}})] \times 100$$

Ou :

- ✓ **M Extrait:** Masse de l'extrait
- ✓ **M Plante sèche:** Masse de la plante sèche

II.3. Criblage phytochimique

Les différentes analyses chimiques sont effectuées par un criblage phytochimique. Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation (voir annexe 01). Celle-ci est effectuée sur la poudre végétale et/ou extrait aqueux selon la méthodologie décrite par (Houghton and Raman, 1998)). Le tableau 01 indique les différents groupes chimiques recherchés et les réactifs spécifiques utilisés.

Tableau 01 : Réactifs spécifiques et réactions positifs du criblage phytochimique.

Groupes chimiques	Réactifs et résultats positifs
Polyphénols	Chlorure de fer $\longrightarrow$ Coloration bleu-noirâtre ou verte
Flavonoïdes	Alcool chlorhydrique et copeaux de magnésium $\longrightarrow$ Coloration rose-orangé
Tanins	Chlorure de fer $\longrightarrow$ Coloration bleu-noirâtre et précipité

II.4. Activité antibactérienne

II.4.1. Microorganismes utilisés

Des souches bactériennes issues des lots de l'American Type Culture Collection(ATCC) Gram+ et Gram- ont été utilisées :*Escherichia coli*(ATCC 25922), *Listeria monocytogenes*(ATCC 15313), *Klebsiella pneumoniae*(ATCC 4352), *Bacillus subtilis*(ATCC 9372), *Proteus mirabilis*(ATCC 35659), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC 27853), *Staphylococcus aureus*(ATCC 6538). La gélose nutritive a été utilisée pour l'isolement et la conservation des souches bactériennes et la gélose MullerHinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries à l'extrait méthanolique de la partie aérienne de la plante.

II.4.2. Méthode de diffusion en disque

La méthode de diffusion en milieu gélosé ou méthode de disques est une technique qualitatif basé sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide, à partir des disques stériles imprégnés dans l'extrait à tester, permettant de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des germes par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque (Sharififar and MH, 2007) Après deux repiquages successifs sur bouillon nutritif et un isolement sur gélose nutritif, des colonies bien isolées ont été transférées dans des tubes contenant de l'eau distillée stérile afin d'avoir des suspensions bactériennes ayant une turbidité (exprimé par la mesure de la Densité Optique à 600 nm) voisine à celle de McFarland de 0.5. Une DO de 0.08-0.1 correspond à 10^8 UFC/ml (Lesueur, et al., 2008). Par la suite la surface entière de la gélose

Mueller Hinton a été étalée par cette suspension bactérienne. L'extrait de *Phlomis crinita* est dissous dans 1 ml de DMSO, plusieurs concentrations ont été testées (800, 1000 et 1200 mg/ml).

Des disques stériles de 6 mm de diamètre (papier Whatman n°3) imprégnés de 10µl d'extrait de plante par disque, ont été déposés stérilement sur la surface de la gélose. Les boîtes sont maintenues à 4°C pendant 1 à 2 h ensuite incubées 24 h à 37°C. Un disque imbibé de DMSO utilisé comme contrôle négatif.

L'activité antimicrobienne a été déterminée à l'aide d'une règle mesurant le diamètre de la zone d'inhibition exprimée en mm. L'importance du diamètre de la zone d'inhibition reflète l'impact de l'extrait sur les souches bactériennes (Tableau 02).

Tableau 02 : Echelle de sensibilité des germes (Benkhaled, 2018)

Diamètres de la zone d'inhibition (mm)	Transcription	Sensibilité du germe
0	0	Résistant
< 8	-	Non sensible
9 < Ø < 14	+	Sensible
15 < Ø < 19	++	Très sensible
> 20	+++	Extrêmement sensible

II.4.3 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice

L'effet bactériostatique de notre extrait est évalué en déterminant la concentration minimale inhibitrice par la méthode des micro dilutions. La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en principes actifs qui inhibe la croissance des microorganismes (Denis, et al., 2011). Les tests ont été effectués dans le bouillon nutritif. Des dilutions en série au demi ont été préparées dans des microplaques de microtitration de 96 puits dans la gamme de concentrations choisie. Les souches, dont la concentration finale a été ajustée à 10^6 UFC/ml. Les microplaques ont été incubées, à 37 °C pendant 24 h.

Chapitre III :

Résultat et discussion

I.1. Rendement de l'extraction

L'extraction en continue a été réalisée en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction qui permet d'obtenir un extrait brut. Cette extraction a donné un rendement de 16.99 % en matière sèche. Le résultat obtenu est supérieur à celui obtenu par (Amor, et al., 2009) et Tamret et Latreche.,(2015) ou le rendement variait de 8.12 d'un extrait méthanolique et de 3.20 % d'un extrait éthanolique de même plante respectivement. Cette légère variation est probablement due à la nature du solvant utilisé pour l'extraction ainsi que les conditions de l'extraction (à chaud ou à froid) (Barroso, et al., 2014)

I.2. Criblage phytochimique

Les tests de caractérisation basés sur des réactions de précipitation et de coloration ont permis d'identifier qualitativement les principaux groupes de composés actifs. Ces tests colorimétriques sont basés sur l'interaction de certaines fonctions avec les réactifs utilisés. La lecture des résultats se fait selon l'intensité de la coloration :

- Une réaction fortement positive est représentée par : +++
- Une réaction moyennement positive est représentée par : ++
- Une réaction faiblement positive est représentée par : +
- Une réaction négative est représentée par : –

Les résultats des réactions de mise en évidence réalisés sur l'infusé ou la poudre de plante sont présentés dans le tableau suivant:

Tableau03:Résultats des tests phytochimique

Constituants chimiques	Poudre/Infusé
Polyphenols	+
Flavonoïdes	++
Tanins	+++
+ : présence	

Les résultats des tests préliminaires indiquent la présence de plusieurs composés actifs tels que flavonoïdes, tannins et polyphénols. L'intensité de la couleur observée indique la richesse de l'extrait aqueux en flavonoïdes et tannins. Ces résultats sont comparables avec ceux de (Tamert, 2016) ; (Amor, et al., 2009) qui indiquent la richesse de l'extrait en flavonoïdes et tannins.

I.3. Activité antibactérienne

Le développement de la résistance bactérienne vis-à-vis les antibiotiques disponibles actuellement nécessite de rechercher de nouveaux agents antibactériens. Certaines études sont axées sur les agents antimicrobiens dérivés de plantes, qui ont été utilisés pendant longtemps en médecine traditionnelle pour surmonter les infections. L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Phlomis crinita* est basée sur la méthode de diffusion en milieu gélosé ou méthode de disque. Les résultats obtenus pour les tests antibactériens de l'extrait de plante sont représentés dans le tableau 04

Tableau 04 : Diamètre(mm) des zones d'inhibition de l'extrait méthanolique de *P. crinita*

Bactéries testées	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)		
	Doses (mg/ml)		
	800	1000	1200
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	10,5	11,5	12,5
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	11,5	12,0	13,0

La sensibilité des bactéries envers les différents extraits est classée selon les diamètres des zones d'inhibition. Aucun effet antibactérien n'a été observé sur la plupart des bactéries testées sauf sur deux bactéries Gram-positives, à savoir, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*. Les diamètres d'inhibition varient de 10,5 à 12,5mm pour *Bacillus subtilis* et de 11,5 à 13,0 mm pour *Staphylococcus aureus*.

L'effet antibactérien obtenu vis-à-vis des bactéries gram positifs peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram + et Gram -. (Georgantelis, et al., 2007) Les bactéries Gram -possèdent une couche additionnelle qui se compose de phospholipides, de protéines et de lipopolysaccharides . (Basli, et al., 2012)

Le pouvoir antimicrobien de plantes est tributaire de leurs compositions chimiques. Généralement, les plantes de la famille *Lamiaceae*, riches en métabolites, ont été trouvées actives contre une grande variété de germes microbiens (Liolios, et al., 2007)

Les différentes classes de polyphénols essentiellement les flavonoïdes et les tanins peuvent augmenter la toxicité des extraits envers les microorganismes. Cette toxicité est en fonction du site et du nombre de groupements hydroxyles présents sur le composé phénolique (Cowan, 1999). Les phénols peuvent être absorbés à la paroi cellulaire, ce qui conduit à une rupture de la structure et de la fonction de la membrane (Hayrapetyan, et al., 2012). 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., 2011).

L'effet bactériostatique de notre extrait est évalué en déterminant la concentration minimale inhibitrice par la méthode des micro dilutions selon la figure 04.

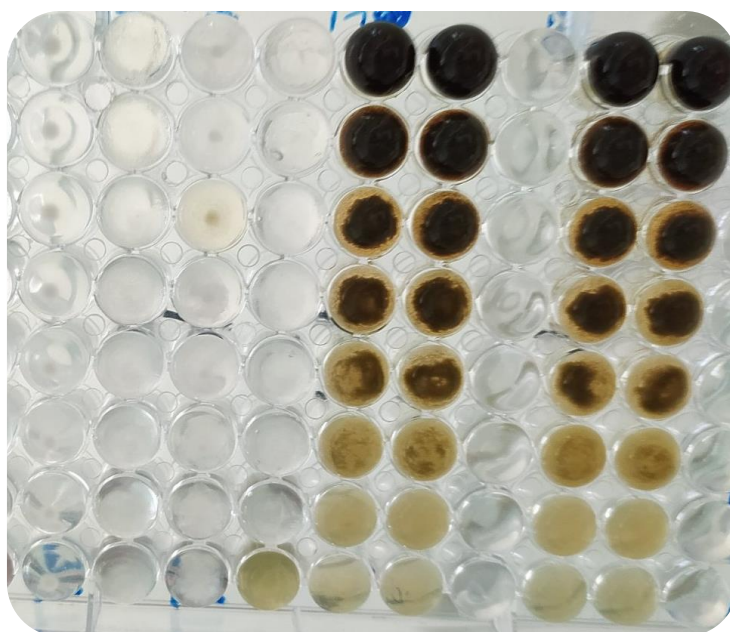


Figure 04 : CMI de l'extrait vis-à-vis *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*.

Une concentration minimale de 62,5 mg/ml de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Phlomis crinita* a permis d'inhiber la bactérie *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*.

CONCLUSION

Conclusion

La diversité des végétaux en propriétés biologiques est attribuée à une large gamme de molécules bioactives synthétisées par les plantes. Ces molécules naturelles ont reçu un grand intérêt dans la recherche vue les effets indésirables des médicaments chimiques. En effet, Dans ce travail *Phlomis crinita* a été choisi afin de l'identification des groupes phytochimique dans un premier lieu, et l'évaluation de l'activité antibactérienne dans un deuxième lieu.

Un criblage phytochimique, a permis de caractériser les flavonoïdes, les tanins et les polyphénols avec des intensités variables. Ces molécules sont connues par leurs pouvoirs biologiques et pharmacologiques.

L'activité antibactérienne a été déterminée sur des bactéries Gram⁺ et Gram⁻ par la méthode de disques. Les résultats obtenus ont indiqué que l'extrait méthanolique de *Phlomis crinita* ne possède aucun effet bactérien sur la plupart des bactéries testées.

Un effet antibactérien sur deux souches Gram⁺, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*. Enfin, l'ensemble de ces résultats obtenus, ne constitue qu'une étape d'étude préliminaire dans la recherche des substances naturelles dans cette plante. Il serait intéressant de réaliser d'autres études approfondies. A cet effet il est important de :

- Isolement et caractérisation des composés actifs dans les différents extraits par des méthodes plus spécifiques (HPLC, CPG, RMN).
- Evaluation d'autres effets biologiques in vitro comme in vivo des extraits bruts et de leurs composés actifs.

ANNEXES

Annexe I

Tests phytochimique

Les polyphénol :

Quelques gouttes d'HCL (biochem) sont ajoutées à 5 ml d'infusé , la réaction donne une coloration rouge en présence de polyphénols (Rizk, et al., 1982)

Les Tanins :

Quelques gouttes de solution de Fe Cl 3 à 5 % sont ajoutées à 5 ml d'infusée . La réaction donne une coloration bleue noire en présence de tanins . (Rizk, et al., 1982)

Le flavonoïde :

10 ml de l'infusé est ajouté à 5 ml d'ammoniaque dilué , et quelques gouttes de H₂SO₄, la réaction donne une coloration jaune en présence de flavonoïde.

Annexe II

Préparation de milieux de cultures

Bouillon Nutritive

Mettre 8g de poudre dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée. Agiter lentement jusqu'à dissolution complète. Répartir en tubes ou en flacons. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Gélose Nutritive

Mettre 28g de poudre en suspension dans un litre d'eau distillée, bien mélanger. Chauffer sous agitation et laisser bouillir pendant 1 minute. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Gélose Mueller-Hinton

Dissoudre 38 g de la gélose Muller-Hinton dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis auto-claver pendant 15 minutes à 121°C.

Référence

Bibliographiques

1. Albaladejo, R.G., *et al.* Contrasting nuclear-plastidial phylogenetic patterns in the recently diverged Iberian *Phlomis crinita* and *P. lychnitis* lineages (Lamiaceae). *Taxon* 2005;54(4):987-998.
2. Amor, I.L.-B., *et al.* Investigation of biological activity of polar extracts isolated from *Phlomis crinita* Cav ssp. *mauritanica* Munby. *Drug and chemical toxicology* 2009;32(1):38-46.
3. Barroso, M.R., *et al.* Exploring the antioxidant potential of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench phenolic compounds for cosmetic applications: Chemical characterization, microencapsulation and incorporation into a moisturizer. *Industrial crops and products* 2014;53:330-336.
4. Basli, A., *et al.* Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie* 2012;10(1):2-9.
5. Becker, K., *et al.* Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *Journal of clinical microbiology* 2004;42(11):4988-4995.
6. Benkhalel, A. Activités anti-inflammatoire, anti-oxydante et antimicrobienne de l'extrait aqueux de *Limoniastrum guyonianum*. In.; 2018.
7. Bimakr, M., *et al.* Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and bioproducts processing : transactions of the Institution of Chemical Engineers, Part C*. 2011;89(1):67-72.
8. Boizot, N. and Charpentier, J.-P. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'INRA* 2006:79-82.
9. Bouhairi, S.; 2017. *Bacillus subtilis*: Caractères et applications.
10. Chaabi, M.: Strasbourg 1; 2008. Étude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines: *Euphorbia stenoclada* Baill.(Euphorbiaceae), *Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr.(Combretaceae), *Limoniastrum feei* (Girard) Batt.(Plumbaginaceae).
11. Coker, C., *et al.* Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microbes and infection* 2000;2(12):1497-1505.
12. Cowan, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 1999;12(4):564.
13. Degreef, J. Botanique systématique. Une perspective phylogénétique by W. S. Judd; C. S. Campbell; E. A. Kellogg; P. Stevens. *Systematics and Geography of Plants* 2002;72:242-243.
14. Denis, F., *et al.* Introduction. In: Denis, F., *et al.*, editors, *Bactériologie Médicale (Deuxième Édition)*. Paris: Elsevier Masson; 2011. p. xv-xvi.
15. Dhaouadi, K., *et al.* Cell Viability Effects and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tunisian Date Syrup (Rub El Tamer) Polyphenolic Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011;59(1):402-406.
16. Drobniewski, F.A. *Bacillus cereus* and related species. *Clinical microbiology reviews* 1993;6(4):324-338.
17. Eloff, J.N. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of ethnopharmacology* 1998;60(1):1-8.

18. Engonga, o. Etude phytochimique, activités antimicrobiennes et antioxydantes de quelques plantes aromatiques et médicinales africaines. Thèse Doct- sciences., Univ. Ouagadougou, pp.34-42. 2009.
19. Falleh, H., *et al.* Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies* 2008;331(5):372-379.
21. Georgantelis, D., *et al.* Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 C. *Meat science* 2007;76(1):172-181.
22. Grayer, R.J., *et al.* The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, nepetoidins A and B, in the Lamiaceae. *Phytochemistry* 2003;64(2):519-528.
23. Gürbüz, İ., *et al.* Anti-ulcerogenic activity of some plants used as folk remedy in Turkey. *Journal of ethnopharmacology* 2003;88(1):93-97.
24. Gurib-Fakim, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of Medicine* 2006;27(1):1-93.
25. Hayrapetyan, H., Hazeleger, W.C. and Beumer, R.R. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate (*Punica granatum*) peel extract in meat paté at different temperatures. *Food Control* 2012;23(1):66-72.
26. Hennebelle, T., Sähpaz, S. and Bailleul, F. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie* 2004;2(1):3-6.
27. Heywood, V., *et al.* Flowering Plant Families of the World. 2007.
28. Houghton, P.J. and Raman, A. Analysis of crude extracts, fractions and isolated compounds. In, *Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts*. Springer; 1998. p. 113-138.
29. Janda, J. and Abbott, S. The Genera *Klebsiella* and *Raoultella*. *The Enterobacteria* 2006;2:115-129.
30. Judd, W., *et al.* Botanique systématique-Une perspective phylogénétique: 467p. *De Boeck Université, Paris & Bruxelles* 2002.
31. Kaper, J.B., Nataro, J.P. and Mobley, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology* 2004;2(2):123-140.
32. Laitinen, M.-L., Julkunen-Tiitto, R. and Rousi, M. Variation in phenolic compounds within a birch (*Betula pendula*) population. *Journal of Chemical Ecology* 2000;26(7):1609-1622.
33. Lesueur, D., *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Acronychia pedunculata* (L.) Miq. from Vietnam. *Natural product research* 2008;22(5):393-398.
34. Libman, A., *et al.* Medicinal plants: an important asset to health care in a region of Central Laos. *Journal of ethnopharmacology* 2006;106(3):303-311.
35. Limem-Ben Amor, I., *et al.* Phytochemistry and biological activities of *Phlomis* species. *Journal of ethnopharmacology* 2009;125(2):183-202.
36. Liolios, C., *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Algerian *Phlomis bovei* De Noé subsp. *bovei*. *Molecules* 2007;12(4):772-781.

37. Mahmoudi, S., Khali, M. and Mahmoudi, N. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology* 2013(9):35.
38. Martin, S. and Andriantsitohaina, R. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. In, *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*. Elsevier; 2002. p. 304-315.
39. Mohajer, M. Antiinflammatory and analgesic effects of *Phlomis lanceolata* Boiss and Hohen. extracts and examination of their components. *Int J Pharmacol* 2005;2:50-54.
40. Morancais, S. and Tavoukdjian, N. Le monde microbien. *Paris: Casteilla* 2002.
41. Newman, D.J. and Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products* 2012;75(3):311-335.
42. Parize, P., *et al.* Antifungal therapy of *Aspergillus* invasive otitis externa: efficacy of voriconazole and review. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2009;53(3):1048-1053.
43. Quezel, P. and Santa, S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. In.; 1963.
44. Rhattas, M., DOUIRA, A. and ZIDANE, L. Étude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Parc National de Talassemtane (Rif occidental du Maroc). *Journal of Applied Biosciences* 2016;97:9187-9211.
45. Rizk, A., *et al.* Constituents of plant growing in Qatar. 1982.
46. Robert, D. and Catesson, A.-M. Organisation végétative. Wolters Kluwer France; 2000.
47. Saracoglu, İ., *et al.* A new phenylethanoid glycoside from *Phlomis pungens* Willd. var. *pungens*. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 1998;46(4):726-727.
48. Schlech, W. Pathogenesis and immunology of *Listeria monocytogenes*. *Pathologie-biologie* 1996;44(9):775-782.
49. Sharififar, F.M. and MH, M. SH; HHODASHENAS, M.; KHOSHNOODI, M. *vitro* evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control* 2007;18(7):800-805.
50. Tamert, A.; 2016. Labiées des monts de Tessala (wilaya de Sidi Bel abbès): histologie et phytochimie.
51. UNIES, P.D.N. CINQUIEME RAPPORT NATIONAL SUR LA DIVERSITE BIOLOGIQUE. 2014.
52. Waksmundzka-Hajnos, M. and Sherma, J. High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical science. *Chromatographic Science Series* 2011;102:477-478.
53. Yano, Y., Satomi, M. and Oikawa, H. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International journal of food microbiology* 2006;111(1):6-11.